

Programområde:

Kust och hav

Undersökningstyp:

**Missbildade embryon av
*Monoporeia affinis***

Mål och syfte med undersökningstypen

Avsikten är att registrera effekter av långsiktiga förändringar i Bottniska vikens och Egentliga Östersjöns miljö på embryon av två arter av vitmärla (*Monoporeia affinis* och *Pontoporeia femorata*). *P. affinis* förekommer endast i områden söder om Ålands hav och där i lägre tätheter än *M. affinis* varför *M. affinis* ges högre prioritet i undersökningarna. Att registrera frekvensen av missbildade ägg och embryon hos vitmärla är en känslig, effektrelaterad metod att upptäcka miljöförändringar. Därigenom kan man få indikation om förekomsten av metaller och organiska miljögifter i sedimenten. Genom att studera avvikelser från vitmärlans normala embryoutveckling kan man även få information om sekundära effekter (t.ex. om det är syrebrist och svavelvätebildning i bottenzonen) och om temperaturstörningar. Det är således i första hand inte väsentligt att särskilja effekterna av den mängd olika typer av miljögifter som förekommer i miljön, utan det viktiga är att kunna se vad som är generella miljögiftseffekter till skillnad från effekter som orsakas av klimatvariabler.

Metodbeskrivningen kopplas till miljömålen *Giffri miljö*, *Ingen övergödning* och *Hav i balans samt levande kust och skärgård*.

Samordning

Eftersom övrig bottenfaunaprovtagning sker i maj då vitmärlan redan släppt sin avkomma är det svårt att göra några samordningsvinster. Stödvariabler från andra undersökningstyper är emellertid väsentliga för utvärderingen. Exempel på sådana stödvariabler är temperatur i bottenvatten och i vattenpelaren upp till temperatursprångskiktet (termoklinen), primär- och sekundärproduktion under olika tider på året, samt individtätheten hos vitmärlan.

Strategi

Undersökningen kan användas till att avläsa effekter av såväl långsiktig, kontinuerlig belastning av miljögifter som av enstaka utsläpp. Laboratieförsök har visat på signifikanta skillnader mellan exponerade individer och kontrollgrupper vid de lägsta testkoncentrationerna av de undersökta substanserna där effekter kan spåras. Det är till en viss grad möjligt att särskilja effekter från olika typer av miljögifter som metaller och olika typer av organiska miljögifter. Dessa frågeställningar måste emellertid vidareutvecklas i mikrokosmstudier under kontrollerade laborieförhållanden för att sedan kunna användas i fält.

Eftersom de flesta organismer som används för att upptäcka exponering för miljögifter (s.k. biomarkörer) även påverkas av andra omvärldsfaktorer såsom syrebrist, temperatur och salthalt, är det viktigt att kunna särskilja effekterna av miljögifter från effekter av övriga variabler. Laboratorieförsök samt fältstudier har visat att varken syrebrist, sulfider eller temperaturförhöjningar i vattenpelaren ger upphov till missbildade embryon hos *Monoporeia affinis*. Sådana missbildningar speglar således enbart exponeringen för kroppsfrämmande ämnen.

Förutom missbildade embryon förekommer obefruktade/odifferentierade samt döda ägg och embryon. Ägg som av någon anledning inte har befruktats eller vars utveckling har avbrutits i ett tidigt skede (före gastrulationen) klassas som odifferentierade. Om en stor mängd ägg dött i ett tidigt skede i embryoutvecklingen återfinns de som en oidentifierbar rest (döda äggsamlingar) i honans äggkammare (marsupium). Både laboratorieförsök och fältstudier har gett starka indikationer på samband mellan syrebrist och temperaturförhöjningar och andelen döda äggsamlingar hos honan. Honans ägganlag (gonader) och ägg är troligtvis mer känsliga än den vuxna individen, vilket resulterar i att äggen dör i och återfinns som "döda äggsamlingar" i äggkammaren. Preliminära studier har visat att det finns ett samband mellan döda äggsamlingar och individtäthet hos vitmärslan. Orsaken till de odifferentierade äggen är delvis oklar.

Statistiska aspekter

Målsättningen med metoden är att visa skillnader i skadebild mellan olika områden i tid och rum samt, om så är fallet, särskilja vilken karaktär skadorna har.

Genom att studera olika variabler i förhållande till reproduktionscykeln hos vitmärslan kan man få svar på hur substanser som finns i sedimenten påverkar reproduktionsutfallet. Kunskap om den naturliga bakgrundsvariationen hos de ingående variablerna är väsentlig för att ge referensvärden och därmed bl.a. göra det möjligt att bedöma graden av påverkan.

