

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*). 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 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.

Undersökningstypen kopplas till miljömålen *Giftfri miljö*, *Ingen eutrofiering* 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

Undersökningstypen är generell, d.v.s. ger information om alla hittills undersökta substanser och substansgrupper. Laboratorieförsök har visat på signifikanta skillnader mellan exponerade individer och kontrollgrupper vid de lägsta testkoncentrationerna av de undersökta substanserna där effekter kan spåras. Undersökningstypen kan användas till att avläsa effekter av såväl långsiktig, kontinuerlig belastning av miljögifter som av enstaka utsläpp. 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 laboratorieförhållanden för att kunna användas i fält.

Eftersom de flesta organismer som används för att upptäcka exponering för miljögifter (s.k. biomarkörer) även påverkas av klimatvariabler som syrebrist, temperatur och salthalt, är det viktigt att om möjligt kunna särskilja effekterna av miljögifter från effekter av övriga omgivningsvariabler. 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 (xenobiotika).

Förutom missbildade embryon förekommer obefruktade/odifferentierade samt döda ägg och embryon. Ägg som av någon anledning inte har befruktats eller har stannat i ett tidigt skede (före gastrulationen) i embryoutvecklingen (embryogenesen), vilket sker t. ex vid en felaktig klyvning av embryot, 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 vitmärlan. Orsaken till de odifferentierade äggen är delvis oklar.

## Statistiska aspekter

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

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

Frekvensen av missbildade embryon av *Monoporeia affinis* visar en förhållandevis låg variation i Östersjöns olika bassänger. Fem sedimentprover (replikater) 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.

Provtagningsfrekvensen är en gång per år under första hälften av februari. Det är 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 vill man veta 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 och 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 (beräknat på årsbasis).

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 av en rad olika skäl 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 i beräkningarna, eftersom isläggning försvårar provtagning.

## **Mätprogram**

### **Variabler**

Variabler som ingår i undersökningstypen 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 (somitskador). Med somitskador 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.

Genom att enbart studera olika embryovariabler hos arter av vitmärla får man en uppfattning om graden av exponering för miljögifter. Studier av icke-biologiska variabler – däribland syrekonzentrationen i sediment och bottenvatten samt sulfidkonzentrationen 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 syrekonzentrationen i bottenvatten som syrekonzentrationen 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 sulfidkonzentrationen och andelen döda äggsamlingar eller andelen missbildade embryon har inte kunnat konstanteras. Det finns däremot starka indikationer på ett samband mellan syrekonzentrationen i bottenvatten och andelen döda äggsamlingar och därför kan möjligheten att ersätta sulfidmätningarna med syremätning i sedimentet provas.

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

Företeelse	Determinand	Enhet	Prioritet	Frekvenser och tidpunkter	Referens till provtagningsmetod	Referens till analysmetod
Monoporeia, Pontoporeia	fekunditet	ägg/ hona	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	utvecklingsgrad hos embryon, nio stadier	Klassat	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	missbildade embryon	% av totala antalet undersökta embryon	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	döda embryon	-"-	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	odifferentierade embryon	-"-	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	död äggsamling	-"-	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	parasitangrepp	-"-	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	somitskador	-"-	1	årligen, februari	Bil. 1	Bil. 1
Monoporeia, Pontoporeia	honans längd	mm	2	årligen, februari		
sediment	sulfidkonzentration	mM/l	2	årligen, september		2, 4, 5
sediment	pH		2	årligen, september		
sediment	syrekonzentration	mg/l	1	september		3, 6, 7 elektromanual
bottenvatten	syrekonzentration	mg/l	1	årligen, september		SS-EN 25814, SS-EN 25813

## Version 1:1 2003–02-11

sediment	redox-potential	mV	2	årligen, september		1
sediment	org. C	mg/kg	1	årligen, september		ackrediterad enl. Swedac

Tabellen är inte avstämd mot DMN, eller kontrollerad av NV tabellansvarige.

### 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 sällas 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 container 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.

