

Undersökningstyp - Hälsotillstånd hos kustfisk – biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå

Version 1:1, 2021-06-17

Programområde: Kust och Hav
Handledning för miljöövervakning

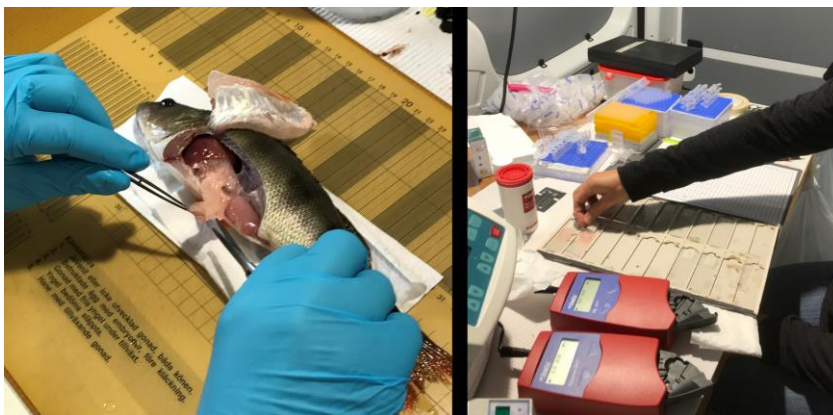


Foto: Las Förlin. Många olika prover däribland lever och muskel tas för att undersöka hur fisken mår i våra kustområden. På bilden till höger hanteras blodet som stryks ut på en liten glasplatta för att kunna bestämma andelen vita blodceller hos fisken. I blodet mäts även om fisken lider av blodbrist eller har rätt sammansättning av salter.

Innehåll

Bakgrund och syfte med undersökningstypen	3
Samordning.....	4
Strategi.....	4
Havsmiljödirektivet.....	5
Helcom.....	6
Ospar.....	6
Statistiska aspekter.....	6
Plats/stationsval.....	7
Mätprogram.....	7
Variabler.....	7
Frekvens och tidpunkter.....	12
Observations/provtagningsmetodik.....	12
Tillvaratagande av prov, analysmetodik.....	13
Fältprotokoll.....	13
Bakgrundsinformation.....	13
Kvalitetssäkring.....	14
Databehandling, datavärd.....	15
Rapportering, utvärdering.....	15
Kostnadsuppskattning.....	16
Författare och övriga kontaktpersoner.....	17
Referenser.....	18
Metodreferenslista.....	18
Rekommenderad litteratur (citerad i texten).....	20
Uppdateringar, versionshantering.....	21
Bilaga 1. Mätvariabler.....	22
Relativ gonadvikt (GSI) och relativ levervikt (LSI).....	22
Konditionsfaktor.....	22
Vita blodceller.....	23
Histologi.....	23
Kolhydratmetabolism.....	24
EROD-aktivitet och CYP1A i lever.....	25
Proteinhalt i lever och muskel.....	25
Antioxidantzymer i lever och oxidativ stress.....	25
Acetylkolinesteras.....	26
Vitellogenin i blodplasma.....	26
Metallotionein i lever.....	27
DNA-addukter i lever.....	27
Koncentrationer av joner i blodplasma.....	27
Bilaga 2. Utrustning för fiskprovtagning.....	28
Bilaga 3. Fältprotokoll – Hälsotillstånd hos kustfisk.....	30

Bakgrund och syfte med undersökningstypen

Miljöövervakning, där biologiska effekter studeras på subcellulär och cellulär nivå, kan användas för att beskriva det allmänna hälsotillståndet hos olika organismer och ger möjlighet att påvisa toxiciteten av okända och kända ämnen i ett undersökningsområde.

Till skillnad mot analyser av ett kemiskt ämne eller ämnesgrupp, med från början känd toxisk effekt, kan studier av biologiska effekter även påvisa toxiciteten av ämnen som ej ingår i ett kemiskt analysprogram eller ämnen med ej tidigare känd toxicitet. Ett kemiskt analysarbete kompletterar effektprogrammet genom att påvisa förekomsten av misstänkta toxiska ämnen i organismen. Det ger även möjlighet att följa tidstrender av kända ämnen med känd toxisk effekt.

Syftet med denna undersökningstyp är att använda väl beprövade och känsliga metoder för att påvisa effekter i fisk av en eventuell storskalig påverkan av toxiska ämnen i kustområden. Undersökningstypen kan också användas vid fiskundersökningar i sjöar och vattendrag. Den sammanlagda effektbilden på fiskens hälsotillstånd ska även kunna beskriva betydelsen av den toxiska påverkan för en populations överlevnad. Sverige har sedan många år använt biokemiska och fysiologiska metoder (så kallade biomarkörer) för att studera hälsoeffekter hos fisk som exponerats för enskilda miljögifter eller avloppsvatten. På så sätt har hälsoundersökningar av fisk avslöjat effekter av miljögifter eller komplexa utsläpp i förorenade recipienter. Det har handlat om vattenområden i närheten av till exempel skogsindustrier, metallindustrier, petrokemiska industrier, större städer eller reningsverk (Larsson *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1988; Ericson *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Sturve *et al.*, 2005; Hansson *et al.*, 2014; Asker *et al.*, 2015; Asker *et al.*, 2016). Metodernas känslighet är därför väl dokumenterade och har en av sina främsta fördelar i att de kan ge ett svar på förekomst av toxiska ämnen i vattenmiljön. En annan fördel är att den påvisade effektbilden hos fiskar i ett vattenområde kan konfirmeras genom uppföljande laboratorieexperiment där fiskar exponeras för de aktuella kemiska ämnena. Därigenom kan observerade effekter knytas till ett visst kemiskt ämne eller blandningar av flera ämnen.

Målsättningen med undersökningstypen är att:

- kunna beskriva det aktuella tillståndet i vattenmiljön i referensområden avseende effekter av främst toxiska ämnens påverkan på hälsotillståndet hos fisk
- kunna beskriva tillståndet i områden med påverkad miljö
- genom årliga undersökningar på fasta stationer följa tidstrender av biokemiska, fysiologiska, histologiska och patologiska effektvariabler hos fisk, och därigenom kunna påvisa långsiktiga förändringar av miljö tillståndet i undersökningsområdet
- genom regelbundna undersökningar i opåverkade områden tillhandahålla referensdata för undersökningar på fisk i regionalt och lokalt påverkade områden
- kunna upptäcka nya miljöhot till följd av utsläpp av kända eller okända kemikalier
- kunna följa upp nationella och regionala miljö kvalitetsmål (främst *Giftfri miljö; Hav i balans samt levande kust och skärgård; Ingen övergödning*)

- kunna ge underlag för åtgärder främst när det gäller utsläpp av kemiska ämnen i vattenmiljön
- kunna följa effekter av vidtagna åtgärder för att minska kemikalieutsläpp
- genom samordning med undersökningar av fiskbeståndens utveckling och förekomst av miljögifter kunna skapa en god förklaringsmodell för hur toxiska ämnen kan inducera tidiga effekter på cell- och individnivå, som i sin tur ger upphov till störningar av integrerade biologiska funktioner (tillväxt, fortplantning, beståndsutveckling) av betydelse för ekosystemet.

Samordning

Samordning sker med övriga två undersökningstyper som berör fisk, dels *Metaller och organiska miljögifter i fisk* och dels *Beståndsövervakning, provfisk*. Därmed fås en sammanhållen Integrerad fiskövervakning. Det innebär att arbetet integreras med undersökningar av beståndstäthet och beståndsstruktur (SLU på uppdrag av Havs- och vattenmyndigheten), samt metall- och miljögiftsanalyser hos fisk (NRM m.fl. på uppdrag av Naturvårdsverket). Med stöd av integrerad kustfiskövervakningen bör man kunna utveckla en förklarande modell för hur en antropogen belastning kan inducera tidiga effekter på viktiga biologiska funktioner på cellnivå (t.ex. biokemiska processer, cellförändringar), vilka i sin tur kan leda till störningar på organismnivå (t.ex. tillväxt och reproduktion) och slutligen på ekosystemnivå.