Frekvensen av missbildade embryon av *Monoporeia affinis* visar en förhållandevis låg variation mellan Östersjöns olika bassänger. Fem sedimentprover (replikat) per station ger därför ett tillfredställande statistiskt underlag. Studier har visat att mediantiden på stationsnivå för att upptäcka en årlig femprocentig förändring med signifikansnivå $\alpha = 0,05$ är åtta år i norra egentliga Östersjön och sju år i Bottenhavet. Med en sannolikhet på 90 procent bör en förändring kunna upptäckas efter 13 respektive 11 år. Dessa uppskattningar har erhållits genom datorsimuleringar av regressionsanalyser baserade på medelvärden och spridningsmått från fyra års miljöövervakning i Egentliga Östersjön och Bottenhavet. Resultaten grundar sig på andelen missbildade embryon (ca 3 procent). Med samma beräkningsgrunder skulle man med 90 procents sannolikhet upptäcka förändringar redan efter 3–4 år om man i stället utgår från andelen normala embryon (ca 97 procent), vilket ger stora möjligheter att upptäcka effekter av miljöbelastning.

Provtagning sker en gång per år under månadsskiftet januari-februari. Vid denna tidpunkt på året befinner sig djuren i ett sent skede i embryonalutvecklingen men före kläckning, då avvikelser är lättast att upptäcka. Det är väsentligt att alla honor fortfarande bär sin avkomma så att provet är representativt för hela populationen på mätstationen. På varje station tas fem sedimentprov, som bör innehålla minst 10 gravida honor/hugg eller minst 25 honor/station.

Plats/stationsval

Vid planering av en embryostudie är det väsentligt att klargöra vilka frågor man vill ha svar på. Genom att studera olika variabler som är kopplade till reproduktionscykeln hos vitmärlan kan man studera hur substanser som finns i sedimenten påverkar reproduktionsutfallet. Om man vill kunna särskilja effekter av t.ex. syrebrist och förekomst av sulfider från effekter av miljögifter är det väsentligt att i recipienten respektive i referensområdet välja ut stationer med likartade typer av sediment. Urvalet skall då även innefatta stationer med varierande redoxpotential. När avsikten är att jämföra toxiciteten hos olika sediment är det viktigt att välja stationer med ackumulationsbottnar, eftersom de har en förhållandevis liten variation i koncentrationen av miljögifter, jämfört med transportbottnar.

I ett årligt återkommande undersökningsprogram är det viktigt att genomföra provtagningen vid samma tidpunkt varje år för att kunna registrera exempelvis årsskillnader i utvecklingsstadier och produktion av ägg per hona (fekunditet). I likhet med andra märkräfter (amfipoder) som bär sin avkomma i en äggkammare kan vitmärlans ursprungliga antal befruktade ägg minska under embryoutvecklingen. Det finns bl.a. indikationer på att honan släpper ifrån sig ägg under inkubationstiden, vilket innebär att äggantalet i genomsnitt är lägre vid kläckningen i februari än strax efter befruktningen i november. Undersökningarna kan utföras vid samma tidpunkt i Egentliga Östersjön och Bottniska viken, eftersom tidpunkten för befruktning och kläckning av unga vitmärlor (juveniler) i stort sett följer samma rytm i hela området.

För att kunna belysa bakgrundsvariationen är det även väsentligt att innefatta olika typer av sediment samt att samordna stationsvalet med sådana undersökningstyper där stödvariabler ingår, t.ex. kartering av mjukbottenlevande makrofauna, växtplankton och närsalter i både Egentliga Östersjön och Bottenhavet. Man bör vid valet av provstationer också ta med risken för kraftig isbeläggning, vilket försvårar provtagning.

Mätprogram

Variabler

Variabler som ingår i undersökningen är

- fekunditet (ägg per hona),
- utvecklingsgrad hos embryon (nio olika stadier),
- missbildade embryon (som kan delas in i olika skadetyper, t.ex. membranskador),
- döda respektive obefruktade/outvecklade (odifferentierade) ägg eller embryon,
- döda eller partiellt döda äggsamlingar hos honan,
- parasitförekomst (nematoder och acanthocephalen *Echinorhynchus salmonis*) hos honan,
- övriga angrepp eller sjukdomar hos honan (somitiskador). Med somitiskador menas bruna fläckar som vissa år uppträder på vitmärlornas antenner, ben och sköld (exoskelettet). Enligt en teori är dessa fläckar manganutfällningar som uppstår vid svår syrebrist. I svåra fall fräts antennerna av intill huvudskölden, medan fläckar på exoskelettet försvinner vid nästa skalömsning.

