

ALLMÄNNA RÅD 94:2

VATTENRECIPIENT-  
KONTROLL  
*vid skogsindustrier*

NATURVÅRDSVERKET

BESTÄLLNINGSADRESS:  
NATURVÅRDSVERKET  
KUNDTJÄNST, 171 85 SOLNA  
TEL: 08-799 10 00  
FAX: 08-28 00 78

ISBN 91-620-0084-5  
ISSN 0282-7271  
© 1994 NATURVÅRDSVERKET  
SÄTTNING: ALBATROSS DESIGN  
OMSLAG: TYPOFORM  
UPPLAGA: 2 000 EX  
TRYCK: NORSTEDTS TRYCKERI AB, STOCKHOLM

---

# Förord

Föreliggande Allmänna Råd har tillkommit i syfte att åstadkomma en enhetligare och mer målinriktad vattenrecipientkontroll vid skogsindustrier.

Naturvårdsverket har prioriterat arbetet med tretton allvarliga miljöhot. De miljöhot som främst berörs här är försurning av mark och vatten, övergödning av hav, sjöar och vattendrag, påverkan av metaller samt påverkan av organiska miljögifter.

Råden riktar sig till länsstyrelser som beslutar om kontrollprogram samt till verksamhetsutövare, vattenvårdsförbund, vattenförbund, konsultföretag och andra som utformar förslag till och genomför kontrollprogram.

Med anledning av att den här föreslagna kontrollen kan komma att leda till ökade kostnader för vissa företag i branschen har Naturvårdsverket, i enlighet med bestämmelserna i begränsningsförordningen (1987:1347), hemställt hos regeringen att få utfärda råden. Regeringen har i beslut 1994-02-24 funnit att de kontroller som föreslås är motiverade för att uppnå en högre kvalitet och enhetlighet på vattenrecipientkontrollen vid skogsindustrier, och att branschens kostnader för att uppfylla kraven inte kan anses oskäligen. Regeringen har därför lämnat sitt medgivande till att dessa Allmänna Råd ges ut.

Beslut om utgivning av dessa Allmänna Råd för vattenrecipientkontroll vid skogsindustrier har fattats av Naturvårdsverkets generaldirektör.

Solna i mars 1994

Statens naturvårdsverk

---

# Innehåll

Sammanfattning	5
English summary	6
Inledning	8
Mål och genomförande	10
Mål	10
Referensdata	11
Recipientkontrollens lagstöd	11
Recipientkontrollens innehåll och omfattning	12
Val av variabler	12
Recipientkontrollens programformer	16
Utförande	32
Rapportering	37
Referenser	40
Bilaga I: Definitioner	41
Bilaga II: Metodbeskrivningar	43

---

# Sammanfattning

Recipientkontroller görs för att belysa miljöfarliga verksameters verkningar i miljön och för att ge underlag för beslut om miljöskyddande åtgärder.

Vattenrecipientkontrollens utformning och omfattning beror av recipienttyp, föroreningstyp och -belastning. Dessa Allmänna Råd beskriver utformningen och omfattningen av recipientkontrollen i vattenområden som påverkas av skogsindustriell verksamhet och är en branschanpassning av Naturvårdsverkets Allmänna Råd 86:3 "Recipientkontroll vatten". Med skogsindustri menas här fabriker för tillverkning av massa, papper och fiberskivor.

Flera forskningsprojekt, däribland Naturvårdsverkets projekt Miljö/-Cellulosa, har gett ökade kunskaper om miljöeffekterna av utsläpp från skogsindustrin. Dessutom krävs enhetligare kontroll av recipienterna. Därför har dessa Allmänna Råd utformats.

Här presenteras olika kontrollprogram som tar hänsyn till både recipienttyper och tillverkningsprocesser. Recipientkontrollen består av ett basprogram och ett utvidgat program. Basprogrammet innehåller löpande, relativt täta undersökningar, medan det utvidgade programmet löper med längre tidsintervall eller tillämpas när undersökningar påkallas av exempelvis tillståndsprovning, processförändringar eller resultat av undersökningarna i basprogrammet.

Båda programmen är i första hand inriktade på biologiska undersökningar men har också fysikaliska/kemiska inslag.

---

## English summary

Monitoring of receiving water systems is carried out to assess the impact of environmentally hazardous activities in the environment and to serve as a basis for decisions on environmental protection measures.

The design and scope of the monitoring is dependent on the type of the receiving water body, and on the pollution type and load. The present guidelines describe the design and scope of the monitoring in areas that are affected by forest industry activities, and are an industry-specific adaptation of the Swedish Environmental Protection Agency's guidelines 86:2 "Surface water monitoring ". By "forest industry" is meant here mills for the manufacture of pulp, paper and fibre building board.

These guidelines have come about in response to increasing demands on more uniform monitoring, and in response to the fact that the results of several research projects - e. g. the Swedish Environmental Protection Agency's project Environment/Cellulose - have increased our knowledge of the environmental impact of discharges from forest industry activities.

These guidelines present various programmes for monitoring of receiving waters at forest industry mills, taking into account both the types of water bodies and different manufacturing processes. The monitoring described here consists of a basic programme and an expanded programme. The basic programme includes regular, relatively frequent, investigations, while the expanded programme is performed with a lower frequency. The primary purpose of the expanded programme is to analyze observed effects and make broad evaluations of the state of the body of water, not to serve as a basis for predicting trends. The expanded programme is therefore performed at a lower frequency than the basic programme, suitably every 3-5 years, possibly at longer intervals depending on the severity of the pollution. The investigations in the expanded programme can also be occasioned by, for example, permit applications, process changes or the results of the investigations in the basic programme. Both the basic programme and the expanded programme consist of biological as well as physical/chemical investigations, but are primarily focused on the use of biological effect variables.

The regular monitoring programme shall be preceded by preinvestiga-

---

tions where the body of water is described with regard to morphometry, fundamental biological conditions and dispersion of released substances. In these pre-investigations, the location of the stations to be included in the monitoring programme is determined. The number of stations can normally be small.

It should be pointed out that the characteristics of each body of water should influence the design and scope of the monitoring. The amount and potential environmental impact of the polluting discharges must also be considered.

A summary is provided below of the contents of the monitoring of receiving water systems for the forest industry units judged to have the greatest environmental impact, i.e. mills that manufacture pulp.

### **Basic programme**

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 1) Physical/chemical variables: | Investigations of water quality  |
| 2) Fish:                        | Relative density, age distribution/recruitment, external diseases, biochemical/physiological studies (e.g. EROD activity in liver) |
| 3) Bottom-dwellingfauna:        | Population density, biomass, population structure, defects on <i>Macoma baltica</i> (when in the Baltic Sea)                       |
| 4) Sediment:                    | Sediment quality, chlorinated organic compounds or resin acids and fatty acids   |
| 5) Macrophytes:                 | No investigations  |

### **Expanded programme**

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1) Physical/chemical variables: | No investigations   |
| 2) Fish:                        | Reproduction studies, expanded biochemical/physiological studies, histopathology/pathology, chlorophenols in bile, metals in liver    |
| 3) Bottom-dwellingfauna:        | Defects on <i>Monoporeia affinis</i>  |
| 4) Sediment:                    | Metals  |
| 5) Macrophytes:                 | Depth distribution, species composition, biomass, coverage, survey of brown algae, growth of bladder wrack and N, P and TOC in algae. |

---

# Inledning

De övergripande målen för miljöövervakning är att beskriva tillståndet i miljön och visa på antropogent betingade förändringar, att bedöma hotbilder, att ge underlag för prioritering och beslut om åtgärder, att följa upp genomförda åtgärder och att ge underlag för analys av olika verksamheters och utsläppskällors påverkan på miljön.

Miljöövervakning sker på olika nivåer i samhället. Inom de internationella havskonventionerna bedrivs samarbete avseende utformning och genomförande av övervakningsprogram för berörda havsområden. På nationell nivå driver Naturvårdsverket sedan 1978 programmet för övervakning av miljö kvalitet, PMK, som huvudsakligen täcker områden som inte påverkas av direkta utsläpp. I stora delar av landet har länsstyrelserna tagit initiativ till en samordnad recipientkontroll där kommuner och industrier i vattenvårdsförbund, vattenförbund eller på annat sätt enats om gemensamma kontrollprogram för olika vattenområden.

Riksdagen har i enlighet med vad som sägs i propositionen En god livsmiljö (1990/91:90) beslutat att det nationella övervakningsprogrammet ska utvecklas för att förbättra insamling och beskrivning av nationell och internationell information. Enhetliga regionala miljöövervakningsprogram ska införas i varje län för att ge erforderliga kunskaper om regionala miljöförhållanden, och som underlag för regional och kommunal planering. Länsstyrelserna blir ansvariga för den regionala övervakningen, som ska vara kopplad till det nationella programmet.

Recipientkontrollen utgör en del av den regionala miljöövervakningen. Dessa Allmänna Råd beskriver innehållet i och omfattningen av recipientkontrollprogram i vattenområden som nyttjas som recipienter för avloppsvatten från skogsindustrier. Kontrollprogrammen kan utformas individuellt för en enskild anläggning eller samordnat med exempelvis kommuner och andra industrier inom ett större vattenområde. Oavsett formen för recipientkontrollen är verksamhetsutövaren skyldig att kontrollera påverkan på miljön och att bekosta kontrollen.



---

En revision av skogsindustrins recipientkontrollprogram är angelägen då resultaten från flera forskningsprojekt, däribland Naturvårdsverkets projekt Miljö/ Cellulosa, har ökat kunskapen om effekterna i miljön av utsläpp från skogsindustrin.

Det är också viktigt att de upprättade kontrollprogrammen utvärderas mot de nya mål och krav som kommer att ställas på miljöövervakningen. Ytterligare skäl för revidering kan vara att den nu löpande kontrollen visar på brister i kontrollprogrammet. Undersökningsmaterial från tidigare och pågående recipientkontroll bör ligga till grund för utformningen av nya program.

Det sker en fortlöpande, och inom vissa delar snabb utveckling ifråga om såväl lämplig analysteknik som lämpliga biologiska metoder att mäta effekter av föroreningar.

Naturvårdsverket avser att ge ut en handbok om miljöövervakning. Syftet är att få till stånd en enhetlig programstruktur och ett enhetligt innehåll i svensk miljöövervakning, oavsett om den är av nationell, regional eller lokal karaktär. Metodbeskrivningar för enstaka metoder som föreslås i föreliggande råd kan komma att ändras med anledning av den kommande handboken.

---

# Mål och genomförande

## Mål

Recipientkontrollen ska

- *belysa hur ämnen transporteras inom ett vattenområde som bedöms vara relevant för utvärdering av miljöpåverkan av utsläpp från en skogsindustri*

Om nationell eller regional miljöövervakning pågår inom vattenområdet ska kontrollen samordnas med denna. Uppgifter om belastningen från enstaka föroreningskällor erhålls från utsläppskontrollen vid den miljöfarliga verksamheten i området.

- *relatera tillstånd och utvecklingstendenser med avseende på tillförda föroreningar till förväntad bakgrund och/eller till förväntad påverkan orsakad av en skogsindustri*

Kontrollen anger recipientens tillstånd vid den aktuella tidpunkten. Begreppet utvecklingstendenser avser en statistiskt säkerställd förändring av mätdata över tiden med hänsyn till hydrografi, recipientens morfologi och föroreningsbelastning. Förväntad bakgrund anger ett opåverkat tillstånd bestämt av de naturgivna förutsättningarna för vattenområdet i fråga och utgör referens till recipientkontrollens mätresultat. Förväntad påverkan av ett utsläpp från en skogsindustri bestäms med hänsyn till andra verksamheters påverkan på recipienten.

- *ge underlag för planering, utförande och utvärdering av miljöskyddsåtgärder*

Kontrollresultatet ska göra det möjligt att bedöma förekomsten av störningar i vattenmiljön och att föreslå välgrundade åtgärder för att förbättra vattenkvaliteten samt att följa upp åtgärdernas effekt. Vidare kan resultaten ge underlag för lokal eller regional planering.

---

## Referensdata

Vid utvärdering av kontrollresultaten bör man jämföra med förväntad bakgrund eller referensvärden inom vattenområdet i fråga. Olika slag av referenser kan utnyttjas, såsom rumslig referens i form av likartade opåverkade ekosystem i t.ex. den nationella eller regionala övervakningen, egenreferens i form av tidsserier eller referens till i litteraturen beskrivna likartade fall. Den som bedriver verksamheten är skyldig att bidra till kostnaderna för regionala referenser till det lokala programmet.

Ett system för bedömning och klassificering av sötvatten i kvalitetsklasser beskrivs i Naturvårdsverkets Allmänna Råd 90:4 "Bedömningsgrunder för sjöar och vattendrag. Klassificering av vattenkemi samt metaller i sediment och organismer". För kust och hav saknas motsvarande klassificeringssystem.

Utvärderingarna måste också kopplas till belastningen från varje enskild anläggning och vägas mot övrig ämnestillförsel inom området. Endast genom att lägga en helhetssyn på recipientkontrollen kan man utvärdera den enskilda anläggningens miljöpåverkan. Enklast sker detta genom samordning av recipientkontrollprogrammen.

## Recipientkontrollens lagstöd

Den som utövar verksamhet som kan vara miljöfarlig är enligt miljöskyddslagen skyldig att kontrollera verksamheten. Tillsynsmyndigheten kan, med stöd av 43 § miljöskyddslagen, förelägga verksamhetsutövaren att utföra undersökningar av verksamheten och dess verkningar i miljön. Kontrollen sker vanligen enligt ett program som reglerar kontrollen dels av verksamheten (anläggningskontroll) och dels av verkningarna i omgivningen (recipientkontroll). Vid beslut om föreläggande enligt 43 § får tillsynsmyndigheten sätta ut vite. Den som inte iakttar förelägganden som meddelats med stöd av 43 § kan dömas till böter eller fängelse. Förelägganden enligt 43 § kan överklagas.

Tillsynsmyndigheten kan, om det anses lämpligare, föreskriva att undersökningarna utförs av någon annan än den som utövar verksamheten och utse någon att göra dem. Normalt sker detta i form av samordnad recipientkontroll inom exempelvis ett vattenvårdsförbund. Verksamhetsutövaren är skyldig att ersätta kostnaderna för dessa undersökningar.

Mer om lagstödet kan läsas i Naturvårdsverkets Allmänna Råd 90:11 "Tillsyn enligt miljöskyddslagen".

---

# Recipientkontrollens innehåll och omfattning

Utsläpp kan ofta spåras genom koncentrationsförhöjningar i vatten, sediment och organismer. Effekter av utsläppen kan yttra sig i kvantitativa och/eller kvalitativa förändringar i växt- och djursamhällen, genom störningar av enskilda arters fortplantning och produktion eller i morfologiska och fysiologiska skador.

Dessa Allmänna Råd är i första hand inriktade mot användningen av biologiska effektparametrar. Valet av variabler styrs till viss del av rekommendationerna i Naturvårdsverkets Allmänna Råd 86:3 "Recipientkontroll vatten". Programmen som presenteras här är dock till stora delar utformade efter de speciella förhållanden som råder i de områden som utgör recipienter för avloppsvatten från skogsindustri

## Val av variabler

### **Recipientens grundtillstånd samt påverkansområde och exponeringssituation**

Uppgifter om vattenföring, vattentemperatur, konduktivitet (salinitet), pH och alkalinitet i vatten samt sedimentstruktur och vattenhat i sediment ger information om recipientens grundläggande hydrografiska, fysikaliska och kemiska tillstånd. Denna information kan utnyttjas vid spridningsberäkningar och vid bedömningar av potentiell toxicitet av ett visst ämne i recipienten. Ytsedimentets struktur och innehåll av vatten, organiskt material, kväve, fosfor samt metaller och andra toxiska substanser kan utnyttjas för att beskriva utsläppens influensområde och påverkansgrad. Sedimentdata kan också utnyttjas vid utplacering av bottenfaunastationer och vid utvärdering av bottenfaunaobservationer. Bakgrundsvärden för t.ex. metaller bestäms från analys av äldre, djupare liggande, sedimentlager.

---

Klorfenolära substanser av typen klorguajakoler och klorcatekoler är typiska för avlopp från blekerier där klorhaltiga blekkemikalier används. Ämnena har dokumenterat biologiska effekter och kan därför betraktas som indikatorsubstanser för dessa utsläpp. Klorguajakoler och klorcatekoler metaboliseras i naturen till klorveratroler. Metaboliterna, som är mer bioackumulerbara än ursprungssubstanserna, mäts i sediment för att kartlägga påverkansområdet.

I fisk metaboliseras de klorfenolära ämnena till glukuronidkonjugat, för att skapa vattenlösliga substanser, och utsöndras i gallan. Analys av dessa konjugat i gallvätska hos stationär fisk ger en bra bild av den aktuella exponering fisken utsatts för och kan ge underlag för korrelationer till biologiska effekter.

För att få upplysning om spridningen av klororganiska ämnen kan EOCI/EOX mätas i sediment. Dessa analyser har däremot inte visat sig vara meningsfulla att utföra på biologiskt material. Detsamma gäller mätning av AOX i vatten och sediment.

Harts- och fettsyror används som indikatorsubstanser vid annan massa-tillverkning än vid blekning med klorinnehållande kemikalier och mäts som konjugat i gallvätska hos stationär fisk för att få ett mått på exponeringssituationen. I sediment mäts harts- och fettsyror för att få en bild av påverkansområdets utbredning.

### **Syretäring, eutrofiering och ljusförhållanden**

Syretäring sker vid nedbrytning av organiskt material. Det organiska materialet tillförs via utsläpp och produceras av organismer i recipienten. Produktionen av organiskt material i vattnet regleras av tillgången på växtnäringsämnen. En ökning av växtnäringsstillförseln, eutrofiering, ger primärt en ökad produktion av växter.

Syrgas, COD (kemisk syreförbrukning) och TOC (totalt organiskt kol) mäts i recipienten för att bedöma det organiska materialets påverkan på syretäringen. Analys av COD är under avveckling inom miljöövervakningen och bör utföras endast undantagsvis, t.ex. om långa mätserier redan finns. Recipientens tillstånd med avseende på växtnäringsämnen mäts i form av halter av totalfosfor, totalkväve och nitratkväve. Mätning av nitratkväve kan främst motiveras i kustoch havsvatten där kväve, i jämförelse med sjöar, spelar en förhållandevis viktig roll som tillväxtbegränsande ämne för växtplankton. Växtplanktonmängden mäts som halten klorofyll a i vattenpelaren.

Av erfarenhet vet man att omfattande fysikaliska och kemiska undersökningar i väl ventilerade kustvatten är inte meningsfulla. Ett utsläpp från en skogsindustri till en väl ventilerad kustrecipient sprids relativt snabbt ut i

---

stora vattenmassor. Påverkan i recipienten kan då vara svår att mäta och uttrycka som förändring med tiden. I sådana områden kan provtagningarna inskränkas till kontroll av syrgasförhållandena under kritiska perioder samt siktdjupsmätningar, vilka i regel kan göras i samband med undersökningar av t.ex. bottenfauna eller fisk.

Förändringar i den makroskopiska bottenfaunans samhällsstruktur till följd av eutrofiering och syretäring är väl belagda, varför registrering av bottenfauna ger möjligheter att bevaka eutrofieringsläget och syrgasförhållandet i recipienten. Kontroll av mjukbottenfauna har traditionellt utgjort den viktigaste biologiska parametern i skogsindustrins recipientkontroll. Anledningen har varit utsläppens höga innehåll av organisk substans, vilken lett till omfattande syrebrist och i många fall total avsaknad av makroskopisk bottenfauna inom avsevärda bottenarealer. Även där förhållandena medger bentisk produktion, kan studier av samhällsstrukturen utgöra effektiv kontroll av temporär syrebrist, då många normalt vanliga arter kräver konstant goda syreförhållanden. Beroende på minskade utsläpp av syreförbrukande ämnen från skogsindustrin kan behovet av bottenfaunaundersökningar som kontroll av syrebrist dock vara mindre motiverade.