Olika undersökningar på tånglake kan ske i gemensamma provtagningsområden vid samma tidpunkter på året. Motsvarande gäller för abborre och skrubbskädda. Denna samordning medför minskade kostnader för fångst och provtagning. Dessutom kan miljöövervakningsdata på kustfisk från de olika undersökningarna bli föremål för en sammanvägd tolkning, vilket ger en bättre helhetsbild av fiskbeståndens status (Sandström et al. 2005).

Strategi

Undersökningstypen bygger på erfarenheter av årliga provtagningar och analyser av stationära fiskarter vid samma tidpunkt och vid samma kuststationer varje år. Långa mätserier ger representativa och kvalitetssäkrade data som ger en god beskrivning av eventuella förändringar av tillståndet i miljön avseende effekter av främst antropogena ämnen.

Hälsan hos fisk bör mätas med ett antal väl beprövade och känsliga biokemiska, fysiologiska, histologiska och patologiska variabler, såsom biomarkörer (Adams et al., 1989; Hugget, 1989), som presenteras i tabell nedan och i Bilaga 1. De valda variablerna ger en god bild av fiskens hälsotillstånd genom att de speglar viktiga livsfunktioner, såsom immunförsvar, leverfunktion, metabolisering av miljögifter, jonbalans, ämnesomsättning och fortplantning. Genom att använda ett sådant brett batteri av biomarkörer kan tidiga subletala störningar upptäckas hos fisk som exponeras för kemiska ämnen (Larsson et al., 1985; Förllin et al.,

1986; Andersson et al., 1988; Hansson et al., 2014). Den primära gifteffekten, som sker på subcellulär nivå i form av en biokemisk eller fysiologisk förändring, induceras snabbt i organismen. Dessa effekter kan utvecklas vidare till störningar på högre biologiska organisationsnivåer i organismen, t.ex. i form av förändringar av celler och organ (histologiska förändringar), vilka i sin tur kan leda till vitala störningar av fortplantning, tillväxt och överlevnad. Genom att göra en sammanvägd tolkning av erhållna resultat med data från övriga undersökningstyper inom den integrerade fiskövervakningen fås möjlighet att korrelera biomarkörerna till giftbelastning och känsliga ekologiska variabler, t.ex. reproduktionsframgång och tillväxt (Sandström et al. 2005).

Metoderna kan i princip tillämpas på samtliga fiskarter från alla typer av akvatiska biotoper. Genom att välja indikatorarter, såsom abborre, tånglake och skrubbskädda, vilka har ett stationärt levnadssätt och förekommer i tillräckligt stor mängd året runt, kan man försäkra sig om en undersökningsmetod som är möjlig att återupprepa och som speglar förhållanden i det aktuella undersökningsområdet. Abborren förekommer längs hela Östersjökusten och i insjöar, medan tånglaken är spridd utmed hela den svenska kuststräckan såväl som runt Nordeuropas kustområden till Frankrike. Skrubbskädda som har använts för studier av fiskhälsa internationellt under flera decennier har även börjat användas som indikatorart i svenska undersökningar. Skrubbskädda har en stor utbredning och är vanligt förekommande i Östersjön och Nordsjön. All tre arter är alltså väl lämpade för studier av geografiska skillnader. Tånglaken är dessutom speciellt väl lämpad för undersökningar av det känsligaste stadiet under organismens livscykel, d.v.s. det embryonala stadiet samt larvstadiet, vilket möjliggör relevanta uppföljningsstudier. De tre arterna är också lämpade för samordning mellan regional och nationell miljöövervakning. I Sverige är miljöövervakning återkommande och systematiskt upplagda undersökningar som följer upp miljös tillstånd. Vad som övervakas styrs av uppsatta miljömål, krav i lagstiftning och EU-direktiv, och Sveriges åtaganden inom internationella konventioner. Internationella marina övervakningsfrågor, som ställer krav på svensk miljöövervakning, hanteras framför allt i de regionala konventionerna för skyddet av Östersjöns (Helcom) respektive Nordostatlantens (Ospar) marina miljöer samt av havsmiljödirektivet 2008/56/EG.

Havsmiljödirektivet

I svensk lagstiftning är Havsmiljödirektivet implementerat genom havsmiljöförordningen. Följande ska övervakas:

- *Geografisk och tidsmässig variation per art eller population:*
 - *fördelning, abundans och/eller biomassa*
 - *reproduktionsförmåga, överlevnadstal och dödlighet/skadefrekvens*

Även miljöeffekter av farliga ämnen ingår i deskriptor 8 och det sekundära kriteriet D8C2 enligt Kommisionsbeslutet: *Arternas hälsa och livsmiljöernas tillstånd (t.ex. deras artsammansättning och relativa abundans på platser med kronisk förorening) påverkas inte negativt på grund av främmande ämnen, inklusive kumulativa och synergistiska effekter.*

Måttenhet: D8C2: *Abundans (antal individer eller andra lämpliga enheter som överenskommit på regional eller delregional nivå) per art som påverkas.*

Helcom

Som part i Helsingforskonventionen ska Sverige delta i arbetet med att skydda Östersjön samt följa de rekommendationer som tas fram inom konventionen. Övervakning av fiskhälsa ingår inte i HELCOM Monitoring Manual.

I Baltic Sea Action Plan (BSAP) bidrar data på miljöeffekter av farliga ämnen till att följa upp mål under tema Hazardous substances; *Healthy wildlife* samt *Concentrations of hazardous substances close to natural levels*.

Ospar

Som part i Osparkonventionen ska Sverige delta i arbetet med att skydda den marina miljön i Nordostatlanten samt följa de rekommendationer som tas fram inom konventionen.

Övervakning av fiskhälsa är inte obligatoriskt inom CEMP (OSPAR's Coordinated Environmental Monitoring Programme) men vissa av variablerna som övervakas i Sverige inom Kustfisk hälsa finns inkluderade under generella biologiska effekter som övervakas på frivillig/temporär basis av medlemsländerna inom Ospar.

Statistiska aspekter

Fiskarnas fysiologiska status är, utöver en eventuell antropogen belastning, påverkat av en rad olika abiotiska faktorer som t.ex. klimat, hydrografi, syre och salinitet. Fysiologiska funktioner står dessutom under inflytande av biotiska faktorer såsom ålder, storlek, könsstatus, näringsstatus, och parasitism. Samtliga dessa faktorer bidrar till den biologiska spridningen och kan därmed försvåra möjligheten att påvisa eventuella signifikanta skillnader mellan fiskgrupper från olika undersökningsområden eller att påvisa signifikanta tidstrender inom de olika områdena.

För att minimera den biologiska spridningen är undersökningarna upplagda så att nämnda naturliga faktorer har en så liten påverkan som möjligt och är likvärdiga inom fiskgrupperna i undersökningsområdena. För att undvika årstidsberoende faktorerers inverkan på resultatet så sker de årliga provtagningarna på de respektive fiskarterna under samma vecka varje år. Köns- och storleksberoende variationer minimeras genom att bara könsmogna honfiskar i ett

bestämt storleksintervall studeras vid varje provtagningsområde. Om även hanfisk studeras ska resultaten för hon- och hanfisk redovisas separat.

För alla tre fiskarter, abborre, tånglake och skrubbskädda, rekommenderas att analysen omfattar 20 individer av honkön från varje provtagningsstation och i förekommande fall 10 individer av hankön. Antalet fiskar är baserat på tidigare erfarenheter från både fältundersökningar på fiskar i recipienter med påverkad miljö och laboratorieförsök med fiskar exponerade för kemiska ämnen enskilt eller i komplexa blandningar eller fältundersökningar (Larsson et al., 1985; Andersson et al., 1988; Hanson et al., 2014). Enligt dessa erfarenheter kunde beräknas att det krävdes 20-25 individer (olika från fall till fall) för att man med konventionella statistiska metoder skulle kunna säkerställa eventuella skillnader mellan stationer eller år. Antalet är baserat på de valda mätvariablerna.