Variabler som kan läggas till är honans längd, som kan ge svar på eventuella avvikelser från förväntad överensstämmelse mellan fekunditet och kroppslängd. Exempelvis ger en partiellt död äggsamling ett lågt fekunditetstal även hos storvuxna honor. Undersökningstypens metod med ingående variabler kan även användas för att undersöka isopoden *Saduria entomon*, som är mer tolerant mot syrefattiga miljöer, och andra amfipoder (märkräfter) som *Pontoporeia*

femorata och *Pallasea quadrispinosa*. *P. femorata* följer samma reproduktionscykel som *M. affinis* och har en i det närmaste identisk embryonalutveckling.

Studier av icke-biologiska variabler – däribland syrekoncentrationen i sediment och bottenvatten samt sulfidkoncentrationen i sedimentet – är av stor vikt för att kunna särskilja inverkan av omgivningsvariabler (t.ex. syrebrist och förekomst av sulfider) från effekter av miljögifter. Såväl syrekoncentrationen i bottenvatten som syrekoncentrationen i sedimentet ingår som obligatoriska mätvariabler i undersökningstypen.

På grund av toxiciteten hos sulfider har mätning av lösta sulfider (H_2S , HS^-) hittills inkluderats som en frivillig variabel. Någon koppling mellan sulfidkoncentrationen och andelen döda äggsamlingar eller andelen missbildade embryon har inte kunnat konstanteras. Det finns däremot starka indikationer på ett samband mellan syrekoncentrationen i bottenvatten och andelen honor med döda äggsamlingar och därför kan möjligheten att ersätta sulfidmätningarna med syremätning i sedimentet prövas.

Tabell 1. Översiktstabell för variabler och tidsperioder m.m.

Område	Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Enhet / klassade värden	Prioritet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- eller observationsmetodik	Referens till analysmetod
Station	Prov	Djup till botten	m	1	Årligen, februari	Bil. 1 ref nr 11	Bil. 1 ref nr 11
	Monoporeia affinis alt. Pontoporeia femorata, Honor	Längd	mm	2			
		Parasitangrepp	ja/nej	1			
		Somitskador	ja/nej				
		Antal ägg					
		Död äggsamling	ja/nej				
	Embryon	Utvecklingsgrad enligt Sundelin & Eriksson	Klassat				
	Missbildade embryon	Antal					
	Döda embryon	Antal					
	Odifferentierade embryon	Antal					
	Bottensubstrat	Sedimentlukt	Svavelväte Ingen lukt				
		Sulfidhalt	mmol/l	2	Årligen, september		2, 4, 5
		pH		2			
		O ₂ -halt	mg/l	1	september		3, 6, 7 elektrodmannual
Redoxpotential		mV	2	Årligen, september		1	
TOC-halt	mg/kg	1				ackrediterad enl. Swedac	

Version 1:3, 2005-09-23

Område	Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Enhet / klassade värden	Prioritet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- eller observationsmetodik	Referens till analysmetod
	Vatten	Temperatur vid botten	Cel (°C)				
		O2-halt	mg/l	1	Årligen, september		SS-EN 25813 SS-EN 25814
		Våghöjd	m				
	Luft	Vindriktning	Klassat ¹				
		Vindhastighet	m/s				
Biologisk beskrivning av provet, sedimentets beskaffenhet, väderlek m.m. kan registreras om anmärkningar							

Frekvens och tidpunkter

Provtagning av embryon och sedimentkemi sker en gång per år. Analys av embryon även vid ett tidigt skede i embryoutvecklingen kan ge möjlighet att utreda de fysiologiska orsakerna till att honorna bär på odifferentierade ägg och döda ägg/äggsamlingar. Ett fel i klyvningsmönstret kan i ett senare skede, då celler degenererat, vara svårt att upptäcka, men är möjligt att identifiera i den tidiga embryoutvecklingen. De sedimentkemiska variablerna mäts företrädesvis under hösten (augusti–september) under samma vecka (vecka 37 rekommenderas), då dels syresituationen är som sämst i bottarna, dels honornas ägganlag har börjat utvecklas.