Utsläpp av suspenderat och löst organiskt material från skogsindustrier kan försämra ljusklimatet i recipienten så att primärproduktion bara kan ske i grundare områden och på mindre vattendjup. Det är främst förekomsten av fastsittande växter som påverkas av försämrade ljusförhållanden. Recipientens ljusklimat kan kontrolleras genom mätning av siktdjup, färg, grumlighet och halt av suspenderat material.

Eftersom skogsindustrins utsläpp påverkar primärproduktionen dels genom närsaltens gödande effekt, dels genom den hämning som skapas av ökad vattenfärg, är den fastsittande makrovegetationen bättre lämpad att studera än planktonalgerna. Den produktionsstimulerande effekten kan mätas i den övre delen av littoralen, där ljuset fortfarande är tillräckligt, medan vattenfärgens hämmande effekt kan mätas i vegetationsbältenas utbredning i djupled.

Genom kontroll av fisksamhällets sammansättning indikeras, förutom de toxiska effekter som redogörs för nedan, även eutrofiering eftersom övergödning påverkar lek- och uppväxtförhållanden samt förändrar födo-underlaget för fisken. För Östersjöns kuster och för sötvatten är det väl känt att förekomsten av mörtfiskar ökar vid eutrofiering.

---

## Toxicitet

För att kontrollera i vilken mån fisk utsätts för och påverkas av toxiska ämnen kan ett urval av ekologiska, biokemiska/fysiologiska och patologiska variabler undersökas. En av fördelarna med att undersöka biokemiska/fysiologiska variabler är möjligheten att tidigt upptäcka subletala effekter av toxiska substanser i utsläppen (s.k. biomarkörer, tidiga varningssignaler) samt att observerade effekter hos fisk i recipienten kan bekräftas genom exponeringsförsök på laboratoriet. Kombinationen av biomarkörer och direkta ekologiska mått, som t.ex. täthet och artsammansättning, ger dels en koppling mellan varningssignal och sluteffekt och dels möjligheten att värdera i vilken mån en skada på fisksamhället kan ha toxisk bakgrund eller beror på t.ex. eutrofiering.

Det är väl dokumenterat att en induktion av enzymer, t.ex. EROD (7-etoxyresorufin-O-deetylas), i leverns avgiftningssystem är en mycket känslig biokemisk respons hos fisk som exponeras för skogsindustriutsläpp och alltså är ett väl lämpat biomarkörsystem. Denna respons indikerar närvaron av högmolekylära, ofta stabila, organiska ämnen och visar att organismens avgiftningssystem har trätt i funktion för att metabolisera de främmande ämnena.

Samtidigt utgör responsen en varningssignal eftersom en bestående induktion kan ge hormonella störningar med allvarliga följd effekter på sådana integrerade funktioner som ämnesomsättning, immunförsvaret, tillväxt och fortplantning. Utvecklingen av biokemiska/fysiologiska biomarkörer pågår ständigt, bl.a. kan studier av könshormoner nämnas.

Beprovad teknik finns för integrerade studier på olika organisationsnivåer, från cell till samhälle, och man har både i fält och experimentellt kunnat visa effekter av skogsindustriavlopp på en rad ekologiskt relevanta mått. Fisken är dessutom viktig genom att den utgör en betydelsefull länk vid överföring av persistenta ämnen till högre nivåer i ekosystemet, t.ex. sälar, fåglar och människor. På detta sätt kan fisken bidra till långväga spridning av ämnen i biologiskt aktiv form, dvs. bundna till levande organismer. Mängden fisk av olika arter som exponeras för ett toxiskt utsläpp är alltså en central variabel. Åldersfördelningar ger indikationer på om fisken kan reproducera sig normalt i recipienten, eller om andra än naturliga omvärldsfaktorer har betydelse.

För att knyta de biokemiska/fysiologiska parametrarna till vävnadsförändringar, samt för analys av eventuella irreversibla skador, bör även histologiska/histopatologiska undersökningar av levern utföras.

---

Förekomst av yttre sjukdomar, t.ex. öppna sår och fensskador, är ett ospecifikt men känsligt mått på förorening. Sådana patologiska observationer bör göras genomgående på den fisk som insamlas vid provfisken.

Laboratorieexperiment och undersökningar i fält visar att utsläpp från skogsindustrier har toxiska effekter på de vanliga östersjöorganismerna vitmärla (*Monoporeia affinis*) och östersjömussla (*Macoma balthica*). Effekterna består av missbildningar hos ägg och embryoner hos vitmärlan samt missbildningar på skalen hos östersjömusslor. Det är känt att även syrebrist på bottarna ger upphov till erosionsskador hos östersjömusslan. Skillnaden mellan dessa skador och toxiska effekter är att musslan i fallet med temporär syrebrist (konstant syrebrist leder till mortalitet) visserligen får en krater i skalet men kompenserar detta med skaltillväxt från insidan, vilket medför att den kan fortleva. I skogsindustrirecipienter och vid laboratorieförsök med blekeriavlopp sker ingen kompensation med skaltillväxt varför erosionen resulterar i ett hål i skalet intill mjukdelarna, med följd att musslan dör. I kustrecipienter där dessa arter förekommer naturligt rekommenderas därför att man kontrollerar om det finns missbildningar hos vitmärla och östersjömussla.

Övergång från elementär klor till klordioxid i massablekerierna kan orsaka höjda utsläpp av klorat, i all synnerhet om avloppsvattnet inte behandlas i en extern reningsanläggning med reducerande miljö. Klorat har hög giftverkan på växter, särskilt brunalger, och allvarliga effekter på blåstång utanför blekerier har konstaterats. Särskild bevakning av den fastsittande vegetationen rekommenderas därför i kustrecipienter där effekter av klorat på brunalger befaras.

Utsläpp av tungmetaller från skogsindustrin har uppmärksammats den senaste tiden. För att belysa belastningssituationen i biota bör den fisk som samlas in analyseras med avseende på metaller i levern. I första hand bör kadmium, bly och koppar bestämmas. Zink regleras effektivt av fisken och är därför mindre lämplig att kontrollera.

## Recipientkontrollens programformer

Dessa Allmänna Råd bygger på principien att ett löpande program, ett *basprogram*, vid behov kompletteras med ett *utvidgat program*.

Undersökningarna i basprogrammet bör utföras relativt ofta. Lämplig frekvens av de undersökningar som föreslås framgår nedan. Mätningarna bör kunna relateras till motsvarande mätningar på stationer inom regional



---

och nationell övervakning, bl.a. för att kunna erhålla referensinformation. Undersökningarna i basprogrammet föreläggs av tillsynsmyndigheten i kontrollprogrammet, varvid variabler, provtagningsstationer, provtagningsfrekvens, former för utvärdering och rapportering etc. noga ska preciseras.

Syftet med det utvidgade programmet är i första hand att analysera och bredda effektbilden, inte att skapa underlag för beräkning av trender. Det utvidgade programmet utförs därför med lägre frekvens än basprogrammet, lämpligen vart 3:e-5:e år, eventuellt med längre intervall beroende på i vilken mån utsläppsförhållandena motiverar det. Även dessa undersökningar regleras i det löpande kontrollprogrammet. Undersökningar enligt det utvidgade programmet kan också föranledas av exempelvis tillståndsprövning, processförändringar, överutsläpp eller av att resultaten från undersökningarna i basprogrammet indikerar att ytterligare undersökningar eller effektanalyser bör göras. Beslut om undersökningar fattas då av tillsynsmyndigheten vid varje tillfälle. Omvänt kan uppföljning av det utvidgade programmet ske genom mätningar i basprogrammet.

Ett löpande kontrollprogram ska föregås av förundersökningar där recipienten beskrivs med avseende på morfometri, grundläggande biologiska förhållanden och spridning av utsläppta substanser. Vid dessa förundersökningar fastställs läget för de stationer som ska ingå i basprogrammet. Antalet stationer kan normalt vara litet.

Resultatet från förundersökningarna och tidigare undersökningar ska också påverka kontrollprogrammets innehåll och undersökningarnas frekvens.

### **Recipienttyper**

Det är viktigt att varje recipients egenskaper påverkar kontrollens utformning och omfattning. Som exempel kan nämnas att i de kustområden där flertalet skogsindustrier är lokaliserade är miljöerna mycket varierande. Utsläppen kan ske till en öppen och väl ventilerad kust, i en skyddad skärgård, vid en flodmynning, på ost- eller västkust - alla ekologiskt skilda miljöer.

I recipienter där utsläppen på grund av stor vattenomsättning snabbt späds ut, främst i öppna kustområden, kan påverkan vara svår att upptäcka. Recipienten är i dessa fall speciellt svår att definiera och kan, beroende på definitionsgrunder, vara mycket lokal eller utgöras av hela havsområden. I dessa fall bör recipientkontrollen i större utsträckning överföras till övrig miljöövervakning, främst då det regionala programmet. Skyldigheten att kontrollera verkningarna i miljön och att bekosta dessa undersökningar åligger dock fortfarande den som utövar verksamheten.

---

Omfattande mätningar av kemiska och fysikaliska variabler bör generellt sett endast göras i sådana kustrecipienter som är så slutna och skyddade att utbytet med utanförliggande hav eller påverkan från floder inte stör resultaten. I sjöar är situationen vanligen den motsatta, det vill säga att vattenutbytet är så ringa att den lokala påverkan på vattenkvaliteten blir signifikant.

Studier av bottenfauna i recipientkontrollen bör styras dels av förekomsten av ackumulations- eller transportbottnar, det vill säga bottnar med sådana sediment att normal metodik fungerar, dels av om risken för syrebrist beroende på organogen belastning är relevant i recipienten. Om mjukbottnar saknas i närområdet, t.ex. vid flodmynningar och exponerade kuster, är bottenfaunakontroll oftast inte meningsfull. Tvingas man alltför långt ut från utsläppet i sökandet efter lämpliga provtagningslokaler, minskar möjligheten att koppla eventuella förändringar till den lokala källan.

Övervakningen av fisk inriktas i stor utsträckning mot att bevaka toxiska effekter av utsläppen. Stationära arter får därför stor betydelse. Stationära bestånd förekommer dock inte alltid i recipienterna. I rinnande vatten, vid stora flodmynningar och på öppen kust kan man befara att inslaget av migrerande fisk blir så stort att exponeringsbedömningen försvåras. Detta leder till att bland annat biomarkörstudier inte är meningsfulla och att provfisken inte speglar hur beståndens fördelning är kopplad till effekter på andra nivåer. Dessa typer av recipienter är dock ofta viktiga lek- och uppväxtområden för fisk. Rom och nykläckta yngel exponeras då för avloppsvattnet, vilket kan påverka den lokala rekryteringen. I sådana fall bör övervakningen inskränkas främst till studier av rekryteringsutfallet.

Även i övrigt ska de lokala förhållandena tillåtas påverka programmen. Naturligtvis måste även utsläppens storlek och potentiella miljöpåverkan vägas in. Det är således inte meningen att hela de nedan föreslagna programmen ska genomföras vid samtliga anläggningar. Vid små anläggningar kan det vara oskäligt att kräva omfattande och dyra undersökningar, och man bör där främst se till att ett baskontrollprogram genomförs. Det kan i andra fall, mot bakgrund av lokala förhållanden, finnas anledning att komplettera kontrollprogrammet med ytterligare undersökningar.

Den indelning av kontrollprogrammen på olika recipienttyper och tillverkningsprocesser som återfinns nedan ska ses som ett första steg mot en anpassning av kontrollen till olika recipientförhållanden.

---

## **Recipientkontrollens basprogram och utvidgade program**

De olika programmen presenteras i det följande indelade med avseende på olika recipienttyper:

- A. rinnande vatten**
- B. sjöar**
- C. kustområden**

Inom varje recipienttyp återfinns sedan olika program under rubrikerna:

- 1. fysikaliska och kemiska variabler**
- 2. fisk**
- 3. bottenfauna och sediment**
- 4. fastsittande vegetation**

Programmen är sedan uppdelade i tre grupper med hänsyn till olika tillverkningsprocesser:

- I. kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier**
- II. kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier**
  - oblekt kemisk massa**
  - mekanisk massa**
  - fiberskivor**
- III. ointegrerad papperstillverkning**
  - returfiber massa**

Siffrorna inom parentes i de tabeller som följer är hänvisningar till den sida i kapitlet "Utförande" där utförligare förklaringar ges. Metodbeskrivningar finns i eller hänvisas till i bilaga II.

## A1. Rinnande vatten/fysikaliska och kemiska variabler

Basprogrammets frekvens: minst 6 ggr/år

Processtyp	Basprogram*	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Vattenföring Vattentemperatur Konduktivitet pH Alkalinitet Syrgas Grumlighet Suspended material TOC (totalt organiskt kol) COD <sub>Mn</sub> (kemisk syre förbrukning) ** Färg Nitratkväve Totalkväve Totalfosfor	
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Vattenföring Vattentemperatur Konduktivitet pH Alkalinitet Syrgas Grumlighet Suspended material TOC (totalt organiskt kol) COD <sub>Mn</sub> (kemisk syreförbrukning) ** Färg Nitratkväve Totalkväve Totalfosfor	
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa	Vattenföring Vattentemperatur Konduktivitet pH Alkalinitet Syrgas Grumlighet Suspended material TOC (totalt organiskt kol) COD <sub>Mn</sub> , (kemisk syreförbr.) ** Färg Nitratkväve Totalkväve Totalfosfor	

\*Se sid. 17 beträffande diskussion om omfattningen av detta program.

\*\* I framtida miljöövervakning kommer sannolikt endast TOC att föreslås för analys av organiska ämnen om inte särskilda skäl föreligger, t.ex. att redan påbörjade tidsserier med COD finns.

**A2. Rinnande vatten/fisk**  
**Basprogrammets frekvens: Årligen**

Processtyp	Basprogram	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Om stationär fisk finns: Relativ täthet (32)* Åldersfördelning (32)* Sjukdomar (32)* Biokemi/fysiologi (32) Om stationär fisk saknas: Rekrytering (33)*	Om stationär fisk finns: Täthet av larver och årsyngel (33) Biokemi/fysiologi (33) Sjukdomar (34) Histopatologi/patologi (34) Klorfenolära ämnen (som konjugat i galla) Metaller i lever (34)
Grupp II Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier	Om stationär fisk finns: Relativ täthet (32)* Åldersfördelning (32)* Sjukdomar (32)* Biokemi/fysiologi (32) Oblekt kemisk massa Om stationär fisk saknas: Rekrytering (33)*	Om stationär fisk finns: Täthet av larver och års yngel (33) Biokemi/fysiologi (33) Sjukdomar (34) Histopatologi/patologi (34) Harts- och fettsyror Mekanisk massa (som konjugat i galla) Metaller i lever (34)
Fiberskivor Grupp III: Ointegrerad Papperstillverkning Returfiber massa		Artsammansättning (34) Sjukdomar (34) Rekrytering, begränsade insatser (34)

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

\* Sedan påverkansbilden fastställts genom årliga undersökningar kan undersökningsfrekvensen glesas ut, dvs. undersökningarna överförs till det utvidgade programmet. Se sid. 35 för diskussion om programmets omfattning.

---

### A3. Rinnande vatten/bottenfauna och sediment

Basprogrammets frekvens: Årligen

Processtyp	Basprogram	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Abundans (35)	Förekomst av defekter Biomassa (35)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Abundans (35) Biomassa (35)	
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa	Abundans (35) Biomassa (35)	

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

---

#### A4. Rinnande vatten/fastsittande vegetation

<b>Processtyp</b>	<b>Basprogram</b>	<b>Utvidgat program</b>
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier		Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor		Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36)
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa		Artsammansättning (34) Biomassa (36) Täckningsgrad (36)

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

## B1. Sjöar/fysikaliska och kemiska variabler

Basprogrammets frekvens: minst 6 ggr/år

Processtyp	Basprogram*	Utvidgat program
Grupp 1: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Vattentemperatur Siktdjup Konduktivitet pH Alkalinitet Syrgas/svavelväte TOC (totalt organiskt kol) COD <sub>Mf</sub> (kemisk syreförbrukning) ** Färg Nitratkväve Totalkväve Totalfosfor Klorofyll a	
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Vattentemperatur Siktdjup Konduktivitet pH Alkalinitet Syrgas/svavelväte TOC (totalt organiskt kol) COD <sub>Mn</sub> (kemisk syreförbrukning) ** Färg Nitratkväve Totalkväve Totalfosfor Klorofyll a	
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfibermassa	Vattentemperatur Siktdjup Konduktivitet pH Alkalinitet Syrgas/svavelväte TOC (totalt organiskt kol) COD <sub>Mf</sub> (kemisk syreförbrukning) ** Färg Nitratkväve Totalkväve Totalfosfor Klorofyll a	

\* Se sid. 17 beträffande diskussion om omfattningen av detta program.

\*\* I framtida miljöövervakning kommer sannolikt endast TOC att föreslås för analys av organiska ämnen om inte särskilda skäl föreligger, t.ex. att redan påbörjade tidsserier med COD finns.



## B2. Sjöar/fisk

### Basprogrammets frekvens: Årligen

Processtyp	Basprogram	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Relativ täthet (32)* Åldersfördelning (32)* Sjukdomar (32)* Biokemi/fysiologi (32)	Täthet av larver och årsyngel (33) Biokemi/fysiologi (33) Sjukdomar (34) Histopatologi/patologi (34) Klorfenolära ämnen (som konjugat i galla) Metaller i lever (34)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Relativ täthet (32)* Åldersfördelning (32)* Sjukdomar (32)* Biokemi/fysiologi (32)	Täthet av larver och årsyngel (33) Biokemi/fysiologi (33) Sjukdomar (34) Histopatologi/patologi (34) Harts- och fettsyror (som konjugat i galla) Metaller i lever (34)
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa		Artsammansättning (34) Sjukdomar (34) Rekrytering, begränsade insatser (34)

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

\* Sedan påverkansbilden fastställts genom årliga undersökningar kan undersökningsfrekvensen glesas ut, dvs. undersökningarna överförs till det utvidgade programmet. Se sid. 35 för diskussion om programmet omfattning.

### B3. Sjöar/bottenfauna och sediment

Basprogrammets frekvens: Årligen

Processtyp	Basprogram	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier påverkansområde: EOCI/EOX, klorguajakoler, klorkatekoler och klorveratroler i sediment (35)	Abundans (35) Biomassa (35) Sedimentkvalitet (35)	Förekomst av defekter Metaller i sediment Kartläggning av
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Abundans (35) Biomassa (35) Sedimentkvalitet (35)	Metaller i sediment Kartläggning av påverkansområde: harts- och fettsyror i sediment (35)
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa	Abundans (35) Biomassa (35) Sedimentkvalitet (35)	Metaller i sediment

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

---

#### B4. Sjöar/fastsittande vegetation

<b>Processtyp</b>	<b>Basprogram</b>	<b>Utvidgat program</b>
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier		Djuputbredning (36) Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor		Djuputbredning (36) Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36)
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa		Djuputbredning (36) Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36)

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

## C1. Kustområdenfysikaliska och kemiska variabler

Basprogrammets frekvens: minst 6 ggr/år

Processtyp	Basprogram*	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Vattentemperatur Siktdjup Salinitet Syrgas/svavelväte TOC (totalt organiskt kol) Nitratkväve Totalkväve Fosfatfosfor Totalfosfor Klorofyll a	
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Vattentemperatur Siktdjup Salinitet Syrgasisvavelväte TOC (totalt organiskt kol) Nitratkväve Totalkväve Fosfatfosfor Totalfosfor Klorofyll a	
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfibermassa	Vattentemperatur Siktdjup Salinitet Syrgas/svavelväte TOC (totalt organiskt kol) Nitratkväve Totalkväve Fosfatfosfor Totalfosfor Klorofyll a	

\* Se sid. 17 beträffande diskussion om omfattningen av detta program.