Plats/stationsval

Mätprogrammet kan tillämpas både på nationell, regional och lokal nivå. Genom att lägga lokalerna i opåverkade områden får man mått på eventuell storskalig påverkan av allmänt spridda antropogena substanser. Om syftet är att studera effekterna av mer begränsade, lokala utsläpp bör ett lämpligt antal stationer placeras längs en gradient från den lokala utsläppskällan. Dessutom väljs minst en referenslokal som har en biotop som, så långt det är möjligt, efterliknar recipientens. Ytterligare en viktig aspekt på val av provtagningslokal är lokalens närhet till lämplig plats för sumpning av fisk och tillvaratagande av prover. Se vidare under Observations/provtagningsmetodik.

Mätprogram

Provtagnings- och analysmetoderna har huvudsakligen utvecklats och prövats under flerårig forskningsverksamhet av forskare vid Göteborgs universitet och tidigare även av forskare aktiva vid Stockholms universitet. Utarbetandet av dessa metoder har även skett i samråd med internationella forskare aktiva inom området akvatisk ekotoxikologi.

Variabler

Då det nationella delprogrammet Kustfisk hälsa startade år 1988 gjordes ett urval av variabler som huvudsakligen grundade sig på följande kriterier: hög känslighet för de effekter som man avsåg att studera, väl dokumenterade metoder med god tillgång till jämförelsedata från tidigare studier, samt kostnadseffektiva metoder. En utveckling sker dock kontinuerligt genom framtagandet av nya och känsligare variabler. De mätvariabler som ingår i undersökningstypen presenteras i nedanstående tabell. En utförlig beskrivning av de olika mätvariablerna finns i Bilaga 1.

*Hälsotillstånd hos kustfisk -
Biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå
Version 1:1, 2021-06-17*

<i>Företeelse</i>	<i>Mätvariabler</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Prioritet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens</i>
abborre (a), tånglake (b), skrubba (c)	Total längd	mm	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 7, 17
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Total vikt	g	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 7, 17
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Somatisk vikt	g (tot vikt - gonadvikt)	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Somatiskt index; Konditions- faktor	g/cm ³ 100 x (total vikt)/(längd i cm) ³	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Gonadvikt	g	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1,7, 17
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Gonado- somatiskt index (GSI)	100 x (gonad vikt/ total vikt)	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Lever- somatiskt index (LSI)	100 x (lever vikt/ total vikt)	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1,7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Levervikt	g	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 7, 17
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) otolit	Ålder	År	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	12

*Hälsotillstånd hos kustfisk -
Biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå
Version 1:1, 2021-06-17*

<i>Företeelse</i>	<i>Mätvariabler</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Prioritet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens</i>
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Kön	Hane, Hona	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1,7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c)	Yttre sjukdomar, Skador		1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1,7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) lever	Parasit- angrepp		1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1,7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Bit av lever och mjälte samt gonad och tarm till provbank	Histologi Lever Nekrotiska och degenererade celler Makrofag- centra, förekomst Mjälte Makrofag- centra, förekomst		2, 3	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Helblod	Differential- räkning av Andel vita blodceller Andel lymfocyter Andel granulocyter Andel trombocyter	%	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 13, 17, 19
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Helblod	Hematokrit	%	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 6

*Hälsotillstånd hos kustfisk -
Biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå
Version 1:1, 2021-06-17*

<i>Företeelse</i>	<i>Mätvariabler</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Prioritet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens</i>
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Helblod	Blodglukos	mmol/l blod	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	2, 3
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Helblod	Hemoglobin	g/l blod	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	20
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Blodplasma	Blodlaktat	mg/100ml blodplasma	2	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 6
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever. mikrosomer	EROD (etoxyre- sorufin-O- deetylase)	pmol/mg protein, minut	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 4, 8
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever, mikrosomer och cytosol Muskel S9	Protein	mg protein/g lever (våtvikt) (Redovisas ej)	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	14
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever, cytosol	GR (glutation- reduktas)	nmol/mg protein, minut	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	22, 23
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever, cytosol	GST (glutation-S- transferas)	nmol/mg protein, minut	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	22, 23
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever, cytosol	Katalas	µmol/mg protein, minut	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	22, 23
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Muskel, S9	AChE (acetylkolin- esteras)	nmol/mg protein, minut	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec	21

*Hälsotillstånd hos kustfisk -
Biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå
Version 1:1, 2021-06-17*

<i>Företeelse</i>	<i>Mätvariabler</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Prioritet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens</i>
				(c) aug	
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Blodplasma	Vitellogenin	ng/ml	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	11, 16
abborre (a), tånglake (b) Lever Provbank	MT (metallo- thionein)	nmol/mg protein	3	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	10
abborre (a), tånglake (b) Lever Provbank	DNA- addukter	nmol/mol	3	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	7
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Blodplasma	Kloridjoner	mmol/L	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 9
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Blodplasma	Natriumjoner	mmol/L	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 9
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Blodplasma	Kaliumjoner	mmol/L	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 9
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Blodplasma	Kalciumjoner	mmol/L	1	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	1, 9
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Galla, Provbank			3	Årligen (a) sep (b) nov/dec (c) aug	
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Fisk Provbank	Halter av miljögifter		3		Eventuell analys enligt annan undersök- ningstyp

<i>Företeelse</i>	<i>Mätvariabler</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Prioritet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens</i>
Vatten	Temperatur	Celsius	2		
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever, mikrosomer	Cytokrom P-450-halt	nmol/mg protein	Utgått fr o m 2000 4		15
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Lever	Lever- glykogen	mg/100mg vävnad	Utgått fr o m 2000 4		1, 6
abborre (a), tånglake (b) skrubba (c) Muskel	Muskel- glykogen	mg/100mg vävnad	Utgått fr o m 2000 4		1, 6

Mätvariablerna har olika prioritet. Prioritet 1 betyder att variabeln alltid mäts. Prioritet 2 innebär att mätvariabeln mäts ibland (vid behov). Prioritet 3 innebär att prover bankas för att möjliggöra framtida mätningar. Prioritet 4 innebär att variabeln utgått.

Frekvens och tidpunkter

För att undvika årstidsberoende variationer, vilket kan medföra stor spridning i resultaten, ska den årliga provtagningen ske vid en och samma tidpunkt varje år. För abborre är det lämpligt att provtagningen sker på hösten då fisken har låg sexuell aktivitet och då tillgången på fisk är god. För tånglake där honorna har avkomman i en yngelsäck är det lämpligt att provtagningen sker sent under hösten. Detta möjliggör studier av reproduktionskapacitet och status hos avkomman vilket sker i en annan undersökningstyp. Abborre fiskas lämpligen med nät under september och tånglake med ryssja under november/december. Även skrubbskädda fiskas med nät under slutet av augusti.

Observations/provtagningsmetodik

Endast köns mogna fiskar inom ett bestämt storleksintervall, 20-30 cm, används för att minimera storleksberoende variationer. 20 honor och 10 hanar från varje provtagningsstation insamlas och analyseras. På honor görs ett fullständigt analysprogram medan på hanar görs i regel ett reducerat antal analyser. För att undvika könsberoende variationer behandlas resultaten från honor och hanar separat. Fångst av fisken sker på ett standardiserat och skonsamt sätt med nät för abborre och skrubbskädda och ryssja för tånglake. Direkt efter fångst förs fisken i fisktransportkärl till sumpningsplats. Före provtagning bör fisken förvaras i träsumpar under 2-4 dygn för återhämtning efter fångststress.

Vid provtagning bedövas fisken omedelbart efter hämtning från sumpen. Provtagningen sker därefter i så nära anslutning till sumpningsplatsen som möjligt (max. 100 m från fisksumpen). Provtagningslokalen ska ha tillgång till elektricitet och vara så utrustad att en provtagning kan

ske under bekväma former. Ett lämpligt utrymme kan vara en fiskebod eller annat uthus, ett garage eller någon form av mobilt utrymme. Den totala tiden för hela provtagningen från hävning av fisken ur sumpen till dess att samtliga prover omhändertagits och djupfrysats skall understiga 10 minuter per fisk.