Observations-/provtagningsmetodik

Om möjligt används Van Veen-huggare för provtagningarna. Den ger dels ett kvantitativt prov, dels ett prov som omfattar hela populationen av vitmärlor i djupled. Sedimentet sållas genom 1 mm såll för att ta vara på de gravida honorna. Eftersom det är väsentligt att få levande honor i provet är det emellertid inte möjligt att sålla ett sediment med styv lera under alltför lång tid för att erhålla ett kvantitativt prov. I sådana fall skall kvaliteten prioriteras framför kvantiteten. Vid mycket låg temperatur är det en fördel att arbeta i uppvärmd lokal för att undvika bl.a. igenfrysning av såll. De levande, gravida honorna transporteras i väl syrsatt brackvatten till laboratoriet för analys. Eftersom vitmärlan är en kallvattenart är det viktigt att vattentemperaturen inte överstiger 7-8 °C.

Isbildning medför svårigheter att använda vinsch och huggare. Under dessa förhållanden kan prover tas från isen med specialkonstruerad eldriven botten sug, en s.k. HA-sug (konstruerad av Hägerroth och Andersson) som drivs med ett bensindrivet elaggregat (10). HA-sugen fungerar som en dammsugare, där sedimentet filtreras nere på botten och vitmärlor insamlas i en nätpåse. Även om detta inte ger ett kvantitativt mått tas även här fem prov under en bestämd tidsperiod för att ge ett antal parallellprov (replikat) för en statistisk analys. Provtagningsmetodiken finns beskriven i (11). Sedimentproppar för mätning av syre i bottenvatten och sediment, liksom mätning av halten TOC, tas med modifierad kajakhämtare och förborrade plexiglasrör. Fem sedimentproppar insamlas vid varje station. I direkt anslutning till provtagning mäts syrekonsentrationen i bottenvatten, redoxpotential samt konsentrationen fria sulfider i sedimentet. Syrekonsentrationen mäts i vattenytan strax ovan sedimentytan med

¹ N, NE, E, SE, S, SW, W, NW

hjälp av syremätare (Oxi 323-B Christian Berner). Mätning och kalibrering utförs enligt SS-EN 25814 och SS-EN 25813. Redoxmätningarna utföres enligt överenskommen östersjö-standard för undersökningstyperna om mjukbottenlevande makrofauna (1). Mätningarna görs i de förborrade sedimentrören med hjälp av pH/jonmeter (Radiometer PHM 95) och jon-selektiva elektroder (platinaelektrod för redoxmätningar) samt referenselektrod (calomel) på varje cm ned till 10 cm i sedimentet (enligt 1). Svavelväte (H_2S) mäts med en H_2S -mikroelektrod (Unisense, Århus, Danmark) kopplad till en picoamperemeter (Unisense PA2000). För beräkning av den totala sulfidkoncentrationen (enligt 2, 4, 5) behöver även pH bestämmas. pH mäts med en pH-mikroelektrod (Unisense) kopplad till en pH-meter (Radiometer PHM 95). Syre i sedimentet mäts med en syremikroelektrod (Unisense) kopplad till en picoamperemeter (Unisense PA2000) (enligt 7, 6, 3).

Utrustningslista

Provtagningsutrustning och kemisk analysutrustning,

Fast utrustning med avskrivningskostnader: Van Veen-huggare. Kajakhämtare med c:a 40 plexiglasrör och stoppers, samt snittningsapparat. HA-sug för svåra isförhållanden. Konduktivitetsmätare. Rostfria såll, sållbord, kajakrörshållare. För redox-, sulfid- samt syremätning krävs pH-meter/jonmeter, syremätare, pipettfyllare, automatpipetter (Gilson) och titrerutrustning .

Rörliga kostnader:

Proppar till kajakrör, Ag/AgS-elektroder, referenselektrod (calomel), platinaelektroder, pH-elektroder, mätkolvar samt övriga glasvaror, kemikalier och backar. Möjliga fordon är båt försedd med hydraulvinsch (isbrytarklass 1 i Bottniska viken) och skoter, bensindrivet elaggregat för hantering av HA-sug från is samt isborr. Dessutom tillkommer kostnader för biltransport, båttransport, övernattningskostnader samt traktamente i samband med provtagning.

Biologisk analysutrustning

Fast utrustning med avskrivningskostnader:

Stereomikroskop med god upplösning (Leica M 10 eller Leica Z 12 med underbelysning och överbelysning samt polarisationsfilter) samt kameradel för fotodokumentation (filmkassett, databakstycke samt fotoautomat), 2 st kalljuskällor för mikroskopbelysning, datoriserad bildanalysutrustning, CD-brännare för lagring av bilder, objektbord, dissektionsbestick, små rostfria såll och tråg.

Rörliga kostnader är mikroskoplampor, plastburkar, petriskålar, glasvaror, håvar, film, samt kostnader för framkallning och kopiering.