## C2. Kustområden/fisk

### Basprogrammets frekvens: Årligen

Processtyp	Basprogram	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Om stationär fisk finns: Relativ täthet (32)* Åldersfördelning (32)* Sjukdomar (32)* Biokemi/fysiologi (32) Om stationär fisk saknas: Rekrytering (33)*	Om stationär fisk finns: Täthet av larver och årsyngel (33) Biokemi/fysiologi (33) Sjukdomar (34) Histopatologi/patologi (34) Klorfenolära ämnen (som konjugat i galla) Metaller i lever (34)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Om stationär fisk finns: Relativ täthet (32)* Åldersfördelning (32)* Sjukdomar (32)* Biokemi/fysiologi (32) Om stationär fisk saknas: Rekrytering (33)*	Om stationär fisk finns: Täthet av larver och årsyngel (33) Biokemi/fysiologi (33) Sjukdomar (34) Histopatologi/patologi (34) Harts- och fettsyror (som konjugat i galla) Metaller i lever (34)
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa		Artsammansättning (34) Sjukdomar (34) Rekrytering, begränsade insatser (34)

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

\* Sedan påverkansbilden fastställts genom årliga undersökningar kan undersökningsfrekvensen glesas ut, dvs. undersökningarna överförs till det utvidgade programmet. Se sid. 35 för diskussion om programmets omfattning.

### C3. Kustområden/bottenfauna och sediment

Basprogrammets frekvens: Årligen

<b>Processtyp</b>	<b>Basprogram</b>	<b>Utvidgat program</b>
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier	Abundans (35) Biomassa (35) Populationsstruktur (35) Defekter på östersjö- mussla (35) Sedimentkvalitet (35)	Defekter på vitmärla(35) Metaller i sediment Kartläggning av påverkansområde: EOCI/EOX, klorguajakoler, klorkatekoler och klorveratroler i sediment (35)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor	Abundans (35) Biomassa (35) Populationsstruktur ( 35) Sedimentkvalitet (35)	Metaller i sediment Kartläggning av påverkansområde: harts-och fettsyror i sediment (35)
Grupp III: Ointegrerad papperstillverkning Returfiber massa	Abundans (35) Biomassa ( 35) Populationsstruktur (35) Sedimentkvalitet (35)	Metaller i sediment

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

#### C4. Kustområden/fastsittande vegetation

Processtyp	Basprogram	Utvidgat program
Grupp I: Kemisk massa, blekning med klorhaltiga kemikalier		Kartering av brunalger Djuputbredning (36) Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36) Kväve, fosfor och TOC (totalt organiskt kol) i alger (36) Tillväxt hos blåstång (36)
Grupp II: Kemisk massa, blekning utan klorhaltiga kemikalier Oblekt kemisk massa Mekanisk massa Fiberskivor		Djuputbredning (36) Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36) Kväve, fosfor och TOC (totalt organiskt kol) i alger (36)
Grupp III: Ointegrerad Papperstillverkning Returfiber massa		Djuputbredning (36) Artsammansättning (36) Biomassa (36) Täckningsgrad (36) Kväve, fosfor och TOC (totalt organiskt kol) i alger (36)

Siffrorna inom parentes hänvisar till den sida där föreslagen undersökning beskrivs.

---

## Utförande

Nedan följer förklaringar till tabellerna i föregående avsnitt. För att föreslagna program ska ge tillförlitliga resultat och vara meningsfulla att utföra måste de metodbeskrivningar som finns i eller hänvisas till i bilaga II följas noggrant. Inte minst gäller detta när jämförelser ska göras med regionala eller nationella referenslokaler.

### Fisk

Den relativa tätheten (fångst/ansträngning) av vuxen fisk bör mätas om det finns stationära bestånd i recipienten, det vill säga bestånd som rekryteras lokalt. Genom att använda standardiserad provfiskemetodik kan man både jämföra lokaler efter en föroreningsgradient och följa hur beståndstäthet och fördelning mellan arter förändras med tiden. Under provfisket fångas vanligen ett stort antal fiskar av flera arter. Förekomsten av yttre, lätt diagnosticerbara *sjukdomar* provfiskefångsterna noteras fortlöpande för samtliga fångade fiskar. Åldersfördelningar, vilka speglar rekryteringen, bör studeras årligen på åtminstone en vanlig art, förslagsvis abborre eller tånglake. Om åldersfördelningarna baseras på tillräckliga stickprov och undersöks årligen, kan de också användas för att beräkna mortalitet, den vid sidan av rekryteringen viktigaste ekologiska variabeln. Tillväxten, som är en viktig ekologisk summavariabel som kan ge utslag på toxiska ämnen, får man på köpet vid åldersbestämningen.

I basprogrammet bör vissa biokemiska/fysiologiska variabler undersökas på stationär fisk. Minst 25 individer insamlas från minst två stationer i recipienten och dessutom tillkommer minst en referensstation i nationell eller regional övervakning. Följande variabler bör bestämmas:

- *längd*
- *kroppsvikt*
- *ålder*
- *tillväxt*
- *kön*
- *könsstadium*
- *gonadvikt*
- *relativ gonadstorlek*
- *levervikt*
- *leversomatiskt index*
- *konditionsfaktor*
- *EROD-aktivitet i lever*

På väst- och sydkusten är tånglake den vanligaste stationära arten. Om denna väljs för undersökningarna bör även yngeltal, yngelöverlevnad och



---

yngeltillväxt mätas. Förekomst av yttre sjukdomar noteras för samtliga individer enligt samma rutiner som vid granskning av provfiskefångster.

Saknas stationär fisk i recipienten undersöks den årliga rekryteringen, t.ex. genom insamlingar av yngel på fasta stationer under hösten.

I det utvidgade programmet har olika reproduktionsstudier, som belyser recipientens betydelse som rekryteringsmiljö, stor betydelse. Insamlingar av yngel på sensommaren med exempelvis sprängteknik rekommenderas. Dessa undersökningar bör ha god geografisk täckning och omfatta tillräckligt många lokaler för att medge en kartering av rekryteringsförhållandena. Om indikationer finns på rekryteringsskada, kan man lämpligen göra trålningar efter nykläckta larver tidigt på säsongen. Rekryteringsstudier kan kopplas till kontroll av föräldrafiskarnas gonadfunktioner för de stationära arterna enligt den beskrivning som ges nedan för de biokemiska/fysiologiska undersökningarna. Har man i basprogrammet eller i det utvidgade programmet dokumenterat störningar i den stationära fiskens rekrytering av sådan omfattning att de inte kan anses marginella, bör man överväga studier av rekrytering även hos sådana migrerande arter som utnyttjar recipienten för lek eller yngeltillväxt. Det är viktigt att betona att fiskprogrammets uppläggning i stor utsträckning bör utgöras av stegvisa undersökningar som ska vara motiverade av effektoobservationer i de mer grundläggande delarna av programmet. Resultat från basprogrammet ska alltså ha stort inflytande på eventuella specialinsatser.

I det utvidgade programmet kan vissa biokemiska/fysiologiska undersökningar göras. Mätningarna bör omfatta följande variabler:

- *längd*
- *kroppsvikt*
- *ålder*
- *tillväxt*
- *kön*
- *könsstadium*
- *gonadvikt*
- *relativ gonadstorlek*
- *levervikt*
- *leversomatiskt index*
- *konditionsfaktor*
- *EROD-aktivitet i lever*
- *hematokrit*
- *antal vita blodceller*
- *joner i plasma*
- *muskelglykogen*

---

Minst 25 individer från minst två stationer i recipienten insamlas och dessutom tillkommer minst en referensstation i nationell eller regional övervakning. Förekomst av yttre sjukdomar, enligt samma rutiner som vid granskning av provfiskefångster, noteras för samtliga individer. Histopatologisk analys av lever utförs på samma individer som analyseras för biokemiska/ fysiologiska förändringar. För att visa könsorganens status görs kompletterande insamlingar, cirka 100 av vardera könet per lokal. Föreligger indikationer på gonadskada kan fekunditet mätas på stickprov ur olika längdgrupper.

Leverns innehåll av tungmetaller bör undersökas i det utvidgade programmet. I första hand bör kadmium, bly och koppar bestämmas.

Om de fiskar som fångas vid basprogrammets provfisken uppvisar yttre sjukdomssymtom, t.ex. fenerosion, kan en fördjupad studie göras i det utvidgade programmet. 100 abborrar insamlas då från varje lokal och förekomsten av såväl akut som läkt fenerosion noteras för samtliga fenor utom ryggen. Genom att studera relationen mellan stjärtfenans längd och kroppslängden genom exempelvis regressionsanalys kan man pröva om avvikelser mellan lokaler eller mellan år är statistiskt signifikanta. Gädda fångas endast undantagsvis i nätprovfisken. Undersökningar av överkäksdeformationer hos denna art bör därför ske genom särskilda insamlingar, lämpligen under lektiden på våren. Minst 50 individer bör ingå i provet. Deformationen analyseras morfometriskt.

I basprogrammet för ointegrerad papperstillverkning och vid tillverkning av returfiber massa föreslås inga årliga undersökningar på fisk, då utsläppens toxiska påverkan på fisk kan anses ringa. En påverkan på fisksamhället, främst uttryckt som en ändrad artsammansättning, kan dock inte uteslutas. Denna effekt kontrolleras lämpligen i det utvidgade programmet eftersom man inte främst avser att bevaka trender i beståndsmått, vilket fordrar årliga insatser. I samband med de provfisken som görs för studier av artsammansättning kontrolleras även förekomst av yttre sjukdomar på samtliga fångade fiskar. I dessa recipienter, där påverkan på rekryteringen sannolikt inte har en toxisk orsak, bör rekryteringsstudier få en mindre omfattning än i övriga recipienter.

Ekologiska och fysiologiska individmått ska i samtliga fall mätas på samma art, lämpligen abborre eller tånglake. Provtagningarna görs på hösten under september/oktober. Hos abborre har könsorganen då nått sådan utveckling att man kan bedöma könsstadier. Tånglakens honor bär ynglen flera månader efter kläckningen. Under hösten når de sådan storlek att man kan bedöma tillväxt och överlevnad.

Fortfarande föreligger stor osäkerhet beträffande moderna tillverknings-

---

processers potentiella miljöpåverkan. Det sker dock en fortlöpande stark utveckling inom branschen i syfte att komma ned till oskadliga utsläppsnivåer. De fiskundersökningar som föreslås i basprogrammet bör därför, sedan påverkansbilden fastställts genom årliga undersökningar, kunna glesas ut i tiden. Detta gäller naturligtvis bara om resultaten från basprogrammets undersökningar inte indikerar att skador på fisk eller fisksamhälle föreligger. Basprogrammet bör dock fortfarande innehålla undersökningar av parametrar som utgör känsliga och tidiga varningssignaler. De biologiska/fysiologiska variabler som då bör ingå, framgår av sidan 32.

### **Bottenfauna och sediment**

I basprogrammet bestäms abundansen (populationstätheten) av olika arter samt de ingående arternas biomassor. I kustrecipienter bör populationsvariabler, t.ex. längd- och åldersfördelningar hos östersjömusslor och vitmärlor, ingå. Provtagningen bör kompletteras med okulär besiktning av sedimenten, helst efter provtagning med propplod, varvid en beskrivning av sedimentkvaliteten görs. Sedimenttyp, färg och ungefärliga djupet hos det oxiderade ytlagret noteras. Vidare analyseras sedimenten med avseende på EOCI/EOX, klorguajakoler, klorcatekoler och klorveratroler eller harts- och fettsyrorförattbestämma påverkansområdets storlek. Undersökningarna i basprogrammet utformas lämpligen så att ett mindre antal stationer undersöks årligen för att erhålla uppgifter om förändringar i tiden, medan andra besöks med längre mellanrum för information om den rumsliga utbredningen.

Defekter mäts som missbildade embryon av vitmärla (*Monoporeia affinis*) samt erosionsskador på skal hos östersjömussla (*Macoma balthica*).

Lämplig tidsperiod för bottenfaunaprovtagning är våren inom två veckor efter islossning, alternativt hösten. Provtagning i havet skall ske samtidigt som PMK eller liknande program genomförs för att säkerställa referensmöjligheter. För att få en uppfattning om överlevnad av östersjömussla bör provtagningar ske även på sensommaren eller hösten, då settlingen är över. Särskilda insamlingar av vitmärlor måste göras i januari/februari, innan honorna släppt ynglen.

Metoderna för provtagning av bottenfauna skiljer sig något mellan sjöar och kust. I limniska system används Ekmanhuggare, medan vanVeenhämtare används på kusten.

---

### **Fastsittande vegetation**

Djuputbredning, artsammansättning, biomassa och täckningsgrad studeras främst för att följa effekter av eutrofiering och av att färgande och grumlande ämnen försämrar ljus klimatet i recipienten. Undersökningarna i kustvatten kan kompletteras med mätningar av halterna av kväve, fosfor och organiskt kol i alger. Tillväxten hos blåstång kan enkelt mätas som ett mått på främst kloratpåverkan. Undersökningar av fastsittande vegetation bör ske under sensommaren.

---

# Rapportering

Efter bearbetning måste resultaten från recipientkontrollen göras tillgängliga. Rapporteringen bör ske på ett enhetligt sätt och rutiner för denna beskrivs nedan.

## **Löpande rapportering**

Den löpande rapporteringen av mätdata bör ske efter varje mättillfälle. Avvikande eller extrema värden bör då särskilt noteras. Förekomst av extrema värden kan orsakas av dels en ovanlig händelse i recipienten, dels analysfel. Båda fallen bör uppmärksammas. Finns fält- eller analysobservationer som helt eller delvis kan förklara de avvikande värdena, bör information om detta finnas i rapporten. Rapportering bör ske till länsstyrelse och huvudman på det medium som dessa önskar.

## **Årsrapport**

Det samlade undersökningsmaterialet redovisas i en årsrapport. Denna kan disponeras på följande sätt:

- 1. Sammanfattning av resultaten som också direkt kan tillgodose ett informationsbehov hos allmänheten.*
- 2. Beskrivning av provtagnings- och analysprogrammet bör ske i enkel form som stöd för den vidare presentationen av data. Stationsnätet bör anges på en karta. Detaljerade uppgifter om programutformningen samt eventuella uppgifter om medverkande parter i kontrollarbetet kan vid behov redovisas i samband med större samlade utvärderingar av datamaterialet.*

- 
3. *Presentation av belastningen från punktkällor i området.*
  4. *Redovisning av några centrala vattenkvalitetsparametrar och biologiska variablers förändring i tid och rum. Detta kan ske i enkla diagram där årsmedelvärden, med aktuella spridningsmått, avsätts mot en tidsskala. En årlig uppdatering bör ske i årsrapporten.*
  5. *Kommentarer till undersökningsresultaten som bör ta fasta på bl.a.:*
    - *Översikt över den aktuella hydrografiska situationen samt jämförelser med tidigare år.*
    - *Jämförelser med bakgrund, referenser, litteratur och andra undersökningar.*
    - *Värdering av i vilken utsträckning den aktuella industrin bidrar till den uppmätta situationen.*
    - *Noteringar om väsentliga förändringar av belastningen på recipienten jämfört med tidigare förhållanden. Detta gäller företrädesvis punktkällor.*
    - *Kommentarer rörande fält- och analysobservationer som kan förklara avvikelser i materialet.*
    - *Synpunkter i övrigt som kan vara till hjälp för länsstyrelse, huvudman och övriga intressenter vid tolkning av materialet.*
  6. *Grunddata i tabellform som separata bilagor.*

Undersökningsmaterialet bör genomgå en större utvärdering med jämna mellanrum. Denna kan göras i samband med presentation av resultat från undersökningar enligt det utvidgade programmet eller vid tillståndsprovning. Under alla förhållanden bör en samlad utvärdering av kontrollresultaten ske åtminstone vart femte år så att tillsynsmyndigheten ges tillfälle att värdera resultaten i relation till föreliggande utsläpp.

Det kan vara naturligt att i anslutning till större utvärderingar revidera kontrollprogrammet om det finns skäl.

### **Miljörapport**

Den som utövar tillståndspliktig miljöfarlig verksamhet är enligt 38b § miljöskyddslagen skyldig att varje år avge en miljörapport till tillsynsmyndigheterna. I miljörapporten ska bland annat resultaten av mätningar, besiktningar och andra undersökningar som genomförts under året redovisas. Resultatet av mät- och kontrollåtgärder i omgivningen ska då

---

redovisas och bör utformas som en sammanfattning av resultaten med kommentarer. Det är framför allt eventuella förändringar jämfört med tidigare som är av intresse. Om årsrapport tidigare har inlämnats till tillsynsmyndigheten görs dessutom en hänvisning till denna med angivande av rapportens titel och rapportdatum.

Mer om miljörapporten finns att läsa i Naturvårdsverkets Allmänna Råd 94:1 "Miljörapport för tillståndspliktiga verksamheter enligt miljöskyddslagen" (som ersätter Allmänna Råd 90:7 "Miljörapport enligt miljöskyddslagen").

---

## Referenser

Naturvårdsverket (1993): Södergren, A. **Bleached pulp mill effluents. Composition, fate and effects in the Baltic Sea** - SNV rapport 4047.

Naturvårdsverket (1991): Södergren, A. **Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluents**. Proceedings Stockholm 19-21 November 1991 - SNV rapport 4031.

Naturvårdsverket (1988): Södergren, A. **Biologiska effekter av blekeriavlopp** - SNV rapport 3498.

Nordiska Ministerrådet (1993): Larsson, A, Sandström, O. **Den nordiska skogsindustrins milj öfrågor. Miljöpåverkan av skogsindustriutsläpp. Sammanfattning av resultat från nordiska undersökningar**. Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter 1993:598.

Owens, j. W. **The hazard assessment of pulp and paper effluents in the aquatic environment: A review**. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 10, pp.1511-1540, (1991).



---

# Definitioner

<b>Abundans</b>	Populationstäthet.
<b>Antropogen</b>	Med ursprung i mänsklig aktivitet.
<b>AOX</b>	Adsorberbar organiskt bunden halogen. En metod att mäta den mängd klor, brom och jod som, främst i vatten, är bunden till organisk substans vilken fastnar på aktivt kol.
<b>Bakgrund</b>	En referensnivå som kan vara ursprungligt tillstånd eller ett tillstånd, förväntat eller uppmätt, i en påverkad recipient.
<b>Bentos</b>	Organismer som lever på eller nära havs- och sjöbotten.
<b>Biokemi</b>	Kemiska reaktioner i levande celler.
<b>Biomarkörer</b>	Histologiska, fysiologiska eller biokemiska förändringar orsakade av xenobiotika (kroppsfrämmande ämnen) på organ-, cell- och/eller subcellulär nivå.
<b>Enzym-induktion</b>	Stimulering av leverns avgiftningssystem.
<b>EOC/VEOX</b>	Extraherbar organisk bunden klor/halogen. En metod att mäta den mängd klor/halogen som är bunden till organisk substans vilken är extraherbar med organiskt lösningsmedel.
<b>EROD</b>	Enzym i leverns avgiftningssystem. 7-etoxyresorufin-O-deetylas.
<b>Eutofiering</b>	Övergödning.
<b>Fekunditet</b>	Förmåga till reproduktion. Antalet avkommor hos en art eller individ.