Vid provtagningen sker först en blodprovstagning, följt av mätning av kroppsvikt och total längd. Vid den efterföljande dissektionen för att ta prover på inre organ görs en okulärbesiktning av varje fiskindivid och eventuella yttre eller inre defekter (t.ex. fenskador, hudskador, sår, tumörer och missbildningar av inre organ) noteras. Uttagna blodprover djupfrysas på kolsyreis, och organprover för mätning av biokemiska och fysiologiska variabler djupfrysas i flytande kväve, eller för mätning av histologiska variabler placeras de i fixerlösning omgående för senare analys på laboratorium. För mätvariablerna hematokrit, hemoglobin och blodglukos sker analys direkt i samband med provtagningen.

Provtagningsmetodik, inklusive nödvändig utrustning, finns närmare beskriven i publicerade rapporter (Dave et al., 1975; Larsson et al., 1985; Andersson et al., 1988; Ericson et al., 1998; Ronisz et al. 2005; Weichert et al., 2020).

Nödvändig utrustning för fältprovtagning på fisk beskrivs i metodreferenserna (nr 1, 6, 7 och 9). En fullständig utrustningslista för fiskprovtagning ges i Bilaga 2.

Tillvaratagande av prov, analysmetodik

Proverna transporteras djupfrysade (i flytande kväve eller på kolsyreis) eller i fixerad form till laboratorium, där de upparbetas och analyseras under det närmaste halvåret efter provtagning. För vissa prover, såsom leverprover för mätning av enzymaktiviteter, sker upparbetning och analys relativt omgående efter ankomst till laboratoriet.

För de flesta biokemiska/fysiologiska variablerna finns idag begränsade ekonomiska resurser för att tillförlitligt kunna spara och förvara prover under tidsperioder av decennier i en provbank. För histologiska analyser kan däremot fixerade och paraffin-inbäddade prover förvaras i en bank till låg kostnad.

Samtliga biokemiska, fysiologiska, histologiska och patologiska mätvariabler analyseras på ett standardiserat sätt enligt utarbetade metodanvisningar (se metodreferenslistan).

Fältprotokoll

Vid fältprovtagningarna kan användas ett protokoll (se Bilaga 3) där observationer och analyser som görs direkt vid provtagningen noteras.

Bakgrundsinformation

En viktig orsak till valet av arterna abborre och tånglake och senare även skrubbskädda är att det finns omfattande historiska mätserier, vilket möjliggör jämförelser i tid och rum. Detta ger

en viktig bakgrundsinformation då de insamlade resultaten skall sättas i relation till vad som är naturligt och vad som är antropogen påverkan.

I det nationella miljöövervakningsprogrammet (Programområde Kust och Hav) diskuteras och utvärderas erhållna data från fiskhälsoundersökningarna inom ramen för integrerad kustfiskövervakning tillsammans med insamlade data från delprogrammen *Metaller och organiska miljögifter i biologiska prov* och *Beståndsövervakning, provfisk*. Därmed möjliggörs en sammanvägd tolkning av miljötillståndet avseende fiskhälsa, fiskbeståndens täthet och struktur, fiskens tillväxt och kondition, samt miljögiftsbelastning (se Mustamäki et al., 2020). I andra program finns givetvis möjligheten till samtolkning med dessa data under förutsättningen att samma arter och sammansättning av undersökningsmaterial samt tidpunkt för fiskfångst tillämpas (Förlin et al., 2019).

Informationen från andra delprogram avseende omvärldsfaktorer i respektive undersökningsområde, såsom salthalt, siktdjup, näringstillförsel, och meteorologiska data, utgör också värdefulla komplement i samband med tolkningen av de egna resultaten.

Kvalitetssäkring

För delprogrammet *Kustfisk hälsa* är det av största vikt är att fångst, provtagningsprocedurer, analyser och datahantering sker på ett standardiserat sätt och följer utarbetade metodanvisningar.

Några grundläggande kvalitetskrav listas nedan för de ingående huvudmomenten: insamling av fisk, provtagning, analys samt databearbetning och utvärdering. Dessutom redovisas andra viktiga förutsättningar och rutiner för kvalitetssäkring för att erhålla tillförlitliga resultat.

Insamling av fisk. Fisket skall utföras av personer med god kunskap om det geografiska området där fisket sker och som har erfarenhet av nätfiske/ryssjefiske. Personerna ska även ha god kännedom och förståelse för syftet med undersökningen så att fisken hanteras på ett sätt som uppfyller de krav som analyserna har på materialet. Instruktioner ses över kontinuerligt och delges nya medarbetare.

Provtagning. Provtagningsförfarandet skall utföras av personer som har en god erfarenhet av denna typ av provtagning och analys. Provtagningarna sker på ett standardiserat sätt enligt utarbetade metodanvisningar. Beroende på erfarenhet krävs 3-4 personer för att genomföra hela förfarandet inom den givna tidsramen (10 min.). Transport av prover till laboratorium/provbank skall ske enligt ett rutinemässigt förfarande.

Analys. De ingående analyserna sker enligt utarbetade metodbeskrivningar och kräver personal med tidigare erfarenhet av dessa metoder i fisk. En fortlöpande internkontroll sker för att kontrollera metodernas tillförlitlighet och garantera kvaliteten av analyserna. Vid byte

av utrustning eller analysmetod sker parallellanalyser under en övergångsperiod.

Databearbetning och utvärdering. Alla framtagna data genomgår en rimlighetsanalys med avseende på avvikande resultat (analysfel, felskrivningar mm). Vid misstänkta analysfel kontrolleras resultaten av ansvarig utförare av analysen. För att en fullgod utvärdering av framtagna resultat skall kunna utföras, bör dessa tolkas i relation till motsvarande resultat i andra undersökningar. Därför krävs god kännedom om aktuella litteraturdata om hur de olika mätvariablerna tillämpats i andra undersökningar.

Andra viktiga förutsättningar för resultatförlitlighet

- kontroll över naturliga variabelpåverkande faktorer (se ovan under Statistiska aspekter)
- stratifierat urval av undersökningsmaterialet som minimerar resultatspridning orsakad av naturliga faktorer
- enhetlig och optimal provtagningsperiod
- uppfyllande av statistiska krav (antal prover, relevanta statistiska metoder)
- goda provtagningsförhållanden i fält

Databehandling, datavärd

Rådata från varje individuell analys dataläggs, efter rimlighetsanalys med avseende på avvikande resultat. Det kan gälla provtagnings- eller analysfel, felskrivningar i protokoll, etc. Alla primärdata från de årliga undersökningarna levereras till datavärd vid Sveriges lantbruksuniversitet, SLU (adress se nedan). Institutionen för akvatiska resurser, SLU är datavärd för fisk i inlands- och kustvatten. Kustlaboratoriet i Öregrund fullgör den del av datavärdskapet som omfattar föreliggande undersökningstyp. Kontaktperson för datavärdskapet: Ronny Fredriksson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för akvatiska resurser, Kustlaboratoriet 742 42 Öregrund. Epost: ronny.fredriksson@slu.se Dessutom levereras all primärdata från de årliga undersökningarna till ICES Data portal DOME (Marine Environment).