Tillvaratagande av prov, analysmetodik

Den biologiska analysen görs på levande djur under stereomikroskop (Leica M 10 med polariserat kalljus, fotoautomat samt databakstycke), där äggen friprepareras och analyseras med avseende på tidigare beskrivna variabler (11). Den vuxna honan granskas med avseende på förekomst av parasiter, missbildningar och sjukdomar. Vid analysen av embryon är det väsentligt att arbeta under kalljus. En varm underbelysning kan medföra att membraner påverkas och embryon spricker. Vid prepareringen och framför allt förvaring av fripreparerade embryon måste det vatten som används ha en salthalt på 7–9 PSU, eftersom en lägre salthalt kan medföra att embryot tar upp vatten och får ödem eller vid kraftig utsötning spricker. För att kontrollera kläckningsfrekvens av analyserade embryon är det möjligt att under några veckor förvara ägg och embryon i kylskåp. Det måste emellertid påpekas att det finns stor risk

för svampangrepp och bakterieangrepp, varför täta vattenbyten är nödvändiga och stor noggrannhet krävs vad avser rena kärl och inkubationsvatten.

Kemisk analysmetodik: TOC-mätningar utförs vid Institutionen för systemekologi vid Stockholms universitet och metodiken är ackrediterad enligt Swedac.

Fältprotokoll

Se bilaga 1.

Bakgrundsinformation

Bakgrundsinformation om klimatfaktorer som vattentemperatur och salthalt på olika djup, samt data från undersökningstyperna om bottenlevande makrofauna vad gäller vitmärlans individtäthet och biomassa kan vara värdefulla, eftersom effekter på vitmärlans reproduktion kan ge effekter på populationstätheten. Information om primär- och sekundärproduktion samt halter av klorofyll och organiskt kol under de olika produktionsperioderna är värdefull, eftersom vitmärlan framför allt livnär sig på sedimentterande material från vårbloomingen. Dessa uppgifter kan därför ge information om tillväxten, vilken i sin tur styr fekunditeten, vilken har betydelse för produktion och individtäthet hos vitmärla. Dessutom kan information om sedimenthalter av olika miljögifter på provtagningsstationerna underlätta tolkningsförfarandet.

Kvalitetssäkring

Personer som skall utföra undersökningen bör ha god kännedom om bottenfaunan i Egentliga Östersjön och Bottniska viken, samt erfarenhet av sedimentprovtagning med dels van Veen-huggare, dels Kajakhämtare. För den biologiska analysen krävs kännedom om embryo-utveckling hos märkräftor samt träning i att analysera vitmärlaembryon. Kvalitetssäkring sker kontinuerligt genom att olika utförare bestämmer ca 50 äggkullar för att kontrollera graden av felprocent (se 11). Vid kalibrering av elektroder för redoxmätningar används östersjöstandard (enligt 1). Portabel syremätare för mätning av syre i bottenvatten kalibreras enligt svensk standard SS-EN 25814, och 25813. Elektroder kalibreras enligt respektive manualer (se kapitlet om provtagningsmetodik).

Databehandling, datavärd

Ett medelvärde per hugg beräknas för respektive variabel. Den vidare analysen baserar sig på dessa medelvärden (fem hugg per station och år). Till databasen levereras emellertid rådata enligt datavärdens önskemål.

Tabell 1 innehåller standardiserade begrepp för entydig och jämförbar dataregistrering. Den ger dessutom tips om en struktur för hur lagringen kan ske.

En förteckning över datavärden finns att hitta på Naturvårdsverkets webbplats under adressen <http://www.naturvardsverket.se/tillstandet-i-miljon/miljoovervakning/miljoovervakningsdata/>

Rapportering, utvärdering

Några förslag på enkla presentationer:

- Andelen missbildade ägg och embryon på recipients- och referensstationer med 95 % konfidensintervall.
- Andelen odifferentierade ägg och embryon, osv.

Målsättningen med undersökningen är att visa skillnader i skadebild mellan olika stationer i tid och rum samt, om så är fallet, särskilja vilken karaktär skadorna har i olika områden. Långa tidsserier ger information om den naturliga variationen, vilket är väsentligt vid bedömningen av miljö kvalitetsnormer. Målet är att upptäcka en årlig femprocentig förändring av andelen missbildade embryon. Vidare är målsättningen att kunna urskilja effekter som orsakas av miljögifter från de som orsakas av syrebrist och förekomst av sulfider samt förändringar i temperatur och salthalt. Genom att knyta an till olika stödvariabler som mäts inom andra program – t.ex. vitmärlans individtätthet och primärproduktion samt vattentemperatur i det aktuella området, – kan förståelsen ökas om vilka variabler som påverkar äggproduktionen och individtäteten hos vitmärlan.