<b>Fysiologi</b>	Läran om organismernas livsfunktioner.
<b>Gonad</b>	Ägg- eller rombildande vävnad.
<b>Hematokrit</b>	Andel röda blodceller uttryckt i volymsprocent.
<b>Histologi</b>	Cellvävnadslära.
<b>Hydrografi</b>	Läran om vattnets kretslopp och förekomst i naturen.
<b>Hög- molekylär</b>	Kemiskt ämne med molekylvikt större än 1000 g/mol.
<b>Letal effekt</b>	Verkningar av ett ämnes giftighet som leder till akut död för en organism.
<b>Litoral</b>	Strand-, kust-.
<b>Metabolit</b>	Ämne som deltar i ämnesomsättningen (metabolismen).
<b>Morfologi</b>	Läran om organismernas form och uppbyggnad.
<b>Morfometri</b>	Mätning av strukturer.
<b>Organogen</b>	Av organiskt ursprung.
<b>Patologi</b>	Läran om sjukdomar.
<b>Persistent</b>	Stabil.
<b>Primär- produktion</b>	Nybildning av organisk substans genom fotosyntes.
<b>Påverkan</b>	Förhållandet mellan nuvarande och ursprungligt tillstånd. I en vidare mening förhållandet mellan nuvarande tillstånd och bakgrund.
<b>Recipient</b>	Den (vatten)miljö som tar emot utsläpp.
<b>Referens</b>	Förhållande, relation, jämförelse, norm.
<b>Subletal</b>	Verkningar av ett ämne som inte leder till akut förgiftning eller snabb död.
<b>Toxisk</b>	Giftig.
<b>Ursprungligt tillstånd</b>	Det tillstånd som skulle varit rådande i ett opåverkat naturlandskap, väsentligen som ett resultat av naturlig vittring och med ett naturligt tillskott från atmosfären.

# Metodbeskrivningar

I denna bilaga finns följande metoder beskrivna:	Sidan
<b>Analys av fett- och hartssyror samt klorerade organiska ämnen i sediment och galla</b>	45
Fett- och hartssyror i galla	45
Fett- och hartssyror i sediment	46
EOCI/EOX i sediment	47
Klorfenoler, klorguajakoler, klorkatekoler, kloranisoler och klorveratroler i sediment	48
Klorfenoler i galla från abborre ( <i>Perca fluviatilis</i> )	50
<b>Analys av biokemiska, fysiologiska, och histologiska/morfologiska variabler hos fisk</b>	52
Insamling av undersökningsmaterial	52
EROD-aktivitet i lever	54
Vita blodcells bilden	59
Glykogenhalt i lever och muskel	62
Laktathalt i blod	64
Koncentrationer av joner i blodplasma	65
LSI OCH GSI	67
Leverhistologi	68
Fenerosion	71
Överkäksdeformation (PJD)	73
Referenser	75
<b>Analys av defekter hos bottenfauna</b>	80
Undersökning av missbildade embryon av <i>Monoporeia affinis</i> (Amphipoda, Crustacea)	80
Klassificering av skalskador hos <i>Macoma balthica</i>	83
Referenser	85

För övriga föreslagna undersökningar hänvisas till:

Fiskeriverket (1992): **Handbok för kustundersökningar. Metodbeskrivningar i fiskeribiologi.** Kustrapport 1922:1. Gunnar Thoresson.

Naturvårdsverket (1986): **Metodbeskrivningar, Recipientkontroll Vatten, Del I Undersökningsmetoder för basprogram.** SNV rapport 3108.

Naturvårdsverket (1986): **Metodbeskrivningar, Recipientkontroll Vatten, Del II Undersökningsmetoder för specialprogram.** SNV rapport 3109.

Svensk standard SS 02 8187. **Vattenundersökningar - Bestämning med atomabsorptionsspektrometri - Uppslutning.**

Svensk standard SS 02 8150. **Vattenundersökningar - Metallhalt i vatten, slam och sediment - Bestämning med atomabsorptionsspektrofotometri i flamma - Allmänna principer och regler.**

Svensk standard SS 02 8152. **Vattenundersökningar - Metallhalt i vatten, slam och sediment - Bestämning med atomabsorptionsspektrofotometri i flamma - Speciella anvisningar för bly, järn, kadmium, kobolt, koppar, nickel och zink.**

Svensk standard SS 02 8183. **Vattenundersökningar - Metallhalt i vatten, slam och sediment - Bestämning med flamlös atomabsorptionsspektrometri - Elektrotermisk atomisering i grafitugn - Allmänna principer och regler.**

Svensk standard SS 02 8184. **Vattenundersökningar - Metallhalt i vatten, slam och sediment - Bestämning med flamlös atomabsorptionsspektrometri - Speciella anvisningar för aluminium, bly, järn, kadmium, kobolt, koppar, krom, mangan och nickel.**

## Analys av fett- och hartssyror samt klorerade organiska ämnen i sediment och galla

### Fett- och hartssyror i galla

#### Material

Vattenbad. Lösningssmedel och reagenser av analytisk grad: dietyler, metyl-tert-butyleter, kaliumhydroxid, svavelsyra, kaliumkarbonat, pentafluorbenzylbromid.

#### Provinsamling

Fisk fångas med nät och sumpas två dygn i vatten motsvarande provtagningsplatsen. Fisken svälter och gallblåsan fylls. Gallprov uttages ur gallblåsan med hjälp av en spruta. Förslagsvis poolas fem prover och frystorkas i väntan på analysen.

#### Upparbetning och derivatisering

Lämplig inre standard tillsättes till provet, varefter 2 ml 0,5 M KOH i 90 % etanol tillsättes. Efter två timmar i 70°C tillsättes 3 ml destillerat vatten och provet surgöres med utspädd H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> till pH=2 och extraheras med 3x3 ml dietyler. Eterfaserna koncentreras till en liten volym, 5 ml karbonatbuffert, pH=9, tillsättes och extraheras med 2x4 ml metyl-tert-butyleter. De sammanslagna organfaserna överföres i ett torrt provrör och indunstas till torrhet.

Återstoden löses i 3 ml aceton med eventuell tillsats av lämplig standard. Acetonlösningen koncentreras till 0,5 ml varefter 100 µl pentafluorbenzylbromidlösning (3 % i aceton) och 30 µl 30 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tillsättes i provrör med teflonklätt skruvlock. Röret med påskruvat lock sättes i 60°C vattenbad.

Efter 30 minuter indunstas reaktionsblandningen till torrhet, och återstoden löses i 2 ml isooktan som tvättas med 10 ml neutral buffert i två minuter.

Isooktanfasen är nu redo för bestämning på GC/ECD.

#### GC-analys

Provet (1-2 µl) injiceras splitless på en 25 m x 0,33 mm kvartskapillärkolonn (metylfenylsilikon (BP-5)) med helium som bärgas. Temperaturprogram: 70°C i 0,75 min, höjs snabbt till 210°C, sedan med 2°C/ min till 290°C där den hålls kvar i 15 minuter. Injektortemperatur 250°C och detektortemperatur 300°C.

### Referenser

Lee, H-B, Peart, T.E. and Carron, J.M. (1990). **Gas chromatographic and mass spectrometric determination of some resin and fatty acids in pulp mill effluents as their pentafluorobenzyl ester derivatives.** Journal of Chromatography 498, 367-379.

Oikari, A, Ånäs, E., Kruzynski, G. and Holmbom, B. (1984). **Free and conjugated resin acids in the bile of rainbow trout, Salmo gairdneri.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 33, 233-240.

Sellbom, E. (1990). **Analys av hartssyror med GC-ECD.** Examensarbete på ITMo.

### Fett- och hartssyror i sediment

#### Material

Ponarhämtare, 100 ml centrifugrör med teflonklädd skruvkork, ultraljudsbad, skakbord. Lösningssmedel och reagens av analytisk grad: isopropanol, cyclohexan, svavelsyra, aceton, isooktan, kaliumkarbonat, pentafluorbenzylbromid.

#### Provinsamling

Sedimentprovet tas med Ponarhämtare. Omkring 25 ml vått sediment tas från centrum av provet och överföres omedelbart till ett 100 ml centrifugrör med teflonklädd skruvkork. 25 ml isopropanol tillsättes och provet djupfrysas i väntan på analys.

#### Upparbetning och derivatisering

Provet tinas och 25 ml cyclohexan tillsättes. Provet extraheras i centrifugröret först 10 minuter i ultraljudsbad och sedan två timmar på skakbord. Faserna separeras med hjälp av centrifugering, den organiska fasen avskiljes och extraktionen upprepas på samma sätt med samma mängd lösningssmedel. De sammanslagna organfaserna tvättas med 50 ml vatten som surgjorts med koncentrerad svavelsyra till pH=2.

Den organiska fasen indunstas till torrhet och återstoden löses i 3 ml aceton med eventuell tillsats av lämplig standard. Acetonlösningen koncentreras till 0,5 ml varefter 100 µl pentafluorbenzylbromidlösning (3 % i aceton)

och 30 µl 30 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tillsättes i provrör med teflonklätt skruvlock. Röret med påskruvat lock sättes i 60°C vattenbad.

Efter 30 minuter indunstas reaktionsblandningen till torrhet, och återstoden löses i 2 ml isooktan som tvättas med 10 ml neutral buffert i två minuter. Isooktanfasen är nu redo för bestämning på GC/ECD.

### GC-analys

Provet (1-2 µl) injiceras splitless på en 25 m x 0,33 mm kvartskapillärkolonn (metylfenylsilikon (BP-5)) med helium som bärgas. Temperaturprogram: 70°C i 0,75 min, höjs snabbt till 210°C, sedan med 2°C/ min till 290°C där den hålls kvar i 15 minuter. Injektortemperatur 250°C och detektortemperatur 300°C.

### Referenser

Lee, H-B, Peart, T.E. and Carron, J.M. (1990). **Gas chromatographic and mass spectrometric determination of some resin and fatty acids in pulpmill effluents as their pentafluorobenzyl ester derivatives.** Journal of Chromatography 498, 367-379.

Remberger, M., Hynning, P-Å, Neilson, A.H. (1990). **Gas chromatographic analysis and gas chromatographic-mass spectrometric identification of components in the cyclohexane-extractable fraction from contaminated sediment samples.** Journal of Chromatography 508, 159-178.

Sellbom, E. (1990). **Analys av hartssyror med GC-ECD.** Examensarbete på ITMo.

## EOCI/EOX i sediment

### Material

Ponarhämtare, 100 ml centrifugrör med teflonklädd skruvkork, ultraljudsbad, skakbord. Lösningsmedel och reagens av analytisk grad: isopropanol, cyclohexan, svavelsyra.

### Provinsamling

Sedimentprovet tas med Ponarhämtare. Omkring 25 ml vått sediment tas från centrum av provet och överföres omedelbart till ett 100 ml centrifugrör

med teflonklädd skruvkork. 25 ml isopropanol tillsättes och provet djupfrysas i väntan på analys.

### Upparbetning

Provet tinas och 25 ml cyclohexan tillsättes. Provet extraheras i centrifugröret först 10 minuter i ultraljudsbad och sedan två timmar på skakbord. Faserna separeras med hjälp av centrifugering, den organiska fasen avskiljes och extraktionen upprepas på samma sätt med samma mängd lösningsmedel. De sammanslagna organfaserna tvättas med 50 ml vatten som surgjorts med koncentrerad svavelsyra till pH=2. Den organiska fasen koncentreras till en liten exakt volym och analyseras med neutronaktivering för bestämning av organiskt bunden klor eller mikroculometri för bestämning av organiskt bunden halogen.

### Referenser

Martinsen K. et al (1988). **Methods for determination of sum parameters and characterization of organochlorine compounds in spent bleach liquors from pulp mills and water, sediment and biological samples from receiving waters.** Water Science and Technology 2, 13-24.

## Klorfenoler, klorguajakoler, klorkatekoler, kloranisoler och klorveratroler i sediment

### Material

Ponarhämtare, 100 ml centrifugrör med teflonklädd skruvkork. Lösningssmedel och reagens av analytisk grad: metanol, hexan, metyltert-butyleter, kaliumhydroxid, kopparsulfat, kaliumkarbonat, svavelsyra, askorbinsyra, ättiksyraanhydrid samt lämpliga inre standarder.

### Provinsamling

Sedimentprovet tas med Ponarhämtare. Omkring 25 ml vått sediment tas från centrum av provet och överföres omedelbart till ett 100 ml centrifugrör med teflonklädd skruvkork. Proverna djupfrysas i väntan på analys.



## Upparbetning

Provet tinas och 10 ml metanol, 6 ml 10 M KOH och 2 ml 1,14 M askorbinsyra tillsättes. Blandningen skakas 45 minuter och centrifugeras därefter. Vätskefasen avskiljes och sedimentet extraheras därefter ytterligare två gånger med 10+6 ml 10 M KOH. Till de sammanslagna alkaliska vattenfaserna tillsättes 10 ml vatten och 0,4 ml 1M CuSO<sub>4</sub> och blandningen extraheras i 10 minuter med 6 ml hexan:metylt-butyleter (2:1) innehållande lämplig inre standard. Faserna separeras med hjälp av centrifugering, vattenfasen extraheras ytterligare med 6 ml lösningsmedel utan inre standard. De sammanslagna organfaserna torkas (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) och analyseras med GC/ECD med avseende på klorerade anisolier/veratroler.

Den alkaliska vattenlösningen surgöres i isbad med 2 ml koncentrerad H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> varefter den extraheras i 10 min. med 6 ml hexan:metyl-t-butyleter (2:1) innehållande lämplig inre standard. Faserna separeras med hjälp av centrifugering och vattenlösningen extraheras ytterligare med 6 ml lösningsmedel utan inre standard.

I de sammanslagna organfaserna acetyleras de fenolära substanserna exempelvis enligt nedan.

De sammanslagna organfaserna indrives försiktigt till ca 2 ml och överföres till ett 12 ml provrör med teflonklädd skruvkork, varefter 6 ml 0,1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> några korn askorbinsyra och 100 µl ättiksyraanhydrid tillsättes under omedelbar omskakning kraftigt i 3 min (inte mer än 3-4 rör åt gången). Den organiska fasen analyseras med GC/ECD med avseende på acetylerade klorfenolära substanser.

## GC-analys

Provet (1-2 µl) injiceras splitless på en gaskromatograf med ECD-detektor. Kolonnen var en 25 m x 0,2 mm kvartskapillärkolonn (metylfenylsilikon (BP-5).) Temperaturprogram: 80°C i en minut, höjs snabbt till 120°C, sedan med 3°C/minut till 180°C, följt av en ökning på 10 °C/minut till 280°C som hålls i fem minuter.

## Referenser

Remberger M. et al (1986). **Biotransformation of Chloroguaiacols, Chlorocatechols, and Chloroveratrols in Sediments.** Applied and Environmental Microbiology 51(3), 552-558.

Renberg L. och Lindström K: (1981). **C<sub>18</sub> reversed-phase trace enrichment of chlorinated phenols, guaiacols and catechols in water.** Journal of Chromatography 214, 327-334.

## Klorfenoler i galla från abborre (*Perca fluviatilis*)

### Material

Vattenbad med termostat. Pyrexrör (8ml) och skruvlock med tefloninsida, glasvials 1-2 ml.

Lösningsmedel och reagens av analytisk grad. Saltsyra, hexan, metyl-t-butyleter, natriumbisulfid, kaliumkarbonat, ättiksyraanhydrid, pyridin. 4-brom-2,3,5,6-tetraklorfenol eller annan likvärdig intern standard, referenssubstanser av 4,5,6-triklorguajakol och eventuella andra önskvärda klorfenoler.

### Provinsamling

Fisk mellan 100 och 400 g fångas med nät och sumpas därefter i två dygn i vatten motsvarande provtagningsplatsen. Fisken svälter och gallblåsan fylls. Gallprov uttages ur gallblåsan med hjälp av en spruta och förvaras i vials (1-2 ml) i fryskyl <-20 °C fram till analysen. Gallor från fiskarna kan förslagsvis poolas om fem stycken per vial.

### Upparbetning

Galla (2,5-100 mg) överförs i ett 8 ml pyrexrör med teflonlock. Natriumbisulfidlösning, 0,1 ml (0,2 g/ml) tillsätts för att förhindra oxidation av klorcatekoler. Som intern standard tillsätts 100 mg 4-brom-2,3,5,6-tetraklorfenol (BTCP). Klorfenolerna frigörs från sina konjugat genom hydrolysis med 2,5 ml saltsyra (2,4 M) i kokande vatten under en timme. Efter avsvälning extraheras klorfenolerna över till 1,5 ml hexan:metyl-tert-butyleter (MTBE) under tio minuter (eventuellt med extraktionsapparat) och överförs till ett nytt torrt provrör efter centrifugering. Extraktionen upprepas och extrakten sammanförs. Derivativering görs genom acetylering med 50 ml ättiksyraanhydrid i närvaro av 50 ml pyridin i 60 °C vattenbad under 20 minuter. Extraktet tvättas genom skakning med 2 ml kaliumkarbonatlösning (0,5 M) i 10 minuter för att avlägsna ättiksyraanhydridrester och eventuella fettsyror. Eventuellt kan en tvättning med 2 ml saltsyra (0,01 M) göras för att avlägsna pyridinrester. Extraktet kan därefter injiceras i gaskromatografen.

### GC-analys

Provet (1-2 µl) injiceras split 1:20 på en gaskromatograf med EC-detektor, integrator och eventuellt automatisk injektor. Som kolonn används en halvpolär kvartskapillärkolonn (SPB-5), 30 m x 0,22 mm.

Temperaturprogram: 80°C i 2 minuter, höjs sedan 5°C/minut till 280°C. Injektortemperatur 210°C och detektortemperatur 310°C. Identifiering och kvantifiering görs genom jämförelse med relativa retentionstider och relativa topphöjder hos standardlösningar av referenssubstanser och intern standard.

### Kommentarer

Saltsyrahydrolysen destruerar inte de relativt känsliga klorcatekolerna ens vid förlängd hydrolystid. Jämförelse med enzymatisk hydrolys visar fullständig utvinning av konjugerade klorfenoler och klorcatekoler, till skillnad från tidigare använd alkalisk hydrolys. Tvätt med kaliumkarbonatlösning hydrolyserar inte de acetylerade fenolerna.

### Referenser

Förlin L. and Wachtmeister C.A. (1989) **Fish Bile Analysis for monitoring of Low Concentrations of Polar Xenobiotics in Water**. In Landner L. (Ed.), *Chemicals in the aquatic environment: Advanced hazard assessment*. Springer series on environmental management, Springer-Verlag, Berlin, Chapter 7, pp. 150-164.

Rosemarin A., Notini M., Söderström M., Landner L. and Jensen S. (1990). **Fate and effects of pulp mill chlorophenolic 4,5,6-trichloroguaiacol in a model brackish water ecosystem**. *Sci. Tot. Environ.* 92:69-89.

Söderström M., Wachtmeister C. A., and Förlin L. (1990) **Fish bile as a monitoring instrument for chlorinated phenols and catechols in a recipient outside a pulp mill at the Baltic Sea**. In: *Proceeding of workshop COST 641, Water Pollution Research Report 24*, Gommission of the European Communities, (pp. 120-127).

Söderström M. and Wachtmeister C. A. (1992) **Fish bile as a monitoring instrument for phenolics and other substances related to bleached kraft mill effluent (BKME) and a study of chlorophenolic metabolic transformation products in a periphyton community**. In Södergren A. (Ed.), *Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluents*, Swedish Environmental Protection Agency report 4031, (pp.203-206).

Söderström M., Wachtmeister C. A. and Förlin L. **Analysis of chlorinated guaiacols and phenols in bile of perch (*Perca fluviatilis*) from a pulp mill at the Baltic Sea and an evaluation of a method even covering chlorocatechols**. Manuscript.