Rapportering, utvärdering

Kvalitetsgranskade primärdata levereras till datavärden (se ovan). All vidare bearbetning av data sker vid utförande laboratorium. Medelvärden och spridningsmått (standardavvikelse) beräknas. Då data är lätt tillgängliga i kalkylformat kan ett flertal statistiska tester användas såsom exempelvis parametriska ANOVA-test eller icke parametriska Mann-Whitney test. Alla analyser görs på logtransformerad data. Erhållna data från årets undersökningar i ett kustområde jämförs med tidigare års data och med data från övriga undersökningsområden för att tolka eventuella skillnader i tid eller rum. Tidstrender testas med linjär regressionsanalys. Erhållna data används också som referensdata för jämförelser med data

under samma år från andra undersökningar i mer exponerade områden. Ett viktigt syfte med delprogrammets undersökningar är att kartlägga eventuell storskalig påverkan på fiskens hälsa i kustområden och därmed följa upp de tre centrala miljö kvalitetsmålen för havsmiljön (Giftfri miljö; Hav i balans samt levande kust och skärgård; Ingen övergödning). I de fall då undersökningen kan påvisa effekter i form av funktionsstörningar, som visar sig i störningar på populationsnivå, bör orsaken till effekten klarläggas och åtgärder vidtas. Om endast indikationer kan påvisas, dock signifikanta, med en misstänkt betydelse för populationen, så ska detta leda till en vidare utredning (exempelvis koppling till observationer och resultat från andra studier i området, uppföljande laboratorieexperiment, eller utvidgade fältstudier). Som stöd vid bedömning av resultaten har det utarbetats en tolkningsmall för biokemiska, fysiologiska och patologiska effekter hos fisk (Larsson et al., 2000; Förlin et al., 2019).

Kostnadsuppskattning

Som exempel redovisas nedan beräknade kostnader för genomförande av de nationella hälsoundersökningarna på abborre vid ett undersökningsområde. Hälsoundersökningarna på tånglake och skrubbskädda har i stort sett samma kostnader. Beräkningsår är 2020. För året 2020 gjordes undersökningar vid åtta områden.

Fasta kostnader

Löner/mötesverksamhet:

Projektledning/samordning, provtagningspersonal, databearbetning, rapportering, resor/planeringsmöten:

99 600 kr/år/lokal

Fångst/fältprovtagning:

Yrkesfiskare, provtagning (inkl resor, logi, materiel):

44 000 kr/år/lokal

Analyskostnader

Kostnaderna för biokemiska, fysiologiska, histologiska och patologiska analyser avser en undersökningslokal, 25 mätvariabler på 20 honabborrar/lokal och 15 mätvariabler på 10 hanfiskar/lokal.

Analyserna omfattar:

hematologi (hematokrit, hemoglobin) och övriga blodanalyser (plasmajonerna klorid, natrium, kalium, kalcium samt blodglukos); leverenzym (EROD, GR, GST, katalas); enzym i muskelvävnad (AChE), vitellogenin i plasma:

78 900 kr/år/lokal

Tidsåtgång

För varje provtagningslokal beräknas följande tidsåtgång:

Fångst, sumpning (inkl förarbete och efterarbete): 1 personvecka/lokal

Provtagning, inkl restid, 4 personer × 2 dagar:	1,5 personvecka/lokal
Analysér inkl databearbetning; 25 mätvariabler:	6 personveckor/lokal
Utvärdering/rapportering:	1 personvecka/lokal
Sammanlagt för en provtagningslokal:	9,5 personveckor

Samordningsvinster för själva analysarbetet och dataarbetet görs när flera områden undersöks samtidigt. Det är hänsyn taget till dessa i ovanstående kostnadsuppskattning. Det görs även vissa samordningsvinster på tidsåtgången för provtagning och rapportering när flera områden undersöks samtidigt.

Författare och övriga kontaktpersoner

Programansvarig, Naturvårdsverket:

Elisabeth Nyberg
Samhällsavdelningen, Miljögiftsenheten
Naturvårdsverket
106 48 Stockholm
E-post: elisabeth.nyberg@naturvardsverket.se,
Tel: 010-698 17 68

Författare:

Lars Förlin
Institutionen för biologi och miljövetenskap
Göteborgs universitet
Box 463
405 30 Göteborg
Tel: 031-786 3676
Mobil: 0705-163676
E-post: lars.forlin@bioenv.gu.se

Jari Parkkonen
Institutionen för biologi och miljövetenskap
Göteborgs universitet
Box 463
405 30 Göteborg
Tel: 031-786 3449

Referenser

Metodreferenslista

1. Andersson, T., Förlin, L., Härdig, J., and Larsson, Å. 1988. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft mill effluents. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:1525-1536.
2. Banauch, von D., Brummer, W., Ebeling, W., Metz, H., Rindfrey, H., Lang, K., Leybold, K. and Rick, W. 1975. Eine Glucose-Dehydrogenase für die GlucoseBestimmung in Körperflüssigkeiten. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie.* 13:101-107.
3. Bergmeyer, H.U. 1974. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Volume 1.* Verlag: Chemie Publishers, Weinheim.
4. Burke, M.D., and Mayer, R.T. 1974. Ethoxyresorufin: Direct fluorometric assay of microsomal dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Disp.* 2:583-588.
5. Carlberg, I. and Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
6. Dave, G., Johansson-Sjöbeck, M.-L., Larsson, Å., Lewander, K., Lidman, U. 1975. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, (*Anguilla anguilla* L.) I. Carbohydrate, lipid protein and inorganic ion metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A:423-430.
7. Ericson G., Lindesjö E. and Balk L. (1998). DNA adducts and histopathological lesions in perch (*Perca fluviatilis*) and northern pike (*Esox lucius*) along a polycyclic aromatic hydrocarbon gradient on the Swedish coastline of the Baltic Sea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 815-824.
8. Förlin, L., Goksøyr, A., Husøy, A.M. 1994. Cytochrome P450 monooxygenase as indicator of PCB/dioxin like compounds in fish. In: Kramer K.J.M., editor. *Biomonitoring of coastal waters and estuaries.* CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 135-150.
9. Haux, C., Larsson, Å. 1979. Effects of DDT on blood plasma electrolytes in the flounder (*Platichthys flesus* L.), in hypotonic brackish water. *Ambio.* 8:171-173.
10. Hylland, K. 1999. Biological effects of contaminants: Quantification of metallothionein (MT) in fish liver tissue. *ICES Tech.Mar.Envirn.Sci.* 26. 18pp

11. Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Petterson M., Berg A.H., Olsson P.-E. and Förlin L. 1999 Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91-97.
12. Le Cren, E. D. 1947. The determination of the age and growth of the perch *Perca fluviatilis* from the opercular bone. *J. Anim. Ecol.* 16:188-204.
13. Lehman, J., and Stürenberg, F. J. 1975. Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gewässer und Abwässer : eine Limnologische Schriftenreihe.* Heft 55/56.
14. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
15. Omura, T. and Sato, R. 1964. A carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I and II. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2385.
16. Parkkonen J., Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Petterson M., Berg A.H., Olsson P.-E. and Förlin L. 1999. Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish. In *Proceedings of 6th International symposium on the reproductive physiology of fish.* Eds Norberg, Kjesbu, Taranger, Andersson and Stefansson. pp 362-364.
17. Ronisz D., Lindesjö E., Larsson Å., Bignert A. and Förlin L. 2005. Thirteen years of monitoring selected biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*) at reference site in the Fjällbacka archipelago on the Swedish west coast. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 8: 175-184.
18. Statens naturvårdsverk 1994. Vattenrecipientkontroll vid skogsindustrier. Allmänna råd / Naturvårdsverket 94:2.
19. Undritz, E (editor). 1973. *Sandoz Atlas of Haematology.* Sandoz Ltd, Basle. 234 pp.
20. Vanzetti, G. 1966. An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 67:116-126.
21. Weichert F.G., Axén C, Förlin L., Inostroza P.A., Kammann U., Welling A., Sturve J. and Asker N. 2020. A multi-biomarker study on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by the emerging Red Skin Disease in the Båltic Sea. *J Fish Dis.* 44, 429-440.
22. Stephensen, E., Sturve, J., Förlin, L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 133, 435-442.

23. Sturve, J., Berglund, Å., Balk, L., Broeg, K., Böhmert, B., Massey, S., Parkkonen, J., Stephensen, E., Koehler, A. and Förlin, L. 2005. Effects of dredging in Göteborg harbour, Sweden, assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1951-1961.

Rekommenderad litteratur (citerad i texten)

24. Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley Jr, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L.R., and McCarthy, J. F. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28:459-464.