Kostnadsuppskattning

Fasta kostnader

Avskrivningskostnader per år under fem år för nyinköpt utrustning:

- Lupp med stativ samt ljuskälla 120 000 kr
- Bildanalysator 50 000 kr
- Syremätare 15 000 kr
- Plexiglasrör och stoppers 27 500 kr,
- Mikromanipulator till syreelektrod 20 000 kr.

Summa avskrivningskostnad per år = 46 000 kr

Material- och resekostnader beräknades i januari 2001 att uppgå till ca 700 kr per prov (fartygskostnader ej inräknat).

Analyskostnader

I januari 2001 var den genomsnittliga kostnaden för biologisk och kemisk analys ca 2700 kr per prov.

Tidsåtgång

I genomsnitt krävs 12 timmars arbetstid fr.o.m. provtagning t.o.m. analys för varje provhugg (taget med 0,1 m² van Veen-huggare eller Kajakhämtare) beroende på individtätthet.

Kontaktpersoner

Programområdesansvarig, Naturvårdsverket:

Tove Lundeberg

Enheten för farliga ämnen och avfall

Naturvårdsverket

106 48 Stockholm

E:post: Tove.Lundeberg (a) naturvardsverket.se, Tel: 010-698 16 11

Version 1:3, 2005-09-23

Experter, ITM

Brita Sundelin

Tel: 08-674 72 35.

E-post: brita.sundelin@itm.su.se

Ann-Kristin Eriksson-Wiklund

Tel: 08-674 72 51.

E-post: annkristin.eriksson@itm.su.se

Institutet för Tillämpad Miljöforskning (ITM)

Stockholms universitet

106 91 Stockholm

Referenser

Metodreferenslista

1. Bågander L-E. 1976. Redox measurements in natural waters and sediments. *In*: Dybern B, Ackefors H, Elmgren R, eds. Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Publication / The Baltic Marine Biologists -BMB 1, app. 4:1, 41-50.
2. Cline J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol & Oceanogr* 14:454-458.
3. Gundersen J.K., Ramsing, N.B & Glud, R.N. (1998) Predicting the signal of O₂ microsensors from physical dimensions, temperature salinity and O₂ concentration. *Limnol & Oceanogr* 43(8):1932-1937.
4. Jeroschewski P, Steukhart, C. & Kühl, M. (1996) An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Anal Chem* 68:4351-4357.
5. Kühl M, Steukhart, C. Eickert, G. & Jeroschewski, P. (1998) A H₂S microsensor for profiling biofilms and sediments : application in an acidic lake sediment. *Aquat Microb Ecol* 15: 201-209.
6. Revsbech NP & Jøregensen, B.B. (1986) Microelectrodes: Their use in microbial ecology. *In*: Marshall KC (ed) *Advances in microbial Ecology* vol 9. Plenum New York. P. 293-352.
7. Revsbech NP (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol & Oceanogr*. 34(2): 474-478.
8. SS-EN 25813 Vattenundersökningar – Bestämning av halten löst syre – Jodometrisk metod. – Stockholm : SIS, 1993. (Svensk standard ; SS-EN 25813)
9. SS-EN 25814 Vattenundersökningar – Bestämning av halten löst syre – Elektrokemisk metod. – Stockholm : SIS, 1993. (Svensk standard ; SS-EN 25814)
10. Sundelin, B.& Eriksson, A-K. (1995). Effekter på embryonalutvecklingen hos vitmärkla (*Monoporeia affinis*) i Vättern. *In*: Miljöövervakning Vättern : förslag till program och undersökningstyper 93/94 och 94/95. Rapport från Vätternvårdsförbundet 36, p. 117-130.
11. Sundelin, B. & Eriksson, A-K. (1998). Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171: 165-180.