## Analys av biokemiska, fysiologiska, och histologiska/morfologiska variabler hos fisk

### Insamling av undersökningsmaterial

#### Fiskart

De viktigaste kraven som måste uppfyllas av den valda fiskarten är stationärt levnadssätt, lättåtkomlig med stort utbredningsområde samt tillräcklig storlek för uttag av prover. På ostkusten och i sötvattenssystem uppfylls dessa krav bäst av abborre (*Perca fluviatilis*) för de biokemiska, fysiologiska, histologiska och vissa delar av de morfologiska variablerna samt för övriga delar av de morfologiska variablerna av gädda (*Esox lucius*). På västkusten analyseras de biokemiska och fysiologiska variablerna på tånglake (*Zoarces viviparus*) (Jacobsson et al. 1992).

#### Provtagningsperiod

Det är väl känt att biologiska variabler kan variera med olika årstider. Denna variation styrs av yttre faktorer som temperatur och ljus och av inre faktorer som könsmognad (se nedan). Denna variation gäller för många hematologiska och biokemiska variabler (Love 1970, Larsson et al. 1985, Larsson et al. 1986) likaväl som för histologiska variabler (Lindesjö 1994). Om en undersökning planeras att utföras endast vid ett tillfälle under året skall den förläggas till hösten (undantaget gädda, se nedan) som, för de här rekommenderade arterna, är perioden för relativ sexuell inaktivitet. Detta för att undvika tidsmässiga och könsmognadsberoende variationer (se nedan). Den lämpligaste provtagningsmånaden är september vilket möjliggör jämförelser med de årliga biokemiska och fysiologiska undersökningarna på abborre och tånglake som sker inom det marina miljöövervakningsprogrammet. Fångst av gädda, för analys av skelettdeformation, förläggs till våren i anslutning till lek då den är betydligt mer lättfångad under denna period jämfört med senare tid på året.

#### Fångstmetod och fiskhantering

Abborre fångas med nät, storlek 18-20 varv, och tånglake med ryssja. Redskapen vittjas efter en natts fiske. Abborren lösgörs varsamt från näten (urklippning är ofta nödvändig) och tånglaken plockas varsamt ut ur

ryssjorna. Fisken överförs därefter direkt till sumpar med släta väggar (ej nätsumpar). Fiskar med synliga fångstskador avlägsnas. Fisken förvaras i sump i anslutning till fångstplatsen under 2-4 dygn för att ges möjlighet till att återhämta sig efter den stress som orsakats av fångsthanteringen (Haux et al. 1985).

Gädda fångas med nät eller ryssja och kan analyseras direkt efter provtagning.

### **Kön, gonadstatus, fiskstorlek och materialstorlek**

Likaväl som med årstid varierar biologiska variabler även med storlek och kön (Love 1970, Larsson et al. 1985, Larsson et al. 1986, Lindesjö 1992). För att undvika storleks- och könsberoende variationer väljs endast, för abborrar, honor med en gonadstorlek större än 1 % av den somatiska vikten. Detta urval exkluderar omogen fisk samt honor som ej kommer att gå till lek den följande våren. För tånglake analyseras honor. För båda arter rekommenderas individer med ett storleksintervall på 20-30 cm vid kustlokaler och för abborre 17-27 cm i sjöar. Denna storlek på fisken är ofta nödvändig för att få ut tillräckligt med material för analys. Observera dock att ett så snävt och likartat storleksintervall som möjligt skall tillämpas på samtliga grupper i en undersökning, för att möjliggöra jämförelser av analysdata mellan olika provtagningslokaler.

Överkäksdeformationen hos gädda har ej visat någon tydlig korrelation till ålder, storlek eller kön (Lindesjö & Thulin 1992). Ett urval med avseende på storlek och kön är därför ej nödvändig.

Fenerosion av abborre har ej visat någon korrelation till ålder, storlek eller kön. Ett urval med avseende på storlek och kön är därför ej nödvändig för denna variabel. Det bör dock här understrykas att en jämförelse mellan gamla och unga individer kan ge svar på om skadan har förekommit under tidigare år.

För samtliga fiskarter analyseras från varje station 20-35 individer. Det högre individantalet bör eftersträvas för parametrar med stor spridning. För analys av fenerosion bör man eftersträva att analysera minst 50 individer per station.

## EROD-aktivitet i lever

### Allmänt

Utsöndringen av fettlösliga organiska gifter från fisk och andra vertebrater påskyndas av ensystem som omvandlar ämnena till vattenlösliga produkter som kan utsöndras. Den första omvandlingen i denna avgiftning är ofta förmedlad av ett enzymssystem som kallas mixed function oxidase (MFO), eller cytochrome P450 monooxygenase system.

Hos fisk återfinns högsta MFO-aktiviteterna i levern. En viktig egenskap hos leverns MFO-system är att det kan induceras när fiskar behandlas med vissa ämnen såsom PCB, TCDD och polyaromatiska kolväten (t.ex. benzpyren) (för review se Gokseyr and Förlin, 1992). Härav följer att induktion av MFO-systemet kan utnyttjas såsom en känslig biologisk parameter hos fisk som lever i vatten där vissa organiska gifter förekommer eller misstänks förekomma (Haux and Förlin, 1988; Stegeman et al., 1992). I utländska undersökningar har man visat att fiskar som lever i oljeförorenade vatten har förhöjda MFO-aktiviteter (Payne et al., 1987). Svenska undersökningar, såväl laboratorie- och fältundersökningar, har visat på mycket kraftigt förhöjda MFO-aktiviteter hos fisk som exponerats för utsläpp från pappersmassaindustrier. Den uppvisar ett graderat svar i pappersmassaindustrirecipienter med högsta aktiviteter nära utsläppskällan. Ökad EROD-aktivitet har också påvisats hos abborre som lever 20-40 km från klorblekerier, vilket tyder på en storskalig och/eller regional påverkan (Balk et al., 1993).

Erfarenhet från egna fältstudier visar att abborre är en lämplig art för studier av MFO-aktivitet. Mätning av MFO-aktivitet kräver välutbildad laboratoriepersonal och är tidskrävande. Etoxyresorufin-O-deetylas aktivitet är den mest använda enzymaktiviteten för att mäta induktion av MFO-systemet i fisklever. O-deetylering av etoxyresorufin (ER) katalyseras av specifika, inducerbara cytochrom P450 (P4501A isoenzym) och resulterar i produktion av resorufin som kan mätas spektrofluorometriskt. Burke and Mayer (1974) beskrev den första metoden för mätning av EROD. Bildningen av resorufin mätes vid excitation svåglängd 535 nm och emission svåglängd 585 nm. En alternativ metod beskrevs av Poul and Fouts (1980). I denna metod stoppas EROD-reaktionen med metanol och provets fluorescence mäts efter centrifugering och filtrering. En spektrofotometrisk metod introducerades av Klotz et al. (1984). I denna metod mäts resorufin kontinuerligt vid 572 nm. Galgani et al. (1991) beskrev en metod där EROD-aktivitet mäts med hjälp av en fluoroscensplattavläsare. Den-

na metod sparar tid jämfört med de andra metoderna men tycks inte vara lika exakt.

### Provtagning och preparering av enzymfraktioner

Nedan beskrivs generellt hur provtagningen av fisklevern bör ske och hur postmitokondriell supernatant (PMS) och mikrosomer från fisklever prepareras. De beskrivna metoderna har i svenska undersökningar tillämpats på regnbåge och abborre. PMS, ibland kallad S-9 fraktionen, är supernatanten som erhålls efter centrifugering av lever homogenat vid 9-12000 x g. Mikrosomerna precipiteras vid 100-150.000 x g centrifugering av PMS. När EROD mäts på PMS rekommenderas att glycerol sätts till som homogeniseringsbuffert.

#### *Reagenser och lösningar*

Homogeniseringsbuffert, pH 7,4:

0,1 M Na-fosfat och 0,15 M KCl. När PMS används för ERODmätning tillsätts 10 % glycerol.

Resuspenderingsbuffert (mikrosombuffert), pH 7,4:

0,1 M Na-fosfat, 0,15 M KCl och 20 % glycerol. Ibland kan det vara nödvändigt att tillsätta 1 mM EDTA och 1 mM DIT för att motverka nedbrytning av enzym.

1. Avliva fisken snabbt. När levern friprepareras avskiljs gallblåsan försiktigt från levern utan att galla spills på levern (galla kan innehålla enzyminhibitorer). Alla procedurer skall ske i kyla (i kylrum eller med buffert, homogenisator och prover kyllda på isbad). Om preparering av PMS och mikrosomer inte kan ske omedelbart fryses och förvaras levern i flytande kväve för senare preparering av enzymfraktioner i laboratoriet.
2. Efter att levern fripreparerats vägs den och läggs i en bägare med homogeniseringsbuffert. Tvätta bort överflödigt blod genom att skölja en eller två gånger i buffert. OBS! Om levern varit fryst, måste den tina innan buffert tillsätts. Tillsätt 4 ml buffert per gram lever. Klipp levern i småbitar och homogenisera i en glas/teflon homogenisator (Potter-Elvehjelm typ).
3. Centrifugera homogenatet i kylcentrifug: 10 000 x g, 20 minuter, +4 °C.
4. För över supernatanten (PMS) med hjälp av pipett (undvik pellet och det flytande fettlagret) till nya centrifugrör och centrifugera i ultracentrifug (höghastighetscentrifug: 105 000 x g, 60 min, +4°C).
5. Efter centrifugering suggs supernatanten (cytosolfraktion) av med pipett.

Om en transparent pellet (glykogen) syns på botten rekommenderas att försiktigt skölja loss mikrosomerna med resuspenderingsbuffert och pasteurpipett.

6. Resuspendera mikrosomerna (105 000 pellet) genom att homogenisera i resuspenderingsbuffert (tillsätt 1 ml per gram lever).

7. Förvara enzymen på is och fortsätt med enzymmätningarna som bör ske inom ett par timmar. Om mätningen sker senare måste mikrosomerna frysas. Frys mikrosomerna i lämpliga mängder i flytande kväve och förvara dem i -80 °C.

### Mätning av EROD-aktivitet

ICES-IOC arrangerade en workshop i Aberdeen, Skottland (4-6 september, 1991) för interkalibrering av EROD metodik. Nedan beskrivs metoden som blev resultat av workshopen. Metoden baseras på Burke and Mayer (1974).

#### *Reagenser och lösningar*

EROD-buffert:

0,1 M Na-fosfat eller Tris buffert, pH 7,0-8,5. pH optimum kan variera mellan olika fiskarter. pH 8,0 är lämpliga för regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*), abborre (*Perca fluviatilis*) och torsk (*Gadus morhua*).

Etoxyresorufin (substrat):

5 µM 7-ethoxyresorufin (ER) löst i DMSO (dimetyl sulfoxid) (en stamlösning kan förvaras i rumstemperatur i en mörk flaska). Extinktionskoefficienten för ER är 22,5 cm<sup>2</sup>/mmol (Prough et al., 1978). Den exakta koncentrationen av ER kalkyleras enligt formeln:  
Substratkoncentration (nmol/ml =  $A_{482} \text{ nm} \times 1000 \times (1 \times 22,5)^{-1}$ ). Späd substratlösningen till 5 nmol/ ml.

NADPH

10 mM NADPH. Lös 8,3 mg NADPH i 1 ml destillerat vatten. Lösningen kan sparas i kylskåp i två veckor.

Resorufin (produkt):

0,25 nmol resorufin i DMSO. Stamlösning kan sparas i rumstemperatur i mörk flaska.

#### *Enzymfraktioner*

Postmitokondriell supernatant (PMS) eller mikrosom fraktion, se tidigare beskrivning.



### *Tillbehör*

Spektrofluorometer med skrivare. Kyvetter. Mätningen bör ske vid kontrollerad temperatur (20 °C) helst under omrörning.

### *Standarder*

Kalibrering görs med intern eller extern resorufinstandard. Rhodamin B kan användas som extern standard.

Resorufinstandard:

Extinktionskoefficienten för resorufin varierar från 20,1 (Burke och Mayer, 1974), 40,0 (Prough et al., 1978) till 73,2  $\text{mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ . Låg renhet hos kommersiellt resorufin gör att det är nödvändigt att kontrollera koncentrationen på standarden: Standard konc. (nmol/ml) =  $A_{572} \text{ nm} \times 1000 \times (1 \times 73,2)^{-1}$ .

Rhodamin B-standard:

Stamlösning: 8 mM Rhodamin B. Blanda 0,38 mg Rhodamin B med 10 ml destillerat vatten under omrörning.

Standard lösning:

A. Blanda 1 ml stamlösning och 9 ml destillerat vatten.

B. Blanda 1 ml standardlösning A och 9 ml destillerat vatten.

C. Blanda 1 ml standardlösning B och 9 ml destillerat vatten. Alla lösningar kan förvaras i mörka flaskor i kylskåp.

Standardlösning 0,8 nmol Rhodamin B:

Blanda 10  $\mu\text{l}$  standard B i 1990  $\mu\text{l}$  EROD buffert. Blanda 100  $\mu\text{l}$  standard C i 1900  $\mu\text{l}$  EROD buffert. Mät fluorescensen och beräkna det exakta värdet. Observera att Rhodamin B har 3 gånger högre fluorescens än resorufin. Rhodamin B-standard är mer stabil än resorufinstandard, och kan användas som standard för resorufinstandard. Båda standarderna bör jämföras åtminstone 2-3 gånger årligen.

### *Analysförfarande*

I en total volym av 2 ml:

1960  $\mu\text{l}$  EROD buffert

10  $\mu\text{l}$  substrat (7-etoxyresorufin, ER)

20  $\mu\text{l}$  PMS eller mikrosomer

10  $\mu\text{l}$  NADPH

Två eller tre replikat rekommenderas för varje prov. En intern resorufinstandard bör sättas till varje prov.

1. Blanda 1960 µl EROD buffert och 10 µl ER och 20 µl PMS/ mikrosomer i en kyvett. Om omrörning eller skakning i fluorescensspektrofotometern inte finns är det väsentligt att blanda väl innan kyvetten sätts in i apparaten.
2. Tillsätt 10 µl NADPH för att starta reaktionen. Blanda väl.
3. Ställ in excitations- och emissionsmonokromatorerna till respektive 535 och 585 nm. Hastigheten för resorufinproduktion mäts under 2-3 minuter. Avläs ändringen i fluorescens.
4. Lämna skrivaren på och tillsätt 10 µl resorufin standard till kyvetten. Avläs ökningen i fluorescens.
5. Om låg EROD aktivitet erhålls öka mängden prov till 50-100 µl och minska volymen buffert i motsvarande grad.
6. Proteininnehåll i vävnadsprovet måste mätas. Bradford- eller Lowry-metoden rekommenderas med BSA (bovine serum albumin) som standard (Bradford 1976, Lowry et al. 1951).
7. Använd den linjära förändringen av fluorescensen, kalkylera EROD aktiviteten. Resorufinstandard som mätts i varje prov inkluderas i beräkningarna. Höga proteinkoncentrationer i provet quenchar fluorescensen.

Enzymaktivitet (nmol x (minut x mg protein)<sup>-1</sup>) beräknas enligt formeln:

$$\text{EROD aktivitet} = \text{FP} \times \text{RS} \times 1 \times 5 (\text{minut} \times \text{FR} \times \text{mg protein/ ml})^{-1}$$

FP = Fluorescens i provet

RS = Resorufinstandard (nmol) S = Spädning (1000/20)

FR = Fluorescens av resorufinstandard.

## Vita blodcells bilden

### Allmänt

Det finns hos fisk, liksom hos högre evertebrater, flera olika typer av vita blodceller. De som är av störst intresse är lymfocyter, neutrofila granulocyter och spolförmiga celler ("trombocyter"). Lymfocyter är engagerade i det immunologiska försvaret genom att de deltar i organismens avvärjningsreaktioner som bildare och bärare av antikroppar. Neutrofila granulocyter är inblandade i organismens reaktion på bakteriella infektioner och på främmande kroppar i vävnaderna. Denna typ av vita blodceller kan "äta" bakterier och andra främmande partiklar genom s.k. fagocytos, och de ansamlas i stora mängder kring lokala härdar av infektioner och skador. "Trombocyterna" anses spela en viktig roll i blodets koagulationsprocesser.

Hematologiska metoder har använts för att belägga subletala fysiologiska effekter av miljögifter och har fördelen av att kunna registrera sjukliga förändringar innan synliga skador har uppstått. Olika stressfaktorer, t.ex. vissa miljögifter, kan nedsätta infektionsresistensen hos fisk (Ellis 1981; Wedemeyer och McLeay 1981). Studier av vita blodcells bilden är härvid en relativt enkel metodik för att avslöja förändringar i fiskarnas immunförsvar.

Vid infektioner eller cellnekrosor fås en ökning av antalet neutrofila granulocyter och lymfocyter. Stress medför oftast en markant minskning av antalet cirkulerande lymfocyter, vilket resulterar i försämrat immunförsvar (Ellis 1981; Larsson et al. 1985).

Tydliga förändringar av vita blodcells bilden har konstaterats hos fiskar som exponerats för utsläpp från pappersmassaindustri i laboratorier och i undersökningar under fältförhållanden (Andersson et al. 1988), samt hos fiskar som lever i metallbelastade miljöer (Larsson et al. 1985). Förändringarna i vita blodcellsmönstret följer ofta en gradient med de mest grava förändringarna nära utsläppskällan.

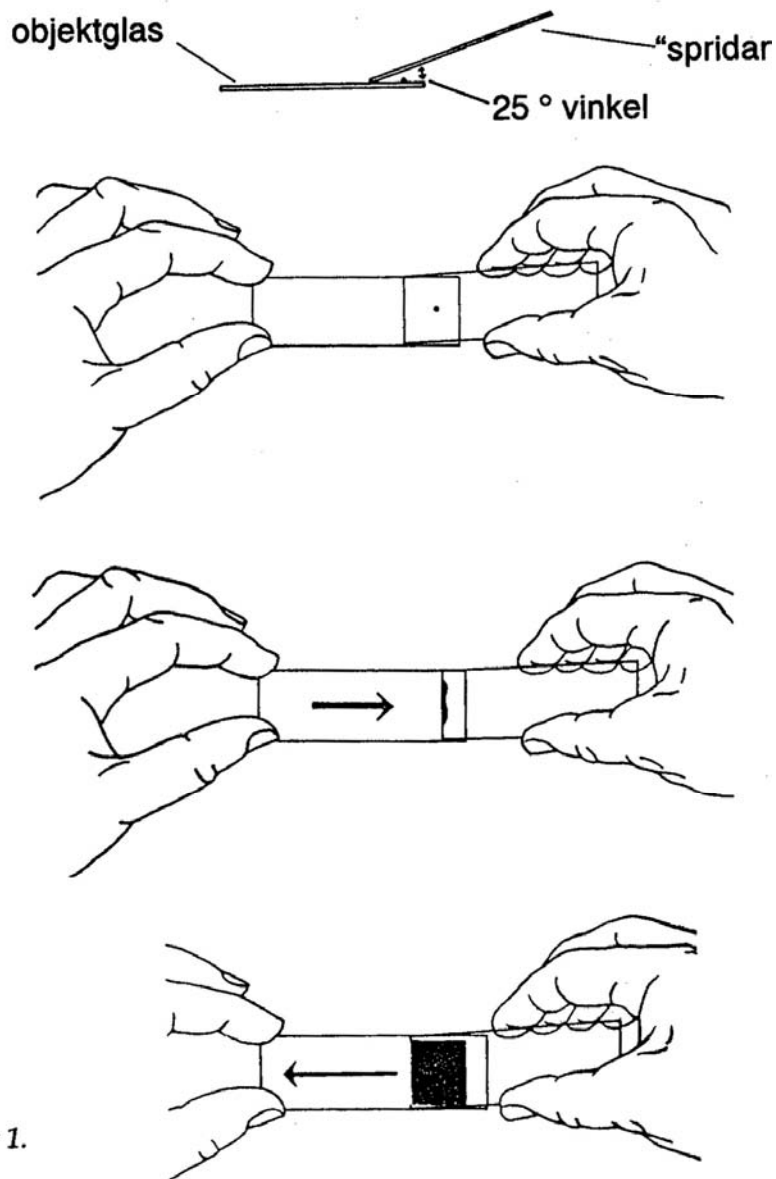
Erfarenheter från fältstudier visar att abborre är en lämplig art och att störningar i vita blodcells bilden kan uppvisa årstidsvariationer (Larsson et al. 1985). Analyserna är av rutinkaraktär, men kräver hematologisk utrustning och utbildad personal.