Möjligheten till båttransport försvåras vid isbildning vilket medför svårigheter att använda vinsch och huggare. Under dessa förhållanden tas proverna genom isen med specialkonstruerad eldriven bottensug, en s.k. HA-sug (konstruerad av Hägerroth och Andersson) som drivs med ett bensindrivet elaggregat (8). 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 (9). 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 syrekoncentrationen i bottenvatten, redoxpotential samt koncentrationen fria sulfider i sedimentet. Syrekoncentrationen mäts i vattenytan strax ovan sedimentytan med hjälp av syremätare (Oxi 323-B Christian Berner). Mätning och kalibrering utförs enligt SS-EN 25814 och SS-EN 25813. Redoxmätningarna utförs enligt överenskommen östersjöstandard för undersökningstyperna om mjukbottenlevande makrofauna (1). Mätningarna görs i de förborrade sedimentrören med hjälp av pH/jonmeter (Radiometer PHM 95) och jonselektiva elektroder (platinaelektrod för redoxmätningar) samt referenselektrod (calomel) på varje cm ned till 10 cm i sedimentet (enligt 1). Svavelväte (H<sub>2</sub>S) mäts med en H<sub>2</sub>S-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, övernattningar 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 (8). 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 sedimenterande 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.

### **Databehandling**

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 i dBase-format enligt datavärdens önskemål (lagras i Excelfiler eller SPSS innan de överförs).

### **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 embryoutveckling hos märlkräftor samt träning i att analysera vitmärlaembryon. Kvalitetssäkring sker kontinuerligt genom att olika utförare bestämmer ca 50 äggkullar för att kontrollera graden av felprocent (se 8). 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).

### **Rapportering, presentation**

Några förslag på enkla presentationer:

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

### **Datalagring, datavärd**

*Datavärd:*

Stockholms Marina Forskningscentrum (SMF)  
Stockholms universitet  
106 91 Stockholm

*Kontaktperson:*

Svante Nyberg  
Institutionen för systemekologi  
Stockholms universitet

106 91 Stockholm

E-post: syber(a)system.ecology.su.se

## Utvärdering

Målsättningen med undersökningstypen 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 miljökvalitetsnormer. Miljökvalitetsmålet 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 individtäthet och primärproduktion samt vattentemperatur i det aktuella området, – kan förståelsen ökas om vilka variabler som påverkar äggproduktionen och individtätheten 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 f.r.o.m. provtagning t.o.m. analys för varje provhugg (taget med 0,1 m<sup>2</sup> van Veen-huggare eller Kajakhämtare) beroende på individtäthet.

## Kontaktpersoner

*Programområdesansvarig, Naturvårdsverket:*

Sverker Evans

Miljöövervakningsenheten

Naturvårdsverket

*Handbok för miljöövervakning  
Undersökningstyp*



106 48 Stockholm  
E-post: Sverker.Evans(a)naturvardsverket.se

*Experter, ITM*

Brita Sundelin

Tel: 08-674 72 35. E-post: brita.sundelin(a)itm.su.se

Ann-Kristin Eriksson-Wiklund

Tel: 08-674 72 51. E-post: annkristin.eriksson(a)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 The Baltic Marine Biologists Publ 1, app. 4:1, 41-50.
2. Cline JD (1969) *Limnol & Oceanogr* 14:454-458.
3. Gundersen JK, NB Ramsing & RN Glud (1998) Predicting the signal of O<sub>2</sub> microsensors from physical dimensions, temperature salinity and O<sub>2</sub> concentration. *Limnol & Oceanogr* 43(8):1932-1937.
4. Jeroschewski P, C Steukhart & M Kühl (1996) *Anal Chem* 68:4351-4357.
5. Kühl M, C Steukhart G Eickert & P Jeroschewski (1998) *Aquat Microb Ecol* 15: 201-209.
6. Revsbech NP & BB Jøregensen (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. Sundelin, B.; A-K. Eriksson (1995). Effekter på embryonal utvecklingen hos vitmärkla (*Monoporeia affinis*) i Vättern. Miljöövervakning Vättern, Förslag till program och undersökningstyper, Rapport nr 36.
9. Sundelin, B., A-K. Eriksson (1998). Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171: 165-180.