25. Förlin, L., Andersson, T., Haux, C., Olsson, P.-E., and Larsson, Å. 1986. Physiological methods in fish toxicology: Laboratory and field studies. In *Fish physiology: Recent advances*. (Eds. Nilsson and Holmgren) Croom Helm Ltd. Pp 158-169.

26. Huggett, R., Kimerle, R. A., Mehrle Jr., P. M., and Bergman, H. L. (Eds.) 1989. *Biomarkers - Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. SETAC Special publications series, Lewis Publishers.

27. Larsson, Å., Haux, C., and Sjöbeck, M.-L. 1985. Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotox. Environ. Safety* 9:250-281.

28. Larsson, Å., Förlin, L., Balk, L., and Andersson, T. 1995. Effects of modified bleaching process on the health status in fish living in coastal water polluted with bleached pulp mill effluents. Final report for the research project *Biochemical and Physiological Effects of Pulp Mill Effluents in fish*. Göteborg : Göteborg University, Dept of Applied Environmental Science. Dept of Zoophysiology. Studsvik : Stockholm University, Institute of Applied Environmental Research. 10pp.

29. Larsson, Å., Förlin, L., Grahn, O., Landner, L., Lindesjö, E. and Sandström, O. 2000. Guidelines for interpretation and biological evaluation of biochemical, physiological and pathological alterations in fish exposed to industrial effluents. SSVL Miljö 2000, Rapport nr 5. Supplement 2, 13 pp.

30. Naturvårdsverket, 2002. Checklista – kvalitetssäkringsaspekter vid upphandling etc av miljöövervakningsuppdrag.
http://www.naturvardsverket.se/upload/02_tillstandet_i_miljon/miljoovervakning/handledning/checkkval.pdf

32. Sandström O., Larsson Å., Andersson J., Appelberg M., Bignert A., Ek H., Förlin L., and Olsson M. 2005. Three decades of Swedish experience demonstrates the need for integrated long-term monitoring of fish in marine coastal areas. *Water Qual.Res.Canada* 40: 233-250.

33. Södergren, A. 1989. Biological effects of bleached pulp mill effluents. Final report from the Environment/Cellulose I Project, Editor A. Södergren. Report / National Swedish Environmental Protection Board 3558.
34. Södergren, A. 1993. Bleached pulp mill effluents -Composition, fate and effects in the Baltic Sea. Final report from Environment/Cellulose II, Editor A. Södergren. Report / National Swedish Environmental Protection Board 4047.
35. Hansson, T., Hansen, W., Tjärnlund, U., Balk L. and Bengtsson, B.E. 2014. Biomarker Investigations in Adult Female Perch (*Perca fluviatilis*) From Industrialised Areas in Northern Sweden in 2003. *Arch Environ Contam Toxicol* **66**, 237–247.
36. Hanson N., Larsson Å., Förlin L 2014 Gränsvärden för biomarkörer och dess tillämpning i bedömningsgrunder för fiskhälsa. Rapport., 17 sidor. [diva2:851071](#)
37. Asker N., Carney Almroth B., Albertsson E., Coltellaro M., Bignell J.P., Hanson N., Scarcelli V., Fagerholm B., Parkkonen J., Wijkmark E., Frenzilli G., Förlin L. and Sturve J., 2015. A gene to organism approach—assessing the impact of environmental pollution in eelpout (*Zoarces viviparus*) females and larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1511-1523.
38. Asker N., Albertsson E., Wijkmark E., Bergek S., Parkkonen J., Kammann U., Holmqvist I., Kristiansson E., Strand J., Gercken J. and Förlin 2016. Biomarker responses in eelpouts from four coastal areas in Sweden, Denmark and Germany. *Marine Env Res* 120, 32-43.
37. Förlin, L., Sundelin, B., Gorokhova, E., Magnusson, M., Bergkvist, J., Parkkonen, J., Larsson, Å., Liewenborg, B. och Franzén, F. (2019). Effektscreening –Biologisk effektövervakning i förorenade områden längs Sveriges kust 2017–2018. Nationell miljöövervakning på uppdrag av Naturvårdsverket. [diva2:1369845](#)

Uppdateringar, versionshantering

Arbetsmaterial, 1997-06-30. Version 1:1,
2006-02-10. Version 1:1,
2021-06-07. Anpassning till enhetlig mall för undersökningstyper. Reviderat mätprogram, ändringar i tabellen. Tillägg av bilaga med beskrivning av mätvariabler. Uppdaterade textavsnitt och referenslistor.

Bilaga 1. Variabler

Mätvariablerna som beskrivs nedan har lite olika prioritet i programmet. Prioritet 1 betyder att variabeln alltid mäts. Prioritet 2 innebär att mätvariabeln mäts ibland (vid behov). Prioritet 3 innebär att prover bankas för att möjliggöra framtida mätningar. Det gäller främst prover för histopatologiska undersökningar men också ett begränsat antal prover lämpade för biokemiska eller molekylärbiologiska undersökningar. Prioritet 4 innebär att variabeln tidigare har funnits i programmet men har utgått. Nedan följer en beskrivning av de variabler som presenteras i mätprogrammet.

Relativ gonadvikt (GSI) och relativ levervikt (LSI)

Den normala utvecklingen av reproduktionsorganen (gonaderna) i fisk beror på cellulära och molekylära processer som regleras av hormon och andra faktorer. Denna reglering kan påverkas av onormala förhållanden, t.ex. olika typer av föroreningar, i fiskars omgivning. Avvikelser från den normala utvecklingen av reproduktionsorganen kan i sin tur innebära störningar av fiskarnas normala reproduktion. En grov, men tillförlitlig, indikation på störningar av fiskarnas normala reproduktion är storleksförändringar av gonaderna. Gonadstorleken har t.ex. konstaterats vara mindre hos fiskar som levt nära skogsindustrier och hos fisk som i laboratorieförsök exponerats för PCB och DDT. Relativ gonadvikt (GSI) kan uttryckas som gonadvikten i procent av den totala kroppsvikten eller av den somatiska kroppsvikten. Genom anpassning till ICES gällande definition redovisas GSI på total kroppsviktsbasis.

Ofta observeras förstoring av levern hos fiskar som lever i vattenområden förorenade av stabila organiska substanser, t.ex. hos fiskar fångade i skogsindustrirecipienter och hos fiskar som i laboratorieförsök exponerats för klororganiska föroreningar. Denna förstoring kan vara resultatet av ökad fett- och/eller glykogenupplagring och/eller stimulerad proteinsyntes i levercellerna. Det är inte klarlagt vilka faktorer som orsakar detta, men det är troligen en följd av föroreningsinducerade metaboliska störningar och/eller ökad mängd och aktivitet av avgiftningsenzym. Den relativa levervikten (LSI) kan uttryckas som levervikten i procent av den totala kroppsvikten eller av den somatiska kroppsvikten. Genom anpassning till ICES gällande definition redovisas LSI på total kroppsviktsbasis. Samtliga relativa organviktsindex har prioritet 1.

Konditionsfaktor

Konditionsfaktorn (CF) som beskriver relationen mellan kroppsvikt och längd är ett mått på fiskens kondition och energistatus. Den beräknas som Fultons konditionsindex, $CF=100 \cdot \text{vikt i gram} / (\text{längd i cm})^3$. CF hos en fisk påverkas av flera variabler, till exempel dess tillväxt, födotillgång och hälsa, och kan variera både under året och mellan områden, och även mellan

honor och hanar. Hos fisk är det inte ovanligt att man hittar fiskar med låga CF nära förorenade områden dvs. fiskar som är magra. Det kan bero på naturlig variation på föda. Men det kan också vara ett resultat av påverkan på fisken metabolism från utsläpp av föroreningar i de påverkade områdena. En sämre tillgång på föda kan för övrigt också vara resultatet av en försämrad miljösituation. Konditionsfaktor har prioritet 1.

Vita blodceller

Hos fisk finns flera typer av vita blodceller. De som är av störst intresse är lymfocyter, neutrofila granulocyter och trombocyter. Lymfocyter är engagerade i immunförsvaret genom att de är organismens bildare och bärare av antikroppar. Bakteriella infektioner och andra främmande kroppar i organismen aktiverar neutrofila granulocyter som oskadliggör dessa infektioner och övriga kroppsfrämmande ämnen. Trombocyterna, som hos fiskar betraktas som vita blodceller, spelar en viktig roll i blodets koaguleringsprocess.

Studier av vita blodceller hos fisk genom räkning av celler på blodutstryk är en relativt enkel metod för att avslöja en förändring i fisken immunförsvaret. Olika faktorer som t.ex. exponering för vissa miljögifter kan sätta ned försvaret mot infektioner. Även stress medför ett nedsatt immunförsvaret genom en markant minskning av cirkulerande lymfocyter. Metoden har haft en omfattande tillämpning i både experimentella studier och fältstudier hos fisk exponerad för utsläpp från skogs- och metallindustrier, där tydliga förändringar av den vita blodcells bilden har konstaterats. Differentialräkning av vita blodceller har prioritet 1.

Histologi

Histologi beskriver den mikroskopiska uppbyggnaden av vävnader och organ. Histologiska förändringar är vanligen resultatet av en kronisk biokemisk eller fysiologisk förändring som övergått till en sjuklig förändring som kan vara bestående eller övergående. Om förändringarna man beskriver är sjukliga använder man vanligen begreppet histopatologi. Gränsdragningen mellan vad som ligger inom den biologiska variationen och vad som är en sjuklig förändring är dock ofta otydlig. För att undvika att enbart luta sig mot en bedömning frisk/sjuk kan man med hjälp av kvantitativa morfologiska metoder, t.ex. med hjälp av bildanalys, få ett numeriskt svar på den förändring man beskriver. Samtidigt får man en bättre möjlighet till att statistiskt bearbeta sitt material.

Förutom att beskriva rena strukturella förändringar kan man med olika infärgningsmetoder märka in biokemiska processer i de vävnader man vill studera. Denna teknik benämns histokemi. Utvecklingen inom detta område går snabbt och här finns möjligheter att i framtiden tillämpa nya analyser på äldre redan insamlat och fixerat material.

I det nationella programmet utfördes tidigare en övergripande histopatologisk undersökning av levern inklusive en kvantifiering av nekros/degeneration. Dessutom mättes förekomsten av makrofagcentra i mjälten. Båda dessa förändringar är kända att svara på olika former av

antropogen belastning. Dessa variabler är därmed relativt ospecifika men ger ett bra mått på det allmänna hälsotillståndet hos fisken. I de här aktuella referensområden har dock dessa variabler visat mycket få eller inga förändringar. Därför beslöts 2015 att lägga samtliga vävnader avsedda för histopatologiska undersökningar i provbank för möjliga framtida analyser. Histologiska undersökningar av lever och mjälte har prioritet 2. Histologiska prover av andra organ läggs i provbank för eventuell framtida analys (prioritet 3).

Kolhydratmetabolism

Den mest studerade stress-effekten hos fisk är den typiska ökningen av blodglukos (blodsocker) och blodlaktat (mjölksyra) samt minskningen av glykogendepåer i lever och muskel. Dessa är sekundära effekter och resultat av en ökad utsöndring av hormoner från körtlar (hypofysen, binjurevävnad) och en ökad nervös aktivitet. Detta är en naturlig respons för att snabbt frisätta energi t.ex. för att attackera en rival, för att fånga ett byte eller för att fly undan predatorer. Många miljögifter kan påverka metabolismen av kolhydrater på annat sätt än via sekundär stress. Nedan beskrivs effekter på glykogenhalt i lever och muskel, samt glukos- och laktathalt i blod.

Glykogenhalt i lever och muskel, samt blodglukos

Tydliga ökning av glykogennivåer i muskel och lever har konstaterats hos fiskar som exponerats för utsläpp från pappersmassaindustrier. Många klorerade ämnen (t.ex. pentaklorfenol, PCB och DDT) ger upphov till förändrad kolhydratomsättning. Även kadmium och bly har i laboratorieförsök och fältundersökningar visats ge störd kolhydratomsättning, bland annat förändrad blodglukosnivå i blodet, hos fisk. Glykogenhalten mäts enzymatiskt och är en relativt enkel men tidskrävande analys. Analys av blodglukos sker direkt vid provtagningen med kolorimetrisk snabbmetod.

Glykogen i muskel och lever analyseras ej längre i de årliga mätningarna i referensområden. Om mätningar är aktuella t.ex. i förorenade områden är det lämpligt att mäta muskelglykogen då leverglykogen inte är lika stabilt och svarar på metaboliska förändringar under ett snävare tidsperspektiv.

Mätning av blodglukos har prioritet 1, medan analys av glykogenhalt i lever och muskel har prioritet 4.

Laktat i blod

Laktat i blodplasma påverkas av olika former av akut stress. Det är den mest provtagningskänsliga mätvariabeln. Mätning av blodlaktat kan därför inkluderas i provtagningar för att få en kontroll på eventuell provtagningsstress. Analysen av laktat har prioritet 2.

EROD-aktivitet och CYP1A i lever

Utsöndringen av fettlösliga organiska gifter från fisk och andra ryggradsdjur påskyndas av olika enzymssystem som omvandlar ämnena till vattenlösliga produkter. Dessa kan sedan utsöndras via galla eller urin. Den första omvandlingen i denna avgiftning är ofta katalyserad av enzymssystem som kallas cytokrom P450 (CYP) monooxygenaser. En av dessa som används som mätvariabel i miljöövervakning är EROD aktivitet. Det är väl dokumenterat att en induktion av enzymet EROD i leverns avgiftningssystem är en mycket känslig biokemisk respons hos fisk som exponeras för vissa stabila organiska ämnen (klorerade dioxiner och polyaromatiska kolväten, PAH) och visar att organismens avgiftningssystem har trätt i funktion för att metabolisera de främmande ämnena. Samtidigt utgör responsen en varningssignal eftersom en bestående induktion visar en långvarig exponering med allvarliga effekter på integrerade funktioner såsom ämnesomsättningen, fortplantning, immunförsvar och tillväxt.

EROD-aktiviteten har använts som en känslig biomarkör för t.ex. oljeförorening eller utsläpp från skogsindustrier. I fallet skogsindustrier har man i tidigare undersökningar kunnat mäta en påverkan på upp till 40 km från utsläppskällan, vilket tyder på en storskalig och/eller regional påverkan. Analysen av EROD är förmodligen den, internationellt sett, mest tillämpade biomarkören inom biologisk monitoring. Inom det nationella programmet har den prioritet 1 och har mätts kontinuerligt sedan programmets start.

Ett alternativ och komplement till att mäta EROD aktivitet är att mäta halten av proteinet CYP1A i lever hos fisken. CYP1A är det protein som EROD aktiviteten mäter. Mätningarna görs med hjälp av immunologisk metodik med specifika antikroppar mot CYP1A protein. Variabeln EROD-aktivitet har prioritet 1. Variabel CYP1A har prioritet 2.

Cytokrom-P-450 (CYP)

Den totala halten av cytokrom P450 (CYP) mättes tidigare hos fisk från förorenade områden men den är en relativt okänslig biomarkör för giftexponering. Därför rekommenderas inte mätning av denna variabel längre. Däremot kan det vara av värde att mäta enskilda CYPar t.ex. CYP1A (se ovan). Variabeln totala halten CYP har prioritet 4.

Proteinhalt i lever och muskel

Proteinhalt mäts i lever och och muskel ingår som ett led i analyserna av enzymer, såsom EROD. Mätning av protein har prioritet 1 men används inte som självständig mätvariabel.

Antioxidantzymer i lever och oxidativ stress

Antioxidantzymer, GR, katalas och GST mäts främst för att ta reda på om fisken är utsatt för oxidativ stress. En ökad aktivitet av dessa enzym kan tyda på oxidativ stress.

Glutationreduktas-aktivitet i lever

Glutation är mycket viktig för cellens redoxbalans. Enzymet glutathionreduktas (GR) reglerar förhållandet mellan reducerat och oxiderat glutathion. Efter exponering för reaktiva ämnen sker ofta en ökad förbrukning av reducerat glutathion. För att kompensera för denna förbrukning ökar aktiviteten av GR. En ökad GR aktivitet kan därför indikera exponering för syre- eller organoradikaler.

Glutation S-transferas

Glutation S-transferas är en familj av enzymer som katalyserar konjugering av glutathion till reaktiva ämnen såväl kroppsegna som icke kroppsegna föroreningar. Ökad aktivitet kan indikera exponering för föroreningar och också risk för oxidativ stress.

Katalas

Enzymet katalas omvandlar väteperoxid till vatten och syre och är viktigt i cellens försvar mot fria radikaler. Analys av alla tre antioxidantenzymerna, GR, katalas och GST har prioritet 1.

Acetylkolinesteras

Aktiviteten av enzymet acetylkolinesteras (AChE) reglerar nedbrytningen av transmittor-substansen acetylkolin i nerv-/muskelsystemet. Aktiviteten mäts i muskel för att ta reda på om fisken är exponerad för vissa miljöfarliga ämnen som är kända att hämma detta enzym. Mest kända exemplen på sådana ämnen är några insektsbekämpningsmedel som inte längre används i så stor utsträckning. Det finns även misstanke om att höga nivåer av andra ämnen kan ge en påverkan däribland en stor grupp ämnen som kallas organofosfatestrar som finns i vissa bekämpningsmedel, mjukgörare i plaster och syntetiska smörjoljor. Analys av AChE aktivitet har prioritet 1.

Vitellogenin i blodplasma

Vitellogenin (eller guleprotein) produceras normalt i lever hos honfisk. Vitellogeninet inlagras i ägget och används som näring under embryo- och yngelutvecklingen. Hormonet 17β -östradiol styr produktionen av vitellogenin. Även många andra ämnen såsom alkylfenoler, växtsteroler, syntetiska östrogener (från t.ex. p-piller) och vissa bekämpningsmedel inducerar vitellogenin hos fisk. Hanfisk har också förmåga att producera vitellogenin men under normala betingelser sker ingen sådan produktion hos hanfisk. Därför indikerar förekomst av vitellogenin hos hanfisk exponering för östrogenliknande ämnen och utgör en varningssignal för störningar i de funktioner som östrogen reglerar. Hos honfisk kan låga nivåer av vitellogenin indikera påverkan på den normala inlagringen av guleprotein i äggen i gonaderna och därmed störa fiskens normala fortplantning. Därför mäts halten av vitellogenin både i hon- och hanfisk. Analys av vitellogenin hos både hon- och hanfisk har prioritet 1.

Metallotionein i lever

Metallotionein (MT) är ett cysteinrikt protein som binder särskilda metaller. Induktion av MT är en relativt specifik biologisk respons för exponering av vissa tungmetaller såsom Cu, Zn, Cd och Hg. Bindning av metaller till MT anses också reducera uppkomsten av intracellulära skador av metaller. En liten bit lever läggs i provbank (flytande kväve eller lågtempfrys) för att möjliggöra eventuell framtida analys av MT. Analys av variabeln har prioritet 3.

DNA-addukter i lever

DNA-addukter bildas då reaktiva miljögifter eller metaboliter av dessa binder kovalent till DNA i cellerna. Ett strukturellt förändrat DNA kan leda till att funktionen hos det genetiska materialet påverkas eller till att mutationer uppstår.

Förekomsten av DNA-addukter i vildlevande fisk kan mätas med så kallad ³²P-postlabellingmetodik. Metoden har tidigare använts på ett stort antal fiskarter från olika delar av världen. Eftersom nivåerna av DNA-addukter är mycket låga eller inte detekterbara hos fisken från referensområdena görs inte längre rutinmässig mätning. Det läggs en liten bit lever i provbank (flytande kväve eller lågtempfrys) för att möjliggöra eventuell framtida analys av DNA-addukter (prioritet 3).

Koncentrationer av joner i blodplasma

Benfiskar har välutvecklade mekanismer för osmo- och jonreglering och kan därför hålla halten av oorganiska joner inom mycket snäva ramar. Natrium och klorid är de dominerande jonerna i blodplasma och spelar en mycket viktig roll när det gäller att bibehålla det osmotiska trycket. Även andra joner som kalium, kalcium och fosfat står under strikt reglering hos fisk. En störd jonreglering torde allvarligt reducera fiskens förmåga att upprätthålla normala livsfunktioner.

Ett flertal miljögifter, som metaller och klorerade kolväten, påverkar jonkoncentrationen i blodplasma hos fisk. Halten av kalciumjoner minskar t.ex. när fiskar exponeras för kadmium. Exponering av fisk för avloppsvatten från skogsindustrier kan leda till minskning av främst kloridjonkoncentrationen. Analysen av kloridjoner, natrium, kalium och kalcium i blodplasma har prioritet 1.

Bilaga 2. Utrustningslista för fiskprovtagning

Håv (Obs lämplig maskstorlek för 100-300 gr fisk)
Dissektionsbestick
Skalpeller
Provtagningsprotokoll
Bänkpapper
Sax
Hushållspapper
Termometer (för vattentemperatur)
Pappersnäsdukar
Plasmacentrifug
Hematokritcentrifug
Hematokritrör
Hematokritavläsare
Killer/bedövare
Skärbräddor
Linjal
Våg till fiskvägning
Våg till vägning av lever och gonad (0,01g)
Apparat för Hb-mätning
Apparat för Glukosmätning
Kyvetter för Hb
Kyvetter för Glukos (förvaras kallt)
Heparin
Klips för histologi
4 % buffrad formalin.
70% Etanol
Objektsglas till blodutstryk
Blodutstryksspatel
Preparatbricka
Preparatlåda
Hårtork
Handskar
Kanyler för blod (21G*11/2" nr. 2 0,8 mm * 40mm)
Kanyler för galla (23*1" – nr.16 0,6 mm*25mm)
Elkablar och skarvsladdar
Vialer för galla
Skyddsglasögon
Sprutor för blod och galla (1-2 ml)
Slaskburk för kanyler och skalpellblad
Påsar för otoliter
Plastpåsar 5 liters till fiskkadaver

Plastpåsar till plasmaprovernas kapslar (joner)
Plastpåsar till plasmaprovernas kapslar (VTG)

Märkpennor
Kylboxar med kolsyreis
N₂-kärl med flytande kväve
Sopsäckar stora
Soppåsar
Tejp
Folie för lever (EROD)
Preparatrör med skruvlock för lever (MT)
Preparatrör med skruvlock för lever (DNA-addukter)
Eppendorfrör 1,5 ml till helblod (för centrifugering)
Eppendorfrör 0,6 ml till plasma (joner)
Eppendorfrör 0,6 ml till plasma (VTG)
Automatpipett 200 µl
Pipettspetsar
bord och stolar
Labrockar
Elverk
Alkylatbensin
Extra belysning

Bilaga 3. Fältprotokoll - Hälsotillstånd hos kustfisk

Station _____

Datum _____

Temp luft/vatten _____

Provtagare _____

Prefix _____

Fisk nr	Kön	Blodvolym	Gluk	Hb	HT	Kommentar
1						
2						
3						

Prefix Station Datum							
Prefix	Station			Datum			
Fisk nr	Kön	Vikt	Längd	Levervikt	Gonadvikt	Som. vikt	Kommentar
1							
2							

Blodvolym: anges i ml med en decimal; Längd: anges i mm; Vikt: anges i gram; Kön: hona=0, hane=1; Gonad- och levervikt: anges i gram med två decimaler; Ht (hematokrit): anges i % med en decimal; Glukos: anges i mmol/l med en decimal; Hb (hemoglobin): anges i g/l till närmaste ental. Plasmagelé anges med gelé.