### Provtagning och analysförfarande

1. Objektglas för blodutstryk rengörs först med tvättning i varmt vatten och diskmedel. Därefter sköljs glaset ordentligt i varmt vatten med efterföljande sköljning i destillerat vatten och slutligen doppas glaset upprepade gånger i 70 % alkohol. Torka därefter glaset i värmeskap.

2. Blodprov tas i direkt anslutning till sumpningsplatsen. Fisken håvas snabbt ur sumpen och bedövas med ett slag i huvudet. Blod tappas ur kaudala blodkärl med hepariniserad kanyl och spruta. Blodprovet bör tas inom 30-60 sekunder. 0,1-0,2 ml helblod är tillräckligt för en standardundersökning av vita blodcellbilden.

3. Tag av kanylen och placera en minimal blodsdroppe på ett rengjort objektglas enligt punkt 1 direkt ifrån sprutan. Sprid ut blodsdroppen på objektglaset enligt figur 1. Det är viktigt att hålla glaset i 25° vinkel och dra jämnt och lugnt. Tryck inte för hårt och skjut inte blodet framför "spridaren", om man gör det kan man förstöra cellerna.



Figur 1.

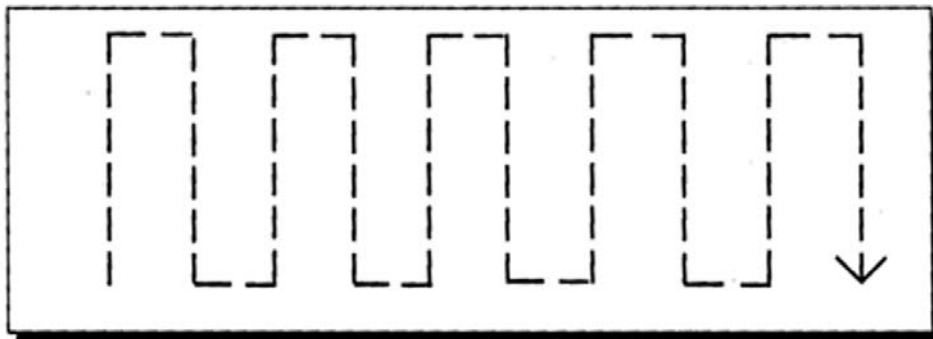
## 4. Färga blodutstryket enligt följande (Pappenheim):

Observera att metoden kräver färgning direkt efter provtagning.

- a) Fixera utstryken i 70 %-ig etanol i 15 minuter
- b) Förfärga i May Grunewald-lösning (koncentrerad) 5 minuter
- c) Skölj i destillerat H<sub>2</sub>O
- d) Torka i 15 minuter
- e) Färga med Giemsalösning (1,5 ml Giemsa + 50 ml 0,01M fosfatbuffert pH=6,9) i 15-20 minuter
- f) Skölj i destillerat H<sub>2</sub>O
- g) Låt torka
- h) Montera
- i) Resultat:
 

lymfocytplasma	- blå eller purpurröda
trombocyter	- blå med rödviolett centrum
granulocyter	
eosinofila	- rödaktiga
basofila	- blå
neutrofila	- rödvioletta
erythrocyter	- röd-rosa med blå kärna

5. Räkna blodcellerna under mikroskop. Objektivet flyttas som i figur 2 under räkning. Räkna 500 erythrocyter och antalet vita blodceller inom detta område.



Figur 2.

## Glykogenhalt i lever och muskel

### Allmänt

Den mest studerade stresseffekten hos fisk är den typiska ökningen av blodglukos och blodlaktat (mjölksyra) och minskningen av glykogendepåer i lever och muskel. Dessa är sekundära effekter och resultatet av en ökad utsöndring av hormoner från hypofysen, binjurevävnad (interrenal och kromaffin vävnad) och en ökad nervös aktivitet (Mazeaud och Mazeaud 1981).

Många miljögifter kan också påverka metabolismen av kolhydrater på annat sätt än via sekundär stress. Tydliga öknings av glykogennivåer i muskel och lever har t.ex. konstaterats hos fiskar som exponerats för utsläpp från pappersmassaindustrier (Andersson et al. 1988). Ökningen av glykogennivåerna har ofta visat ett graderat svar med största ökningen nära utsläppskällan. Prövningen av metodiken som skett inom Miljö/ Cellulosa I-projektet visar att exponering av fisk för utsläpp från pappersmassaindustri ger tydliga effekter oavsett årstid. Även kadmium och bly har i fält- och laboratoriestudier visats ge störd kolhydratomsättning (Haux och Larsson 1984, Larsson et al. 1985).

Erfarenheter från fältstudier visar att abborre är en lämplig art och att störningar i glykogennivåer uppträder under olika årstider. Mätning av lever- och muskelglykogen är relativt enkelt, men tidskrävande. Muskel-/leverglykogenet mäts enligt en metod beskriven av Van Handel 1965. Metoden innefattar en omvandling av glykogen genom ett antal steg till glukos som mäts med enzymatisk metodik. Metoden kräver tillgång till spektrofotometer och utbildad laboratoriepersonal.

### Provtagning och analysförfarande

1. Avliva djuret och dissekera omedelbart fram de vävnadsbitar som skall användas. Frys bitarna omgående i flytande kväve för senare preparering på laboratoriet.
2. Väg objektet (lever ca 0,1 g, muskel ca 0,5 g) och lägg det i ett rör med 2 ml 30 % KOH. Koka med återlopp i tio minuter.
3. Sätt till 4 ml 95 %-ig etanol för att fälla glykogenet, och 0,2 ml av mättad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  som medprecipitant. Kyl i isbad.
4. Återupphetta i vattenbad tills det kokar, kyl sedan på is omedelbart. Observera att kokningen går snabbt, risk för stötkokning!
5. Centrifugera 30 minuter, 5000 varv/min med kylcentrifug. Släng bort

supernatanten försiktigt och tvätta precipitatet med 1 ml 95 %-ig etanol.

6. Centrifugera igen, häll bort supernatanten, vänd på röret och låt dem torka över natt i kylskåp.

7. Lägg i några små glaspärlor och hydrolysera med 3 ml 1,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> under 2,5 timmar i kokande vattenbad.

8. Neutralisera samtliga rör med 3,1 ml 3M NaOH och späd till 10 ml med destillerat H<sub>2</sub>O.

9. Fem glykogenstandarder med koncentrationerna 0,25, 0,40, 0,50, 0,75 och 1,0 ml hydrolyseras, neutraliseras och späds på samma sätt som proverna.

10. Av extrakten uttages:

- 0,5 ml muskelextrakt
- 0,1 ml leverextrakt + 0,4 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 0,5 ml standardextrakt
- 0,5 ml 0,33M PCA som blank

Därefter tillsätts 2 ml reagenslösning (MERK 14143, MERK 14144). Avläs efter 15 minuter vid 500 nm.

Uträkningar

Glykogenhalt =  $\frac{\text{avläst värde på standardkurva} \times \text{spädning (muskel} = \times 1, \text{ lever} = \times 5)}{\text{vikt (i gram)} \times 10}$

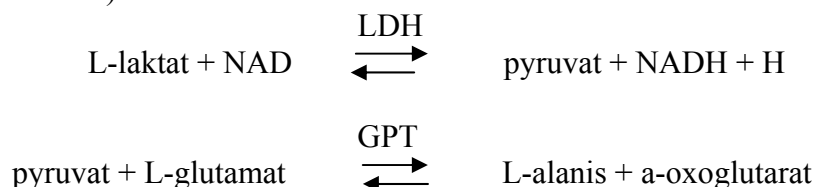
Enhet: mg glykogen/100 mg våtvikt.

## Laktathalt i blod

### Allmänt

Se "Glykogenbestämning i lever och muskel".

Testprincipen utgår från en kopplad reaktion där laktat i första steget omvandlas av laktatdehydrogenas (LDH) till pyruvat, som i sin tur omvandlas av GPT till L-alanine som kan ses spektrofotometriskt vid 366 nm (Noll 1974).



### Provtagning och utförande

Till analyserna kan laktatsats från Boehringer Mannheim användas:

1. NAD: 4,6 mM
2. Carbonate-buffert: 0,5 M, pH=10,0; L-glutamat=63 mM
3. Suspension 3: LDH 1632 U/ ml; GPT 102 U/ ml
4. Solution 4: ammoniumsulfat=3,2 M

Reagenslösning blandas av **1.** och **2.** enligt recept från Boehringer Mannheim.

**1.** Blodprov tas i direkt anslutning till sumpningsplatsen. Fisken håvas snabbt ur sumpen och bedövas med ett slag i huvudet. Blod tappas ur kaudala blodkärl med hepariniserad kanyl och spruta. Blodprovret bör tas inom 30-60 sekunder.

**2.** 100 µl helblod sättes till ett eppendorfrör innehållande 500 µl 0,6M perklorsyra (PCA), blanda väl och centrifugera 3 000 varv/min i två minuter.

### 3. Standard

- Blanda 1,0 M laktatstamlösning.

- Gör spädningsserie:

Ta 50 µl och späd med 25 ml 0,6 M PCA. Det ger 18 mg %.

1 ml av 18 mg % spädes med 1 ml PCA ger 9 mg % .

1 ml av 9 mg % spädes med 1 ml PCA ger 4,5 mg % .



- Späd standardproverna: 0,1 ml standard + 0,5 ml PCA.

4. Sätt 300 µl av blank (0,6M PCA), standarder och prover till separata provrör. Till blanken tillsätts 50 µl av lösning 4.

5. Sätt 2,5 ml reagenslösning till varje rör. Blanda väl.

6. Sätt 50 µl av lösning 3 till alla rör. Blanda omedelbart och ta tiden från detta ögonblick. Pipettera med 30 sekunders intervall. Avläs mot H<sub>2</sub>O vid 365 nm efter exakt 15 minuter (observera noggrannhet med tidsintervallen).

Uträkningar

$$\text{Laktat i blod} = \frac{18 \times \text{Abs. prov}}{\text{Abs. stand.}}$$

Enhet=mg%.

## Koncentrationer av joner i blodplasma

### Allmänt

En välbalanserad osmo- och jonreglering är av primär betydelse för akvatiska djurs förmåga att leva i ett ofta föränderligt omgivande medium. Benfiskar har väl utvecklade mekanismer för sådan reglering och kan därför hålla koncentrationen av oorganiska joner i sina kroppsvätskor inom mycket snäva ramar. Natrium (Na<sup>+</sup>) och klorid (Cl<sup>-</sup>) är de dominerande jonerna i blodplasma och spelar således en mycket viktig roll när det gäller att bibehålla det osmotiska trycket. Andra joner som står under strikt reglering är kalium (K<sup>+</sup>), kalcium (Ca<sup>2+</sup>) och fosfat (PO<sub>4</sub><sup>3+</sup>). En störd jonreglering torde allvarligt reducera organismens möjligheter att upprätthålla normala livsfunktioner och därmed överleva i naturen (Larsson et al. 1985). En försämrad förmåga att upprätthålla vatten- och jonjämvikt kan vara speciellt bekymmersam för fiskar som lever i kustzoner, där det förekommer mer eller mindre stora fluktuationer i vattnets salthalt, och för fiskarter som migrerar mellan bräckt/ saltvatten och sötvatten, exempelvis abborre och laxfiskar.

Det är känt att flera metaller (Larsson et al. 1985) och klorerade kolväten (Förlin et al. 1979; Haux och Larsson 1979) påverkar jonkoncentrationerna i plasman. Koncentrationen av kalciumjoner minskar t.ex. när fiskar exponeras för kadmium under laboratorieförhållanden (Rock och Maly 1979; Larsson et al. 1981). Dessutom har det visat sig att blekeriavloppsvatten från massaindustrier kan påverka jonbalansen hos fisk, främst kloridregleringen. I fältundersökningar har en graderad sänkning med

störst sänkning nära utsläppskällan, av kloridkoncentrationen konstaterats (Andersson et al. 1988).

Erfarenheter från fältstudier visar att abborre är en lämplig art och att störningar av jonbalansen uppträder under olika årstider. Analyserna är av rutinkaraktär, men kräver tillgång till konventionell jonbestämningsutrustning och utbildad laboratoriepersonal.

### **Provtagning**

1. Blodprov tas i direkt anslutning till sumpningsplatsen. Fisken håvas snabbt ur sumpen och bedövas med ett slag i huvudet. Blod tappas ur kaudala blodkärl med hepariniserad kanyl och spruta. 0,4-0,5 ml helblod behövs för en standardundersökning av jonbalansen. Blodprovet bör tas inom 30-60 sekunder från det att fisken håvas upp ur sumpen.

2. Blodet centrifugeras 10 000-15 000 varv/minut i 2-3 minuter så att blodkropparna centrifugeras ned och blodplasman blir kvar som en klar supernatant. Erhållen blodplasma (ca 0,3 ml behövs) djupfrysas på kolsyreis för senare jonbestämning på laboratoriet.

OBS! Oorganiska joner kan frigöras från glasmaterial. Använd därför alltid plastflaskor till lösningar som skall förvaras en tid.

### **Analysförfarande**

#### *Kloridkoncentration*

1. Halter av klorid mäts med coulometrisk titrering. Standarder med kända kloridhalter, plus speciella buffrar köps färdiga (t. ex. Radiometer, Köpenhamn). Standarderna används för att kalibrera kloridtitrator.

2. Det är viktigt att kloridtitratorn kalibreras. Av kloridstandard (100 mM) sätts 20 µl till kloridtitrator. Upprepa detta 5-10 gånger tills titratorn visar stabilt värde.

3. Sätt till proverna (20 µl blodplasma) och läs av.

#### *Natrium och kalium*

1. Gör 15 mM litium-lösning (0,636 g LiCl/l ger 15 mM LiCl).

2. Tag 30 µl plasma och späd med 6 ml litium-lösning.

3. Mät på flamfotometer mot Na-standard=140mEq/l och K-standard=5,0 mEq/l. Standardlösningar spädes på samma sätt som proverna (30 µl + 6 ml LiCl).

### *Kalcium och magnesium*

1. Blanda stamlösning för lantan (1mg/ml - 0,1 %-ig lösning): Tag 58,64 g lantanoxid ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ) och tillsätt 50 ml avjoniserat vatten. Tillsätt sedan långsamt och försiktigt 250 ml koncentrerad HCl. Späd, lika försiktigt, till 1 000 ml med avjoniserat vatten. För att få lösningen 0,1 %-ig spädes slutligen lösningen 50 ggr.
2. Gör standardlösningar: Ca=3 mM och Mg=0,75 mM.
3. Späd standardlösningar och prover 100 ggr med 0,1 %-ig lantanlösning. Slutvolymen på standarden ska vara 20 ml och på proverna 5 ml.
4. Kalibrera atomabsorptionsspektrofotometern: Nollställ med 0,1 %-ig lanthanlösning och korrigera efter standardlösningarna.
5. Mät proverna. Kontrollera standarden efter ungefär vart 10:e prov.

## **LSI OCH GSI**

### **Allmänt**

#### *LSI (Liver Somatiskt Index)*

Fiskar som lever i vattenområden förorenade av organiska substanser (t. ex. blekerirecipienter) uppvisar ofta en förstörd lever (Andersson et al. 1988). Leverförstoring har också observerats hos fiskar som i laboratorieförsök exponerats för klororganiska föreningar (Johansson et al. 1972, Förlin et al. 1979). Förstoring av levern kan vara ett resultat av ökad fettupplagring och/eller stimulerad proteinsyntes i levercellerna. Det är ännu inte klarlagt vilka olika faktorer som orsakar detta, men det är troligen en följd av föroreningsorsakade metaboliska störningar och/eller ökad aktivitet av xenobiotika transformerande enzym.

#### *GSI (Gonad Somatiskt Index)*

Den normala utvecklingen av reproduktionsorganen i fisk beror på kritiska cellulära och molekyllära processer som regleras av hormon och andra faktorer (Bentley 1982). Denna reglering kan påverkas och störas av onormala förhållanden (t.ex. olika typer av föroreningar) i fiskarnas omgivning. Detta kan i sin tur innebära störningar av fiskarnas normala reproduktion. En grov, men tillförlitlig, indikation på störningar i fiskarnas normala reproduktion är storleksförändringar av gonaderna.

Gonadstorleken har t.ex. konstaterats vara mindre på fiskar som levt nära massafabriker i Sverige (Andersson et al. 1988) och på fisk som exponerats på laboratoriet för klororganiska föreningar av typ PCB och DDT (Förlin et al. 1979).

### Provtagning och utförande

1. Avliva djuret och väg det.
2. Preparera ut lever och gonader och väg dem.

Uträkningar

$$\text{LSI} = \frac{\text{levervikt} \times 100}{\text{fiskvikt}}$$

$$\text{GSI} = \frac{\text{gonadvikt} \times 100}{\text{fiskvikt}}$$

Enhet: % av totalvikt

### Leverhistologi

#### Allmänt

Ett samspel råder mellan den mikroskopiska strukturen i fisklever, dvs. leverhistologi, och fysiologiska och biokemiska funktioner. Histologiska, fysiologiska och biokemiska förändringar kan användas som biomarkörer för att påvisa exponering för toxiska ämnen. Levern har en nyckelroll för xenobiotisk metabolism, exkretion, matspjälkning, näringslagring, samt produktionen av guleprotein. Förändringar av leverns histologiska struktur kan därför förväntas under vissa toxiska förhållanden (Hinton & Lauren 1990). Levern är därför ett mycket lämpligt organ för att studera mekanismerna och orsakssambanden mellan subcellulära-, cellulära- och organförändringar orsakade av toxiska ämnen. Leverhistologiska studier bör ej uteslutande grundas på traditionell histopatologisk teknik, som ofta kan medföra svårigheter till en objektiv analys, utan dessa bör dessutom kompletteras med ett stereologiskt/morfometrisk angreppssätt vilket ger möjlighet till kvantifiering av analysdata (flinton, Lanz et al. 1987). Detta möjliggör analys av såväl direkta patologiska förändringar som reversibla förändringar, t.ex. volymförändringar av olika strukturer i parenkymet.

### Provtagning

Efter att fisken bedövats tas levern omedelbart ut. En skiva av högst 1 mm\* tjocklek skärs ut av den centrala delen av levern. Den uttagna vävnadsbiten placeras omedelbart i fixeringslösningen. Observera att volymen av fixeringslösningen skall vara 30 gånger volymen av det fixerade materialet.

Vävnad fixerad i glutaraldehyd fixeras under ett dygn vid 4 °C. Vävnad fixerad i formalin fixeras under ett dygn vid rumstemperatur. Efter fixeringen överförs proverna till 70 % alkohol.

### Fixeringslösningar

Här presenteras två alternativa fixeringslösningar, glutaraldehyd respektive formalin. Fixering med glutaraldehyd är oftast att föredra då den ger ett bättre resultat. Denna fixering är även att föredra i samband med plast som inbäddningsmedium vilken tillåter en betydligt tunnare snittjocklek jämfört med paraffin. Nackdelen med glutaraldehydfixering är att den har en begränsad penetrationsförmåga i vävnaden vilket kräver tunna, 1 mm tjocka, preparat.