Rekommenderad litteratur

12. Andersin, A-B., Lassig, J., Sandler, H. (1984). On the biology and production of *Pontoporeia affinis* Lindström in the Gulf of Bothnia. *Limnologica* 15(2): 395-401
13. Andersin, A-B., Lassig, J., Parkkonen, L., Sandler, H. (1978). Long-term fluctuations of the soft bottom macrofauna in the deep areas of the gulf of Bothnia 1954-1974; with special reference to *Pontoporeia affinis* Lindström (Amphipoda). *Finnish Marine Research No. 244* 137-144
14. Bregazzi, P. K. (1973). Embryological development in *Tryphosella kergueleni* (Miers) and *Cheirimedon femoratus* (Pfeffer) (Crustacea: Amphipoda) *Bulletin / British Antarctic Survey* 32: 63-74
15. Cedervall, H. (1977). Annual macrofauna production of a soft bottom in the Northern Baltic proper. *In: B. F. Keegan, P.O. Ceidigh, D. J. S. Baade (eds.) Biology of benthic organisms : 11th Eur. Mar. Biol. Symp. Pergamon press, Oxford. 155-164*
16. Conlan, K. E. (1994). Amphipoda crustaceans and environmental disturbance: a review. *Journal of Natural History* 28: 519-554
17. Davis, G. E. (1993). Design elements of monitoring programs: the necessary ingredients for success. *Environmental Monitoring and Assessment* 26: 99-105
18. Davey, K. G., Saleuddin, A. S. M., Steel, C. G. H., Webb, R. A. (1983). Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive function, Invertebrates: Some principals and recommendations. *In: Vouk, V. B., Sheehan, P. J. (eds.) Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive functions. SCOPE reports 20, John Wiley & Sons, Ltd p. 483-497*
19. Donner, K. O. (1971). On vision in *Pontoporeia affinis* and *P. femorata* (Crustacea, Amphipoda). *Societas scientiarum Fennica. Commentationes biologicae* 41, p. 3-17
20. Donner, K.O., M. Lindström, A. Lindström. (1987). Seasonal variation in the vertical migration of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda) *Ann. Zool. Fennici* 24:305-313.
21. Elmgren, R., Hansson, S., Larsson, U., Sundelin, B., Boehm, P. (1983). The "Tsesis" oil spill : acute and long-term impact on the benthos. *Mar. Biol.* 73, 51-65.
22. Eriksson, A-K., Sundelin, B., Broman, D., Näf, C (1996). Effects on *Monoporeia affinis* of HPLC-fractionated extracts of bottom sediments from a pulp mill recipient. *In: Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents. Servos et al (eds), St Lucie Press Florida, p. 69-78.*
23. Eriksson-Wiklund, A-K. B. Sundelin (2001). Impaired reproduction of the amphipods *Monoporeia affinis* and *Pontoporeia femorata* as a result of moderate hypoxia and increased temperature. *Mar Ecol Prog Ser* 171:165-180.
24. Hill, C. (1991). Mechanisms influencing the growth reproduction and mortality of two co-occurring amphipod species in the Baltic Sea. *Dissertation, University of Stockholm*
25. Hill, C. (1992). Seasonal changes in lipid content and composition in the benthic amphipods *Monoporeia affinis* and *Pontoporeia femorata*. *Limnol. Oceanogr.* 37 (6): 1280-1289
26. Lalitha, M., Shyamasundari, K., Hanumantha Rao, K. (1991). Embryological development in *Orchestia platensis* Kröyer (Crustacea:Amphipoda). *Uttar Pradesh J. Zool.* 11 (2): 107-112