### Rekommenderad litteratur

10. 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
11. 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
12. Bregazzi, P. K. (1973). Embryological development in *Tryphosella kergueleni* (Miers) and *Cheirimedon femoratus* (Pfeffer) (Crustacea: Amphipoda) *Br. Antarct. Surv. Bull.* 32:

63-74

13. 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
14. Conlan, K. E. (1994). Amphipoda crustaceans and environmental disturbance: a review. *Journal of Natural History* 28: 519-554
15. Davis, G. E. (1993). Design elements of monitoring programs: the necessary ingredients for success. *Environmental Monitoring and Assessment* 26: 00-105
16. 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 20, John Wiley & Sons, Ltd p. 483-497
17. Donner, K. O. (1971). On vision in *Pontoporeia affinis* and *P. femorata* (Crustacea, Amphipoda). *Soc. Scient. Fennica Comment. Biolog.* 41 p. 3-17
18. 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.
19. 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, 51-65.19. 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) p 69-78, St Lucie Press Florida.
20. 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.
21. Hill, C. (1991). Mechanisms influencing the growth reproduction and mortality of two co-occurring amphipod species in the Baltic sea. Dissertation, University of Stockholm
22. 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
23. Lalitha, M., Shyamasundari, K., Hanumantha Rao, K. (1991). Embryological development in *Orchestia platensis kroyer* (Crustacea:Amphipoda). *Uttar Pradesh J. Zool.* 11 (2): 107-112
24. 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
25. Leonardsson, K., Sörlin, T., Samberg, H. (1988). Does *Pontoporeia affinis* (Amphipoda) optimize age at reproduction in the Gulf of Bothnia? *Oikos* 52: 328-336.
26. Leonardsson, K. (1994). Multiple density dependence in two sub-populations of amphipod *Monoporeia affinis*: a potential for alternative equilibria. *Oecologia* 97: 26-34
27. Lindström, M., Lindström A. (1981). Swimming activity of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda) - Seasonal variations and usefulness for environmental studies.

Annls. Zool. Fenn. 17: 213-219

28. Lindström, M. (1992). The migration behaviour of the amphipod *Pontoporeia affinis* (Lindström). Walter and André de Nottbeck foundation scientific reports no 7. Dissertation, University of Helsinki
29. 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
30. 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: 245-25231.
31. 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
32. Rappaport, R. Jr. (1960). The origin and formation of blastoderm cells of gammarid Crustacea. The J. of exp. Zool. vol 144: 43-59
33. Samter, M., Weltner, W. (1904). Biologische Eigentümlichkeiten de *Mysis relicta*, *Pallesiella quadrispinosa* und *Pontoporeia affinis* erklärt aus ihrer eiszeitlichen Entstehung. Zool. Anz. 27(22): 676-694
34. Sarvala, J., Uitto, A. (1991). Production of benthic amphipods *Pontoporeia affinis* and *P. femorata* in a Baltic archipelago. Ophelia 34 (2): 71-90
35. 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
36. Segerstråle, S. G. (1937). Studien über die Bodentierwelt in sudfinnländischen Küstengewässern III. Zur Morphologie und Biologie des Amphipoden *Pontoporeia affinis*, nebst einer Revision der *Pontoporeia*-systematik. Soc. Scient. Fennica Comment. Biol. 7(1): 1-183.
37. Segerstråle, S. G. (1938). Zur Fortpflanzungsbiologie des Amphipoden *Pontoporeia femorata* Kröyer. Comment. Biol. Soc. Scient. Fenn. 7 (5): 1-23
38. Segerstråle, S. G. (1959). Synopsis of data on the crustaceans *Gammarus locusta*, *Gammarus oceanicus*, *Pontoporeia affinis* and *Corophium volutator* (Amphipoda Gammaridae). - Soc. Scient. Fennica Comment. Biol. 20(5): 1-23.
39. 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
40. Segerstråle, S. G. (1970). Light control of the reproductive cycle of *Pontoporeia affinis* Lindström (Crustacea Amphipoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 272-275
41. 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.
42. Sundelin, B. (1983). Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. Mar. Biol. 74: 203-212.

43. 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. 588 p.
44. 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.
45. Sundelin, B. (1989). Ecological effect assessment of pollutants using Baltic benthic organisms. Tesis, Stockholm University.
46. Sundelin, B., (1992). Effect monitoring in pulp mill areas using benthic macro- and meiofauna. In Södergren (ed). Proceedings of SEPA conference 19-21 Nov 1991. Sw. Env. Prot. Ag. Report 4031: 371-378.
47. Sundelin, B., A-K. Eriksson (2001). Mobility and Bioavailability of Trace Metals in Sulfidic Coastal Sediments. In press, Environ. Toxicol & Chem.
48. Sundelin, B., Ryk, L, Malmberg, G. (2000) Effects on the sexual maturation of the sediment-living amphipod *Monoporeia affinis*. In press. Environ. Toxicol.

Ersatt

## 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: .....

*Handbok för miljöövervakning  
 Undersökningstyp*