Den här valda buffrade formalinlösningen (McKnight) har utprovats under flera år vid Marine Laboratory, Aberdeen, och befunnits vara den bästa formalinlösningen för fiskvävnad (Dr. A McVivar, personlig kommentar).

#### *Beredning av 3% glutaraldehyd i 0,1 M fosfatbuffert pH 7,4*

Fosfatbuffert (0,2 M)

Buffertlösning A: 2,76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  i 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (dest)

Buffertlösning B: 7,17 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  i 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (dest)

19 ml A + 81 ml B ger 100 ml 0,2 M fosfatbuffert pH 7,4

57 ml av fosfatbufferten (0,2M) + 43 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (dest.) ger 0,114 M buffertlösning.

1 del 25 % glutaraldehyd + 7,3 delar 0,114 M fosfatbuffert ger 3% 0,1 M lösning.

---

\* Denna begränsade tjocklek är nödvändig vid fixering med glutaraldehyd. Vid formalinfixering kan något tjockare preparat fixeras, cirka 5-10 mm.

*Beredning av buffrad formalin, McKnight*

Formalin (38-40 %)	200 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	9,1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,0 g
NaCl	9,0 g
H <sub>2</sub> O	800 ml

**Dehydrering**

Dehydrera i 70 % etanol över natt

” i 80 % etanol under 1 timme

” i 95 % etanol under 3-4 timmar med byte varje timme

” i 100 % etanol under 2 timmar med ett byte.

**Inbäddning, snittning och färgning**

För över preparaten till plast (av typ Technovit<sup>®</sup> 7100) och låt dem infiltrera över natt. Byt till ny plast följande morgon och låt stå över dagen. Bädda in preparaten i ny plast under eftermiddagen.

Som alternativ till plast används paraffin som inbäddningsmedium enligt standardmetod.

Efter härdning snittas plastpreparaten till 1-2 µm tjocklek och för paraffin till 5-6 µm. Därefter färgas preparaten med hematoxylin och eosin enligt standardmetod samt monteras.

**Analys**

Preparaten studeras i ljusmikroskop och histologiska/histopatologiska förändringar dokumenteras med fotografering. Vävnadsförändringarna kvantifieras, i största möjliga utsträckning, med morfometri. Här används företrädesvis bildanalys.

## Fenerosion

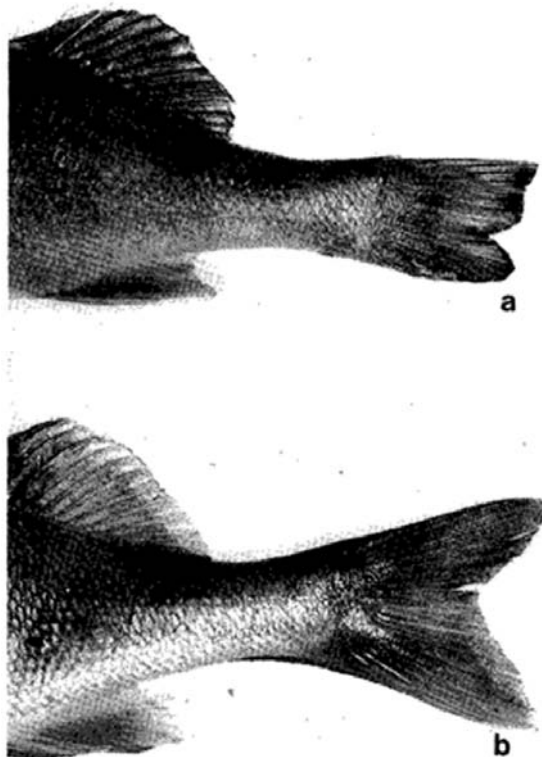
### Allmänt

Fenerosion är en vanlig patologisk förändring av fenorna hos benfiskar. De mest detaljerade utländska studierna, avseende en koppling till vattenförorening, har gjorts på winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* i New York-bukten (Murchelano 1975, Ziskowski & Murchelano 1975) och på dover sole *Microstomus pacificus* i Kaliforniabukten (Mearns & Sherwood 1974, McDermott-Ehrlich et al. 1977, Sherwood & Mearns 1977, Cross 1984). Studier av abborre och guldfisk (*Carassius auratus*) i utsläppsområden till skogsindustrier med blekeriutsläpp har visat på en mycket tydlig koppling mellan dessa utsläppsområden och utvecklandet av fenerosion (Lindesjö & Thulin 1990; 1994). För ytterligare information om fenerosion, utöver vad som ges nedan, se Lindesjö & Thulin 1990.

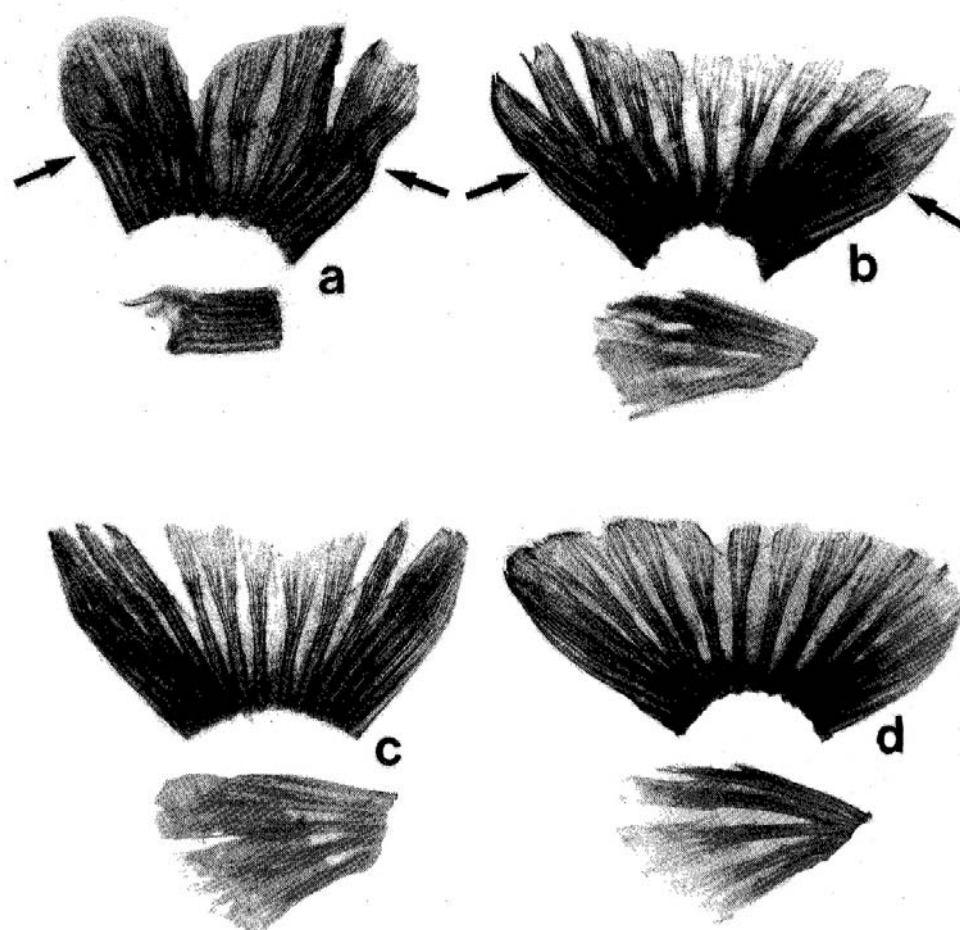
### Beskrivning av sjukdomstecken

Fenerosion kan förekomma i två stadier. Dels som akut fenerosion där delar av fenan har eroderat bort (figur 3) och dels som ett läkt stadium där hela eller delar av fenan har regenererat (figur 4). Det sistnämnda stadiet ytrar sig som en krökning/ deformation av fenstrålarna.

Dessa skador kan förekomma på samtliga fenor, för abborre dock ej första på ryggenfenan. Det läkta stadiet av fenerosion ska ej förväxlas med vad som ofta påträffas hos fenor från abborrar i opåverkade områden, dvs. en svag svängning av fenstrålarna (figur 4 c). Om osäkerhet råder ska man undersöka fenstrålarna i stereomikroskop. En fena som regenererat efter en akut fenerosion uppvisar tydligt en förtjockning av fenstrålen utifrån vilken fenan har regenererat. Både akut och läkt fenerosion kan förekomma samtidigt i en recipient.



Figur 3. Abborre med fenor angripna av akut fenerosion (a) och med normala fenor (b).



Figur 4. Fripreparerade fenor (stjärtfena och bukfena) från abborre med läkt fenerosion (a-c) respektive oskadade fenor (d). a och b uppvisar tydliga ärrbildningar av fenstrålarna som helt eller delvis har regenererat utifrån ett tydligt eroderat område. c uppvisar ärrbildningar av fenstrålarna, dock utan ett markerat regenereringsområde.

### Analys

Om den personal som skall utföra denna analys är mycket väl förtrogen med den här beskrivna skadan, kan analysen utföras direkt i fält. Vid minsta tveksamhet och vid förekomst av relativt låga frekvenser måste dock fenmaterial samlas in för senare analys på laboratoriet. Detta tillgår på följande sätt: Samtliga fenor, utom första ryggfenan hos abborre, klipps av och förvaras fram till analys. Analysen sker bäst genom att varje individs fenor monteras på ett vitt papper, numreras, samt blandas mellan stationer. Därefter analyseras fenorna med avseende på förekomst av akut och läkt fenerosion.



## Överkäksdeformation (PJD)

### Allmänt

Olika typer av skelettdeformationer kan uppträda hos fisk. Förutom att vara genetiskt betingade kan dessa deformationer, hos både vild och odlad fisk, relateras till olika omgivningsfaktorer som t.ex. näringsbrist, parasitinfektioner, lågt pH och till exponering för tungmetaller (Ferguson 1989). Experimentellt har ryggradsdeformationer inducerats med ett stort antal av olika toxiska ämnen (Couch et al. 1977; Pragatheeswaran et al. 1987; Davis 1988) och med processvatten från industrier (Bengtsson & Larsson 1986; Bengtsson et al. 1988a; Härdig et al. 1988). Fältstudier har även kopplat olika typer av vattenföroreningar till skelettdeformationer. I södra Kalifornien ansågs kontaminering av klorerade kolväten och tungmetaller vara orsaken till gälbågsdeformationer hos barred sand bass *Paralabrax nebulifer* (Valentine 1975). I förorenade områden av floden Rhen och dess biflöden i Nederländerna påträffades förhöjda frekvenser av mopsskalle och deformerade fenor hos braxen *Abramis brama* vilka ansågs vara orsakade av kemisk förorening (Slooff 1982). Vidare har en ryggradsdeformation hos insjööring *Salmo trutta* i en å i Skottland tydligt knutits till föroreningen av ett växtgift (Wells & Cowan 1982). I svenska områden har ryggradsdeformation hos hornsimpa *Myxoccephalus quadricornis* i Bottniska viken tydligt knutits till förorening från metallindustrier (Bengtsson et al. 1988 b). Följaktligen har skelettdeformationer hos fisk föreslagits som användbara indikatorer för vattenförorening (Bengtsson 1979, Vethaak & ap Rheinallt 1992).

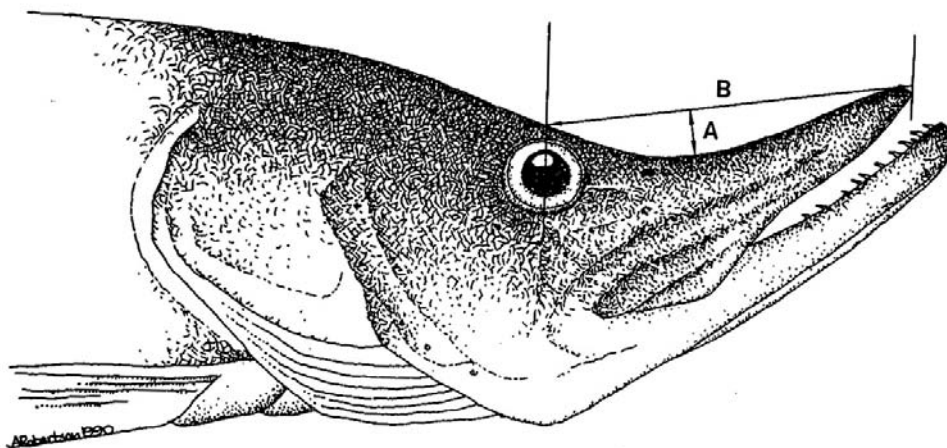
Följande beskrivna variabel, överkäksdeformation hos gädda (PJD), har mycket tydligt knutits till flera svenska skogsindustrirecipienter. Metoden har visat sig speciellt lämplig då deformationen kan kvantifieras vilket möjliggör en fullständig objektiv analys av insamlade data (Lindesjö & Thulin 1992). För ytterligare information om överkäksdeformation hos gädda, utöver vad som ges nedan, se Lindesjö & Thulin 1992.

### Beskrivning av sjukdomstecken

En gädda angripen av en tydlig överkäksdeformation (PJD) har ett mycket karakteristiskt utseende med en uppbjöd överkäke. Alla grader av skadan kan förekomma. För ett otränat öga kan dock de svaga skadorna lätt förbises.

## Analys

Gäddskallen förvaras lämpligast genom infrysning för senare analys på laboratoriet. Efter upptining fotograferas skallen skuggfritt under bra ljusförhållanden mot en vit bakgrund. Lämpligtvis används fotolampor med vilka man lättast undviker skuggeffekter. Skallen fotograferas från sidan och hålls i en vinkel så att den övre delen av de båda ögonen exakt sammanfaller med varandra. Bilderna kopieras på ett 18 x 24 cm fotopapper. För att ange deformationsgraden mäts dels avståndet från ögats centrum till överkäkens yttersta del (B), dels det maximala avståndet (A) från överkäken vinkelrätt till linje B (Figur 5). Linje B mäts med linjal, medan linje A mäts med en noggrannhet av 0,01 mm med hjälp av stereomikroskop. Fisk med ett  $PJD\text{-index}_{A/B} > 0,0431$  definieras som angripen av överkäksdeformation (Lindesjö & Thulin 1992).



Figur 5. Mätningar för beräkning av  $PJD\text{-index}_{A/B}$  av gäddans överkäksben.

## Referenser

- Andersson, T., Förlin, L., Härdig, J. & Larsson, Å. 1988. **Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45,1525-1536.
- Balk, L., Förlin, L., Söderström, M., & Larsson, Å. 1993 b. **Indications of regional and large-scale biological effects caused by bleached pulp mill effluents.** Chemosphere. 27, 631-650.
- Bengtsson, Å., Bengtsson, B.-E. & Lithner, G. 1988 b. **Vertebral defects in fourhorn sculpin, *Myoxocephalus quadricornis* L., exposed to heavy metal pollution in the Gulf of Bothnia.** J. Fish Biol. 33,517~ 529.
- Bengtsson, B.-E. & Larsson, Å. 1986. **Vertebral deformities and physiological effects in fourhorn sculpin, *Myoxocephalus quadricornis*, after long-term exposure to a simulated heavy metalcontaining effluent.** Aquat. Toxicol. 9, 215-229.
- Bengtsson, B.-E. 1979. **Biological variables, especially skeletal deformities in fish, for monitoring marine pollution.** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 286, 457-464.
- Bengtsson, B.-E., Larsson Å., Bengtsson, Å. & Renberg, L. 1988 a. **Sublethal effects of tetrachloro-1,2-benzoquinone, a component in bleachery effluents from pulp milis, on vertebral quality and physiological parameters in fourhorn sculpin.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 15, 62-71.
- Bentley, P. J. 1982. **Comparative vertebrate endocrinology.** 2nd ed, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York and Melbourne.
- Bradford, M. 1976. **A rapid and sensitive method for quatitation of microgram quantities or protein utilizing the principfe of proteindy binding.** Anal. Biochem. 72,248-251.
- Burke, M. D. & Mayer, R. T. 1974. **Ethoxyresorufin: Directfluorometric assay of microsomal dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene.** Drug Metab. Disp. 2,583-588.
- Couch, J. A., Winstead, j. T. & Goodman, L. R. 1977. **Kepon-induced scoliosis and its histological consequences in fish.** Science 197,585-587.
- Cross, J.N. (1984). **Fin erosion among fishes collected near a southern California municipal wastewater outfall (1971-1982).** Fish. Bull. U.S. 83,195-206.

Davis, W. P. 1988. **Reproductive and developmental responses in the self-fertilizing fish, *Rivulus marmoratus*, induced by the plasticizer, di-n-butylphthalate.** *Envir. Biol. Fish.* 21, 81-90.

Ellis, A.E. 1981. **Stress and the modulation of defence mechanisms in fish.** In A.D Pickering (ed.), *Stress in Fish.* Academic Press, London and New York, pp. 147-169.

Ferguson, H. W. 1989. **Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts.** Iowa State University Press, Ames. 263 p.

Förlin, L., Hansson, T., Haux, C., Johansson-Sjöbeck, M-L., Larsson, Å. och Lidman, U. 1979. **NBL Rapp 88**, Brackish Water Toxicology Laboratory, Swedish Environment Protection Agency, Solna.

Galgani, F., Bocquene, G., Lucon, M., Grzebyk, D., Letroui, F. & Claisse, D. 1991. **EROD measurements in fish from the northwest part of France.** *Mar. Poll. Bull.* 22, 494-500.

Goksoyr, A. & Förlin, L. 1992. **The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring.** *Aquat. Toxicol.* 22,287-312.

Härdig, J., Andersson, T., Bengtsson, B.-E., Förlin, L. & Larsson, Å. 1988. **Long-term effects of bleached kraft mill effluents on red and white blood cell status, ion balance, and vertebral structure in fish.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15, 96-106.

Haux, C. & Förlin, L. 1988. **Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish.** *Ambio* 6, 376-380.

Haux, C. och Larsson, Å. 1979. **Effects of DDT on blood plasma electrolytes in the flounder, *Platichthys flesus*, in hypotonic brackish water.** *Ambio* 8,171-173.

Haux, C. och Larsson, Å. 1984. **Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery.** *Aquat. Toxicol.* 5,129-142.

Haux, C., Larsson, Å. & Sjöbeck, M.-L. 1985. **Physiological stress in a wild fish population of perch *Perca fluviatilis* after capture and during subsequent recovery.** *Mar. Environ. Res.* 15, 77-95.

Hinton, D. E. & Lauren, D. J. 1990. **Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: Potential biomarkers of exposure. In Biomarkers of environmental contamination.** Eds. McCarthy, J. F. & Shugart L. R. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers.

- Hinton, D. E., C. L. Lanz, et al. 1987. **Normal versus abnormal structure: Considerations in morphologic responses of teleosts to pollutants.** Environ. Health Perspec. 77,139-146.
- Jacobsson, A., Neuman, E. & Olsson, M. 1992. **Tånglaken som indikator på effekter av giftiga ämnen.** Fiskeriverket, Kustrapport 1992:2, 23 sid.
- Jotansson, N., Larsson, Å., and Lewander, K. 1972. **Metabolic effects of PCB (polychlorinated biphenyls) on the brown trout (*Salmo trutta*).** Comp. Gen. Pharmacol. 3,310-314.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J. & Walsh, C. 1984. **An alternative 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity.** Anal. Biochem. 140,138~145.
- Larsson, Å., Bengtsson, B-E. och Haux, C. 1981. **Disturbed ion balance in flounders, *Platichthys flesus* L., exposed to sublethal levels of cadmium.** Aquatic Toxicology 1, 19-35.
- Larsson, Å., Haux, C. och Sjöbeck, M-L. 1985. **Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies.** Ecotoxicology and Environmental Safety 9,250-281.
- Larsson, Å., Haux, C. och Sjöbeck, M.-L. 1986. **Toxiska effekter av metaller. Prövning av fysiologisk testmetodik.** Naturvårdsverket Rapport 3166, 68 sid.
- Lindesjö, E. & Thulin, J. 1992. **A Skeletal Deformity of Northern Pike (*Esox lucius*) Related to Pulp Mill Effluents.** Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49(1),166-172.
- Lindesjö, E. & Thulin, J. 1990. **Fin erosion of perch *Perca fluviatilis* and ruffe *Gymnocephalus cernua* in a pulp mill effluent.** Dis. Aquat. Org. 8 (2), 119-126.
- Lindesjö, E. 1992. **Fish Diseases and Pulp Mill Effluents - Epidemiological and histological studies.** PhD thesis, Univ. Uppsala, Uppsala, Sweden. 140 p.
- Lindesjö, E. 1994. **Temporal variations and sexual dimorphism of the skin of perch, *Perca fluviatilis* L.: a morphological study.** J. Ap'pl. Ichthyol. In press
- Lindesjö, E. & Thulin, J. 1994. **Histopathology of skin and gills of wild fish in pulp mill effluents.** Dis. Aquat. Org. 18:81-93.
- Love, R. M. 1970. **The chemical biology of fishes.** Academic Press, London/New York.

- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193,265-275.
- Mazeaud, M. M. and Mazeaud, F. 1981. in A.D. Pickering (ed.), **Stress in Fish**, Academic Press, New York.
- McDermott-Ehrlich, D. J., Sherwood, M. J., Heesen, T. C., Young, D. R. & Mearns, A. J. 1977. **Chlorinated hydrocarbons in dover sole, *Microstomus pacificus*: local migrations and fin erosion.** Fish. Bull. U.S. 75, 513-517.
- Mearns, A. J. & Sherwood, M. J. 1974. **Environmental aspects of fin erosion and tumors in southern California dover sole.** Trans. Am. Fish. Soc. 103, 799-810.
- Murchelano, R. A. 1975. **The histopathology of fin rot disease in winter flounder from the New York Bight.** J. Wildl. Dis. 11, 263-267.
- Noll, F. 1974. H.U. Bergmeyer, ed. **Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed.** (Transl. from 3rd German ed.) Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, Inc., New York and London, 4 vols.
- Payne, J. J., Fancy, L. F., Rahimtula, A. D. & Porter, E. L. 1987. **Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring.** Comp. Biochem. Physiol. 86C, 233-245.
- Pohl, R. J. & Fouts, j. R. 1980. **A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by subcellular fractions.** Anal Biochem. 107, 150-155.
- Pragatheeswaran, V., Loganathan, B.,Natarajan, R. & Venugopalan, V. K. 1987. **Cadmium induced vertebral deformities in an estuarine fish, *Ambassis commersoni* Cuvier.** Proc. Indian Acad. Sci. 4, 389393.
- Prough, R. A., Burke, M. D. & Mayer, R. T. 1978. **Direct fluometric methods for measuring mixed-function oxidase activity.** Methods Enzymol. 52, 372-377.
- Roch, M. och Maly, E. J. 1979. **Relationship of cadmium-induced hypocalcemia with mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the influence of temperature on toxicity.** Journal of the Fisheries Research Board of Canada 36, 1297-1303.
- Sherwood, M. J., & Mearns, A. J.1977. **Environmental significance of fin erosion in southern California demersal fishes.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 298,177-189.
- Sloof, W. 1982. **Skeletal anomalies in fish from polluted surface waters.** Aquat. Toxicol. 2,157-173.

Södergren, A., Ed. 1993. **Bleached pulp mill effluents**. Swedish Environmental Protection Agency, Report 4047.

Stegeman, J. J., Brouwer, M., Di Giulio, R. T., Förlin, L., Fowler, B. A. Sanders, B. M. & Van Veld, P. A. 1992. **Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protection systems as indicators of chemical exposure and effects**. In **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Eds. Hugget, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. & Bergman, H. L. SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers. pp. 235-335.

Valentine, D. W. 1975. **Skeletal anomalies in marine teleosts**. pp. 695-718. In W. E. Ribelin & G. Migaki [ED.] **The pathology of fishes**. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.

Van Handel, E. 1965. **Estimation of glycogen in small amounts of tissue**. *Analyt. Biochem.* 11, 256-265.

Vethaak, D., & T. ap Rheinallt. 1992. **Fish diseases as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea**. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2, 1-32.

Wedemeyer, G. A., och McLeay, D.J. 1981. **Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors**. In A.D. Pickering (ed.), *Stress in Fish*. Academic Press, London och New York, pp 247-275.

Wells, D. E. & Cowan, A. A. 1982. **Vertebral dysplasia in salmonids caused by the herbicide trifluralin**. *Environ. Pollut. Ser. A.* 29, 249-260.

Ziskowski, J., Murchelano, R. 1975. **Fin erosion in Winter flounder**. *Mar. Pollut. Bull.* 6, 267-269.

## Analys av defekter hos bottenfauna

### Undersökning av missbildade embryon av *Monoporeia affinis* (Amphipoda, Crustacea).

#### Mål och syfte

Undersökningsvariabeln missbildade embryon av *Monoporeia affinis* är effektrelaterad och förväntas ge svar på förändringar i belastningen av miljöföroreningar, som metaller och organiska miljögifter. Variabeln har utvecklats i laboratorieförsök med mjukbottenmikrokosmos under 10 års tid och använts som testvariabel i experiment med metaller (kadmium, bly, arsenik) klorfenolära substanser, skogsindustriavloppsvatten samt kontaminerade sediment från metallbelastade och skogsindustribelastade områden (Sundelin 1989). Under senare år har variabelns användbarhet provats i en rad fältstudier (Elmgren et al 1983, Sundelin 1991, 1992, Sundelin in grep.). Resultaten har visat att undersökningstypen kan användas till att avläsa effekter av dels långsiktig kontinuerlig belastning av miljögifter, dels enstaka utsläpp av xenobiotika. Det är troligt att även sekundära eutrofieringseffekter som syrebrist och sulfidbildning i sedimentet ger specifika effekter som går att särskilja från annan miljögiftsbelastning. Dessa skador kommer att utredas inom miljögiftsprogrammet PMK hav.

#### Provtagningsstrategi

Vid uppläggningsen av en undersökning bör stationer väljas så att eventuella effekter från olika typer av sediment kan belysas, t. ex. organisk halt, sulfider och låga syrehalter. Det är till en viss grad möjligt att särskilja effekter från olika typer av miljögifter och låga syrehalter/sulfider (detta är indikationer som erhållits från PMKstudier i Asköområdet).

Levande gravida (äggbärande) honor insamlas under den första hälften av februari. Detta är det skede i embryonalutvecklingen då känsligheten hos variabeln är störst. Parning och befruktning äger rum under november månad. Därefter utvecklas äggen i marsupiet (äggkammaren) under c:a 2-2,5 månader innan gastrulationen sker. Differentiering av embryot pågår under 3-4 veckor. De första nykläckta juvenilerna uppträder således från mitten av februari. Det är väsentligt att alla honor fortfarande bär sin avkomma så att provet är representativt för hela populationen på mätstationen. Provtagningarna bör om möjligt genomföras samma vecka varje år i ett undersökningsområde där man vill kunna analysera tidstrender.



### Provtagningsmetodik

Provtagningsfrekvensen är en gång per år. På varje station tas 5 hugg med en van Veen-huggare, vilket samtidigt ger ett kvantitativt prov. Varje hugg bör innehålla minst 10 gravida honor. Under förhållanden med tjock is då det är omöjligt att gå med båt, men isen bär en snöskoter, är det näst intill omöjligt att använda en huggare. För dessa situationer finns en specialkonstruerad eldriven bottensug (HA-sugen). Med hjälp av en dränkbar pump kan bottendjur sållas från sedimentet och sugas upp från botten. Vid detta förfarande tas 5 sug på en bestämd tidsenhet för att erhålla ett antal replikat för en statistisk analys. Detta ger emellertid inte något kvantitativt prov, vilket ej heller är nödvändigt eftersom abundans och biomassa hos bottenfaunan studeras inom andra program.

Provet bör även vid detta förfarande innehålla minst 10 gravida honor/sug för att materialet ska kunna analyseras statistiskt. I Bottenviken där äggantalet/hona är betydligt lägre, 10-20 ägg/hona jämfört med 20-30 ägg/hona i Bottenhavet och egentliga Östersjön, är det lämpligt att analysera minst 15 honor/ hugg eller sug.

### Analysmetodik

Analysen görs på levande honor under stereomikroskop. Vid frysning och konservering blir äggen opalescenta. Äggen friläggs och räknas för att kunna uppskatta populationens potentiella nyrekrytering varefter frekvensen missbildade och avvikande ägg och embryon bestäms (mer detaljerad manual med fotografisk beskrivning över olika utvecklingsstadier samt olika typer av missbildningar kommer att sammanställas under 1994). Vid fripreparering och analys av *Monoporeia* är det inte möjligt att använda sötvatten eftersom äggen då spricker eller förstörs på grund av fel salthalt.

Förutom embryonalstudier bör man bestämma parasitförekomst och andra eventuella sjukdomar.

### Ingående variabler

Fekunditet (ägg/hona), utvecklingsgrad hos embryon (8 olika stadier), frekvensen skadade embryon, frekvensen honor med döda eller partiellt döda äggsäckar, parasitförekomst (nematoder och acanthocephal) samt övriga angrepp eller sjukdomar (i Östersjön förekommer stympade extremiteter som troligtvis ej förorsakas av svamp) bestäms på varje station. Variabler som kan läggas till är honans längd, som kan ge svar på eventuella avvikelser från förväntad korrelation mellan fekunditet och kroppslängd (exempel är partiellt död äggsäck, som ger ett lågt fekunditetstal även hos

storvuxna honor). Undersökningstypens metod kan även appliceras på ishavsgråsuggan, *Saduria entomon* (Isopoda, Crustacea), som besitter större tolerans mot anaeroba miljöer. Icke biologiska variabler av stor vikt för tolkningen av resultaten är kunskapen om syresituationen i bottenarna samt sulfidkoncentrationen vilka bör ingå som obligatoriska variabler. Det finns idag starka indikationer på att låga syrehalter och sulfidbildning i sedimentet ger speciella skador på gonader, ägg och embryon (resultat från pilotstoder i Asköområdet 1993 och 1994 samt resultat från laboratorieexperiment (Broman et al in prep.). Varierande andel av äggsamlingen dör och döda ägg eller embryon återfinns som en fettklump i marsupiet. Dessutom förekommer ett stort antal gråa eller färglösa ägg på stationer med svavelvätelukt. Kläckningsförsök med dessa embryon har resulterat i hög dödlighet. Det finns följdaktligen ett starkt skäl att mäta koncentrationen syre och sulfider samt redoxpotential på provtagningsstationer. Dessa mätningar bör genomföras då syresituationen är sämst i bottenarna, dvs. juli-september.

### **Bakgrundsinformation**

Kunskapen om miljögifter i sediment på ingående mätstationer underlättar tolkningsfrågan. Det bör emellertid påpekas att information om belastningsdata är relevant först då man konstaterat förekomst av ekotoxikologiska effekter. Annan viktig bakgrundsinformation är primärproduktionssiffror, sedimentationsdata, hydrografidata som t.ex. strömmätningar och temperaturmätningar i bottenvattnet.

### **Utvärdering**

För den statistiska analysen används en icke parametrisk test, såvida man inte finner att materialet är normalfördelat. För att få en uppfattning om skadan hos den presumtiva populationen görs den statistiska analysen på totalfrekvenser i varje delprov. Korrelationstester kan med fördel användas för att testa samband med övriga variabler som t. ex. parasitförekomst, äggantal, sulfid- och syrekoncentrationer i sedimentet. För att möta trender i tiden är det idag inte helt självklart hur man bearbetar data. Icke-parametriska regressionsanalyser eller tidsanalyser kan användas beroende på hur data ser ut. Idag saknas data för mer än ett år varför det är svårt att ge klara riktlinjer.

### **Kvalitetssäkring**

Personer som skall utföra undersökningen bör ha god kännedom om bottenfaunan i Östersjön, samt erfarenhet av sedimentprovtagning.

För den biologiska analysen krävs kännedom om amphipoders embryoutveckling samt träning i att analysera just *Monoporeias* embryoutveckling.

### **Utrustning och tidsåtgång**

Provtragningsutrustning: Van Veenhämtare, Kajakhämtare med ca 10 plexiglasrör, HA-sug för svåra isförhållanden, rostfria såll, sållbord. För redox, sulfid samt syremätning krävs radiometer, amperemeter, mikromanipulator, silverelektroder, referenselektrod (calomel), platinaelektrod, glaselektroder. Möjliga fordon är båt försedd med hydraulvinsch (isbrytarklass 1 i Bottniska Viken) och skoter. Dessutom behövs ett bensindrivet elaggregat för hantering av HA-sug från is samt isborr. För biologisk analys krävs stereomikroskop med god upplösning (minst Leica M8 med underbelysning) samt kameradel för fotodokumentation, dissektionsbestick, små rostfria såll. Förbrukningsmateriel är plastburkar och elektroder.

Tidsåtgången för provtagning om ca 5 stationer inklusive biologisk analys: 3 personer på båt i en vecka samt 2 personer för mikroskopisk analys under 3 dygn. För redox, sulfid samt syremätning tillkommer ytterligare 1 vecka till sjöss. Till analys, sammanställning samt rapportering åtgår 2 månaders arbete.

**(Referenser se sidan 85)**

## **Klassificering av skalskador hos *Macoma balthica***

### **Bakgrund**

Vid experiment med skogsindustriavloppsvatten samt vid fältundersökningar utanför skogsindustrier har man konstaterat en högre frekvens av musslor med varierande grad av korrosion på skalen. Skadan har troligtvis inte någon större betydelse för individen så länge mjukdelar ej blottas, men en långtgående exponering kan innebära att mjukdelarna exponeras, vilket innebär att musslan dör. Utanför en sulfatfabrik med blekeri har ett stort antal döda musslor med hål rakt igenom skalet observerats. Korrosionsskador kan även uppkomma vid syrebrist. Om syrebristen är temporär kompenseras emellertid skadan med ökad tillväxt av skalet från insidan. Vid långvarig syrebrist dör naturligtvis populationen, eftersom musslorna har dålig förmåga till förflyttning.

### **Mål och syfte**

Eftersom studierna hittills endast har genomförts i skogsindustribelastade områden och i laboratorieexperiment med skogsindustriavloppsvatten och sediment är avsikten i första hand att variabeln ska ge svar på effekter från substanser associerade med skogsindustrin och användas i dessas recipienter.

### **Provtagning**

Musslorna insamlas med en Van Veenhuggare eller Ekmanhuggare för att erhålla ett kvantitativt prov. Provtagningen genomförs vid samma tidpunkt som bottenfaunaprovtagningarna för abundans och biomassebestämning för att minimera provtagningskostnaderna. Minst 5 hugg/station krävs för att möjliggöra en statistisk analys. Ekmanhuggaren kan vara svårare att använda på sandiga bottnar och ger dessutom ett mindre prov. Bottenbeskaffenhet och abundansen på provtagningslokalen är således avgörande för vilken typ av sedimentprovtagare man skall använda. Det är emellertid viktigt att använda samma provtagare på samtliga stationer i undersökningen. Sedimentet sållas genom 5,1 och 0,5 mm. Individerna från de olika sållarna plockas ut för analys. För att få en större känslighet analyseras individerna i olika storleksklasser, 0-1 mm (nysettlade individer), 1-2 mm, 2-4 mm, 4-6 mm och 6-8 mm. För att undvika felaktiga mätningar måste poängteras att musslans längd mäts på det största avståndet. Många oinitierade personer uppfattar ofta musslans längd mellan umbo och tillväxtzon (detta är emellertid bredden).

Det är framför allt de unga musslorna som ger svar på förändringar i miljön. En provstorlek på ca 10-15 individer i storleksklassen 0-2 mm krävs för att kunna bearbeta materialet statistiskt.

### **Analys**

Analysen kan genomföras på levande, frysta eller konserverade djur. Längdmätningar sker förslagsvis i ett stereomikroskop med mätokular där även analysen sker. Skadorna delas in i tre grader, Skada 1=vita fläckar, skada 2=urgröpning eller krater i skalet, skada 3=hål igenom skalet intill mjukdelar. Vid tillgång till en bildanalysator kan man även kvantifiera skadorna till yta eller antal.

### **Bakgrundsinformation**

Eftersom låga syrehalter och sulfider ger skador på skaltillväxten (går att identifiera i form av svartfärgning runt skadan) är det värdefullt att mäta syre- och sulfidskoncentrationen i sedimentet på mätstationerna, se avsnittet om *Monoporeia*.

### Kvalitetssäkring

Personer som skall utföra undersökningen bör ha god kännedom om bottenfaunan i Östersjön samt erfarenhet av sedimentprovtagning.

### Utrustning och tidsåtgång

Provtagningsutrustning: Van Veenhämtare, rostfria såll, sållbord. För redox-, sulfid- samt syremätning krävs radiometer, amperemeter, mikro-manipulator, silverelektroder, referenselektrod (calomel), platinaelektrod, glaselektroder. Båt försedd med hydraulvinsch behövs. För biologisk analys krävs stereomikroskop med ovanbelysning samt kameradel för fotodokumentation. Förbrukningsmateriel är plastburkar och elektroder.

Tidsåtgång för provtagning om ca 5 stationer inklusive biologisk analys: 3 personer på båt i en vecka samt 2 personer för mikroskopisk analys under 3 dygn. För redox, sulfid samt syremätning tillkommer ytterligare 1 vecka till sjöss. Till analys, sammanställning samt rapportering åtgår 2 månaders arbete.

### Referenser

Elmgren, R., Hansson, S., U., Sundelin, B., Boehm, P.D. 1983. **The "Tsesis" oil spill: Acute and long-term impact on the benthos.** Mar. Biol. 73, 51-65.

Sundelin, B. 1989. **Ecological effect assessment of pollutants using Baltic benthic organisms.** Department of Zoology, Stockholm University, Tsesis.

Sundelin, B. 1990. **Effekter på *Pontoporeia affinis* och *Macoma balthica* i Mönsteråsrecipienten.** Studie utförd på uppdrag av Miljöforskargruppen och Mönsterås bruk.

Sundelin, B. 1991. **Effekter på embryonalutveckling hos *Pontoporeia affinis* i Umeälvens mynningsområde.** Studie utförd på uppdrag av länsstyrelsen och Obbola Liner Board.

Sundelin, B. 1992. **Effect Monitoring in pulp mill areas using benthic macro- and meiofauna.** In: Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluents. Proceedings of a Swedish Environmental Protection Agency Conference, Saltsjöbaden, Stockholm. Naturvårdsverket Rapport 4031.

Sundelin, B. och Eriksson, A-K. **Malformed embryos of *Monoporeia affinis* - a sensitive tool in Environmental Monitoring.** Manus (1994).

# VATTENRECIPIENT- KONTROLL

*vid skogsindustrier*

Miljöfarliga verksamheters effekter på miljön övervakas regionalt. Dessa Allmänna Råd beskriver hur recipientkontrollen i vatten som påverkas av skogsindustrier bör utformas, med syftet att åstadkomma en mer enhetlig och målinriktad kontroll av utsläppen till vatten från massa-, pappers- och fiberskivetillverkning.

Här presenteras olika kontrollprogram som tar hänsyn till både recipienttyper och tillverkningsprocesser. Basprogrammet innehåller de löpande undersökningar som behöver göras, medan ett utvidgat program kan användas när tillståndsprovning, processförändringar eller andra specialfall är aktuella.

Råden vänder sig till länsstyrelser, skogsindustrier, vatten- och vattenvårdsförbund, konsulter och andra som utformar förslag till och genomför kontrollprogram.

ISBN 91-620-4177-0  
ISSN 0282-7271

Naturvårdsverket FÖRLAG