Version 1:3, 2005-09-23

27. Lehtonen, K. K. (1994). Metabolic effects of short-term starvation on benthic amphipod *Pontoporeia affinis* Lindström from the northern Baltic Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 176: 269-283
28. Leonardsson, K., Sörlin, T., Samberg, H. (1988). Does *Pontoporeia affinis* (Amphipoda) optimize age at reproduction in the Gulf of Bothnia? Oikos 52: 328-336.
29. Leonardsson, K. (1994). Multiple density dependence in two sub-populations of amphipod *Monoporeia affinis*: a potential for alternative equilibria. Oecologia 97: 26-34
30. Lindström, M., Lindström A. (1981). Swimming activity of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda) - Seasonal variations and usefulness for environmental studies. Anns. Zool. Fenn. 17: 213-219
31. Lindström, M. (1992). The migration behaviour of the amphipod *Pontoporeia affinis* (Lindström). Scientific reports / Walter and Andrée de Nottbeck foundation no 7. Dissertation, University of Helsinki
32. Lopez, G., Elmgren, R. (1989). Feeding depths and organic absorption for the deposit-feeding benthic amphipods *Pontoporeia affinis* and *Pontoporeia femorata*. Limnol. Oceanogr. 34(6): 982-991
33. McCahon, C. P., Pascoe, D. (1988 a). Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluations tests: culture and selections of a sensitive life stage. Ecotoxicol. and Environ. Safety 15: 245-252.
34. McCahon, C. P., Pascoe, D. (1988 b). Increased sensitivity to cadmium of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the reproductive period. Aquat. Toxicol. 13: 183-194
35. Rappaport, R. Jr. (1960). The origin and formation of blastoderm cells of gammarid Crustacea. The J. of exp. Zool. vol 144: 43-59
36. Samter, M., Weltner, W. (1904). Biologische Eigentümlichkeiten der *Mysis relicta*, *Pallesiella quadrispinosa* und *Pontoporeia affinis* erklärt aus ihrer eiszeitlichen Entstehung. Zool. Anz. 27(22): 676-694
37. Sarvala, J., Uitto, A. (1991). Production of benthic amphipods *Pontoporeia affinis* and *P. femorata* in a Baltic archipelago. Ophelia 34 (2): 71-90
38. Scholtz, G. (1990). The formation, differentiation and segmentation of the post-naupliar germ band of the amphipod *Gammarus pulex* L. (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). Proc. R. Soc. Lond. B239: 163-211
39. Segerstråle, S. G. (1937). Studien über die Bodentierwelt in südfinnländischen Küstengewässern III. Zur Morphologie und Biologie des Amphipoden *Pontoporeia affinis*, nebst einer Revision der *Pontoporeia*-systematik. Societas Scientiarum Fennica. Commentationes biologicae 7(1): 1-183.
40. Segerstråle, S. G. (1938). Zur Fortpflanzungsbiologie des Amphipoden *Pontoporeia femorata* Kröyer. Societas Scientiarum Fennica. Commentationes biologicae 7 (5): 1-23
41. Segerstråle, S. G. (1959). Synopsis of data on the crustaceans *Gammarus locusta*, *Gammarus oceanicus*, *Pontoporeia affinis* and *Corophium volutator* (Amphipoda Gammaridae). - Societas Scientiarum Fennica. Commentationes biologicae 20(5): 1-23.
42. Segerstråle, S. G. (1967). Observations of summer-breeding in populations of the glacial relict *Pontoporeia affinis* Lindström (Crustacea Amphipoda), living at the greater depths in

the Baltic sea, with notes on the reproduction of *P. femorata* Kröyer. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1:55-64

43. Segerstråle, S. G. (1970). Light control of the reproductive cycle of *Pontoporeia affinis* Lindström (Crustacea Amphipoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 272-275
44. Segerstråle, S. G. (1971 b). Light and gonad development in *Pontoporeia affinis*. In: Crisp, D. (ed.), Fourth Eur. Mar. Biol. Symp. 1969. pp 573-581.
45. Sundelin, B. (1983). Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. Mar. Biol. 74: 203-212.
46. Sundelin, B. (1984). Single and combined effects of lead and cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. In: Ecotoxicological testing for the marine environment. G. Persoone, E. Jaspers, and C. Claus (Eds). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2. p. 237-258
47. Sundelin, B. (1988). Effects of sulphate pulp mill effluents on soft-bottom organisms - a microcosm study. Wat. Sci. Tech. Vol. 20, No. 2, pp. 175-177.
48. Sundelin, B. (1989). Ecological effect assessment of pollutants using Baltic benthic organisms. Tesis, Stockholm University.
49. Sundelin, B. (1992). Effect monitoring in pulp mill areas using benthic macro- and meiofauna. In: Södergren (ed). Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluents : proceedings of a SEPA conference held at Grand Hotel Saltsjöbaden, Stockholm, Sweden, 19-21 November 1991. Rapport / Naturvårdsverket 4031: 371-380.
50. Sundelin, B., Eriksson, A-K. (2001). Mobility and bioavailability of trace metals in sulfidic coastal sediments. Environmental toxicology and chemistry 20(4): 748-756
51. Sundelin, B., Ryk, L, Malmberg, G. (2000) Effects on the sexual maturation of the sediment-living amphipod *Monoporeia affinis*. Environmental toxicology 15(5): 518-526

Uppdateringar, versionshantering

Version 1:2, 2004-01-15. Innehållet i Tabell 1 samt vissa andra ändringar.

Version 1:3, 2005-09-23. Anpassad till miljöövervakningsmetod.

Bilaga 1. Fältprotokoll för provtagning av sediment och vitmärla inom undersökningstypen Missbildade embryon av vitmärla

Station nr: Datum: Kl.:

Fartyg: Expeditionsansvarig:

Positionskoordinater (WGS 84), Longitud O:°.....',

Latitud N:°.....',

Djup:m Vindriktning: Vindhastighet: m/s

Våghöjd: m Övrig väderinformation:

Temperatur bottenvatten: Syrgashalt bottenvatten ovan sedimentytan:

Sedimentbeskrivning:

.....

.....

Biologisk beskrivning av provet:

.....

.....

Svavelvätelukt: Ja Nej

Provtagare	
Kajak corer	
Van Veen-huggare	

Hugg nr:

Övrig information: