

Undersökningstyp - Missbildade embryon av *Monoporeia affinis*

Version 1:4, 2021-03-16

Programområde: Kust och Hav
Handledning för miljöövervakning



Foto: Brita Sundelin, ACES, Stockholms Universitet

Innehåll

Bakgrund och syfte med undersökningstypen	3
Samordning.....	3
Strategi	3
Havsmiljödirektivet.....	4
Helcom	5
Statistiska aspekter	5
Plats/stationsval	6
Mätprogram	7
Variabler.....	Fel! Bokmärket är inte definierat.
Frekvens och tidpunkter	9
Observations/provtagningsteknik.....	10
Tillvaratagande av prov, analysmetodik.....	11
Fältprotokoll	11
Bakgrundsinformation.....	11
Kvalitetssäkring	12
Databehandling, datavård.....	12
Rapportering, utvärdering.....	12
Tids- och kostnadsuppskattning.....	13
Författare och kontaktpersoner	13
Referenser.....	14
Metodreferenslista.....	14
Rekommenderad litteratur	15
Uppdateringar, versionshantering	19
Bilaga 1. Fältprotokoll.....	19

Bakgrund 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*). Vitmärlor förekommer i hela Östersjön från Bottenviken ned till södra delen av Östersjön. De är sedimentlevande kräftdjur som är viktiga för syresättning av sedimentet samt föda för rovlevande evertebrater samt vissa fiskarter som t.ex. strömming, sik, tånglake och skrubbskädda. *P. femorata* följer samma reproduktionscykel som *M. affinis* och har en i det närmaste identisk embryonalutveckling men förekommer endast i lägre tätheter i områden norr om Ålands hav varför *M. affinis* ges högre prioritet i undersökningarna. Undersökningen, att registrera frekvensen av missbildade ägg och embryon hos vitmärla, är en känslig, effektrelaterad metod för att upptäcka miljöförändringar. Därigenom kan man få indikation om förekomsten och biotillgänglighet 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 och födobrist. Det är således i första hand inte väsentligt att särskilja effekterna av den mängd olika typer av miljögifter som förekommer i miljön, utan det viktiga är att kunna se vad som är generella miljögiftseffekter till skillnad från effekter som orsakas av klimatvariabler.

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

Samordning

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

Strategi

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

Eftersom de flesta organismer som används för att upptäcka exponering för miljögifter (s.k. bioindikatorer) även påverkas av andra omvärldsfaktorer såsom syrebrist, temperatur och salthalt, är det viktigt att kunna särskilja effekterna av

miljögifter från effekter av övriga variabler. Laboratorieförsök samt fältstudier har visat att varken syrebrist, sulfider eller temperaturförhöjningar i vattenpelaren ger upphov till missbildade embryon hos *Monoporeia affinis*. Sådana missbildningar speglar således enbart exponeringen för miljögifter.

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

I Sverige är miljöövervakning återkommande och systematiskt upplagda undersökningar som följer upp miljöns 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

Havsmiljödirektivet syftar till att alla havsområden inom EU ska ha uppnått så kallad god miljöstatus till år 2020. Havsmiljödirektivet är implementerat i svensk lagstiftning genom havsmiljöförordningen. Här framgår att följande ska övervakas: Geografisk och tidsmässig variation per art eller population, reproduktionsförmåga, överlevnadstal och dödlighet/skadefrekvens.

Biologiska effekt-indikatorer är en förutsättning för att kunna bedöma effekterna av de komplexa blandningar av miljögifter som Östersjöns djur utsätts för och att utvärdera effekten av genomförda åtgärder för att minska miljögiftsbelastningen. För bedömning av effekter av farliga ämnen på vitmärslan finns en svensk indikator *Störningar i reproduktion hos vitmärslan* (ReproIND) framtagen som ger underlag för Deskriptor 8 (D8: *Koncentrationer av miljögifter har nivåer som inte ger upphov till förorenings effekter*) inom Havsmiljödirektivet.

Bedömningarna med hjälp av ReproIND baseras på andel av missbildade embryon i populationen samt andel av honor som har missbildade embryon.

Bedömningsgrunder för ReproIND var framtagna med hjälp av långtidsdata och inkluderar gränsvärden, som speglar när en effekt befaras leda till effekter på högre nivå som påverkar populationen (referensvärden för andel av missbildade embryon i populationen är 6% och för andel av honor som har missbildade embryon är 30%). För att vitmärkla ska uppnå god miljöstatus ska förekomsten av missbildade embryon samt andelen honor med missbildade embryon under bedömningsperioden inte överstiga fastlagda referensvärden.

Helcom

Som part i Helsingforskonventionen ska Sverige delta i arbetet med att skydda Östersjön samt följa de rekommendationer som tas fram inom konventionen. Effekter på vitmärkla ingår inte i HELCOM Monitoring Manual då endast Sverige och Ryssland övervakar vitmärkla men finns som en kompletterande indikator inom Helcom:

[Reproductive disorders: malformed embryos of amphipods, http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/indicators/reproductive-disorders-malformed-embryos-of-amphipods](http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/indicators/reproductive-disorders-malformed-embryos-of-amphipods)

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.*

Statistiska aspekter

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

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

Frekvensen av missbildade embryon av *Monoporeia affinis* visar en förhållandevis låg variation mellan Östersjöns olika bassänger. Femtio gravida honor (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 99 procent ($\alpha=0,01$) 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 medianen för andelen missbildade embryon (ca 3 procent). Med samma beräkningsgrunder skulle man med 90 procents

sannolikhet ($\alpha=0,10$) 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.

Plats/stationsval

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

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

För att kunna belysa bakgrundsvariationen är det även väsentligt att innefatta olika typer av sediment samt att samordna stationsvalet med sådana undersökningstyper där stödvariabler ingår, t.ex. kartering av mjukbottenlevande makrofauna, växtplankton och närsalter i både egentliga Östersjön och Bottenhavet. Man bör vid valet av provstationer också ta med risken för kraftig isbeläggning, vilket försvårar provtagning. Programmet reviderades 2012 för att täcka upp en större del av kusten och antalet stationer fördubblades (tabell 1 och 2).

Tabell 1. Provtagningsstationer i egentliga Östersjön

Område	Station	Djup (m)	Latitud	Longitud	Kust/utsjö
Svartlögafjärden	KUD 64	33	N 59 34,60	E 19 07,17	Kust
Kobbfjärden	KO 2	37	N 59 33,51	E 19 22,15	Kust
Svenska Björn	SB 8	62	N 59 30,56	E 19 49,32	Kust/utsjö
Svenska Björn	1003	58	N 59 31,23	E 19 50,17	Kust/utsjö
Askö	6020	36	N 58 48,67	E 17 36,59	Kust
Askö	6025	38	N 58 47,47	E 17 43,87	Kust

Askö	6004	42	N 58 46,52	E 17 41,50	Kust
Askö	Grund Utsjö	50	N 58 45,14	E 17 57,77	Kust
Askö	6022	46	N 58 44,68	E 17 48,75	Kust
Askö	6019	41	N 58 44,32	E 17 40,58	Kust
Hävringe	HAE 3	43	N 58 31,18	E 17 18,96	Kust
St Anna	St Anna 6	16	N 58 22,18	E 16 57,62	Kust
Gryt	Gryt 1	25	N 58 15,59	E 16 54,47	Kust
Gryt	Gryt 3	19	N 58 10,77	E 16 54,53	Kust

Tabell 2. Provtagningsstationer i Bottenhavet

Område	Station	Djup (m)	Latitud	Longitud	Kust/utsjö
N. Bottenhavet utsjö	N 25	123	N 63 18,70	E 19 48,20	Kust/utsjö
N. Bottenhavet utsjö	N 26	134	N 63 12,50	E 19 38,15	Kust/utsjö
N. Bottenhavet utsjö	N 27	134	N 63 05,42	E 19 32,50	Kust/utsjö
N. Bottenhavet utsjö	US5	137	N 62 36,01	E 20 00,00	Utsjö
Gavik/Edsätterfjärden	G 10	53	N 62 53,44	E 18 17,33	Kust
Gavik/Edsätterfjärden	G 11	75	N 62 51,90	E 18 17,50	Kust
Höga Kusten	N 4-1	68	N 62 47,98	E 18 17,29	Kust
Höga Kusten	N 4-3	86	N 62 46,97	E 18 23,52	Kust
Sundsvall/Åvikebukten	Åv 1	70	N 62 29,26	E 17 43,68	Kust
Sundsvall/Åvikebukten	Åv 2	60	N 62 27,71	E 17 42,19	Kust
Sundsvall	Su 4	80	N 62 19,06	E 17 39,04	Kust
Sundsvall	Su 5	54	N 62 20,91	E 17 39,38	Kust
N Söderhamn	R 2-13	24	N 61 21,89	E 17 12,84	Kust
Söderhamn	N 2-4	62	N 61 21,10	E 17 30,79	Kust
Söderhamn	N 2-3	60	N 61 19,44	E 17 35,59	Kust
Söderhamn	SR 1A	61	N 61 14,00	E 17 40,00	Kust

Mätprogram

Obligatoriska mätvariabler

Variabler som ingår i undersökningen är (se vidare i tabell 3):

- fekunditet (ägg per hona),
- utvecklingsgrad hos embryon (nio olika stadier, Bilaga 1),
- missbildade embryon (som kan delas in olika skadetyper, t.ex. membranskador Bilaga 1),
- döda respektive obefruktade/outvecklade (odifferentierade) ägg eller embryon,
- döda eller partiellt döda äggsamlingar hos honan,
- parasitförekomst (nematoder och acanthocephalen *Echinorhynchus salmonis* samt muskelparasiter som mikrosporidieförekomst) hos honan,
- övriga angrepp eller sjukdomar hos honan (somicskador). 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.

Frivilliga mätvariabler

Frivilliga 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 förutom *Monoporeia affinis* och *Pontoporeia femorata* även användas för att undersöka isopoden *Saduria entomon*, som är mer tolerant mot syrefattiga miljöer, och andra amfipoder (märkräftar) som *tex. Gammarus zaddachi*, *Gammarus oceanicus*, *Corophium volutator* och *Pallasea quadrispinosa*.

Studier av icke-biologiska variabler, däribland syrekoncentrationen i sediment och bottenvatten, är av stor vikt för att kunna särskilja inverkan av omgivningsvariabler (t.ex. syrebrist och förekomst av sulfider) från effekter av miljögifter. På grund av otillräcklig finansiering har såväl syrekoncentrationen i bottenvatten som syrekoncentrationen i sedimentet tagits bort som obligatoriska mätvariabler i undersökningstypen efter revisionen av stationsvalet.

På grund av toxiciteten hos sulfider har mätning av lösta sulfider (H_2S , HS^-) hittills inkluderats som en frivillig variabel. Någon koppling mellan sulfidkoncentrationen och andelen döda äggsamlingar eller andelen missbildade embryon har inte kunnat konstateras.

Tabell 3. Översiktstabell för obligatoriska variabler och tidsperioder m.m.

Område	Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Enhet / klassade värden	Prioritet	Frekvens och tid- punkter	Referens till prov- tagnings- eller observa- tionsme- todik	Referens till analysmetod
Station	Prov	Djup till botten	m	1	Årligen, februari	Bil. 1 ref nr 11	Bil. 1ref nr 11, 12
	Monoporeia affinis alt. Pontoporeia femorata, Honor	Längd	mm	2			
		Parasitan- grepp	ja/nej	1			
		Somitskador	ja/nej				
		Antal ägg					
		Död ägg- samling	ja/nej				

Område	Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Enhet / klassade värden	Prioritet	Frekvens och tid- punkter	Referens till prov- tagnings- eller observa- tionsme- todik	Referens till analysmetod
	Embryon	Utvecklings- grad enligt Sundelin & Eriksson 1998	Klassat				
	Missbildade och membranskad ade embryon	Antal					
	Döda embryon	Antal					
	Outvecklade /odifferentiera de embryon	Antal					
	Bottensubstrat	Sedimentlukt	Svavelväte Ingen lukt	1			
		TOC-halt	mg/kg	1			Ackreditera d enl. Swedac
	Vatten	Våghöjd	m	1			
	Luft	Vindriktning	Klassat ¹	1			
		Vindhastighet	m/s	1			
Biologisk beskrivning av provet, sedimentets beskaffenhet, väderlek m.m. kan registreras som anmärkningar							

Frekvens och tidpunkter

Provtagning sker en gång per år under månadsskiftet januari-februari (vecka 3 – 4). Vid denna tidpunkt på året befinner sig djuren i ett sent skede i embryonalutvecklingen men före kläckning, då avvikelser är lättast att upptäcka. Analys av embryon även vid ett tidigt skede i embryoutvecklingen kan ge möjlighet att utreda de fysiologiska orsakerna till att honorna bär på utvecklade/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.

Det är väsentligt att alla honor fortfarande bär sin avkomma så att provet är representativt för hela populationen på mätstationen. På varje station tas sedimentprov, som bör innehålla minst 50 gravida honor/station.

Observations/provtagningmetodik

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. I dagsläget finns emellertid inte ekonomiska resurser (kraftigt fördyrade fartygskostnader) att ta tillräckligt många bottenhugg för att erhålla 50 gravida honor. Därför har vi sedan revisionen av stationsnätet då antalet stationer fördubblades tagit bottenskrap som ger ett betydligt större antal individer per prov. Sedimentet sållas genom 1 mm såll för att ta vara på de gravida honorna. Eftersom det är väsentligt att få levande honor i provet är det emellertid inte möjligt att sålla ett sediment med styv lera under alltför lång tid för att erhålla ett kvantitativt prov. I sådana fall skall kvaliteten prioriteras framför kvantiteten. Vid mycket låg temperatur är det en fördel att arbeta i uppvärmd lokal för att undvika bl.a. igenfrysning av såll. De levande, gravida honorna transporteras i väl syrsatt brackvatten till laboratoriet för analys. Eftersom vitmärlan är en kallvattenart är det viktigt att vattentemperaturen inte överstiger 7-8 °C.

Isbildning medför svårigheter att använda vinsch och huggare. Under dessa förhållanden kan prover tas från isen med specialkonstruerad eldriven bottensug, en s.k. HA-sug (konstruerad av Hägerroth och Andersson) som drivs med ett bensindrivet elaggregat (10). HA-sugen fungerar som en dammsugare, där sedimentet filtreras nere på botten och vitmärlor insamlas i en nätpåse.

UTRUSTNINGSLISTA

Provtagningsutrustning och kemisk analysutrustning

Fast utrustning med avskrivningskostnader: Sedimentskrapa enligt Lundgren, Van Veen-huggare. Kajakhämtare med c:a 40 plexiglasrör och stoppers, samt snittningsapparat. HA-sug vid svåra isförhållanden. Konduktivitetmätare. Rostfria såll, sållbord, kajakrörshållare. För syremätning krävs pH-meter/jonmeter, syremätare, automatpipetter (Gilson).

Rörliga kostnader: Proppar till kajakrör, syreelektroder, mätkolvar samt övriga glasvaror, kemikalier och backar. Möjliga fordon är båt försedd med hydraulvinsch (isbrytarklass 1) och snöskoter, 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 MZ 12 med underbelysning och överbelysning samt polarisationsfilter eller motsvarande mikroskop) samt digitalkamera med

bildanalysutrustning för fotodokumentation, 2 st kalljuskällor för mikroskopbelysning, objektbord, dissektionsbestick, små rostfria såll och tråg.

Rörliga kostnader är mikroskoplampor, plastburkar, petriskålar, glasvaror och håvar.

Tillvaratagande av prov, analysmetodik

Den biologiska analysen görs på levande djur under stereomikroskop (lämpligen ett Leica M 10 med polariserat kalljus, och digitalkamera), där äggen friprepareras och analyseras med avseende på tidigare beskrivna variabler (11, 12). 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 ekologi, miljö och botanik (DEEP) vid Stockholms universitet eller motsvarande laboratorium som är ackrediterad enligt Swedac.

Fältprotokoll

Ett fältprotokoll (se exempel i Bilaga 1) bör innehålla uppgifter om datum, start och sluttid, provtagningslokalens position (N- och E-koordinater), vattendjupet där provet tas, vindriktning, vindhastighet och våghöjd, temperatur och syrehalt i bottenvattnet, samt sedimentets beskaffenhet och lukt.

Kvalitetssäkrade data ska efter slutfört uppdrag levereras till nationell datavärd för miljögifter (SGU) enligt datavärdskapets leveransmall för biota.

Leveransmallen bör därför laddas ner före undersökningens början så att samtliga uppgifter som krävs för leveransen samlas in. Det är också viktigt att se till att ProvplatsID är registrerat i stationsregistret samt att ämneskoder och övriga relevanta koder är inlagda i Miljödatasamverkan, i annat fall måste utföraren begära att stationerna registreras samt att koder skapas. Mer information och instruktioner finns här:

<https://www.sgu.se/produkter/geologiska-data/nationella-datavardskap/datavardskap-for-miljogifter/biota/>

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 vitmärslan framför allt livnär sig på sedimenterande material från vårbloomingen av kiselalger. Dessa uppgifter kan därför ge information om tillväxten, vilken i sin tur styr vitmärslans fekunditet, vilken har betydelse för produktion och individtäthet. Dessutom kan information om sedimenthalter av olika miljögifter på provtagningsstationerna underlätta tolkningsförfarandet.

Kvalitetssäkring

Personer som skall utföra undersökningen bör ha god kännedom om bottenfaunan i egentliga Östersjön och Bottniska viken, samt erfarenhet av sedimentprovtagning med dels bottenskrapa, van Veen-huggare, och Kajakhämtare. För den biologiska analysen krävs kännedom om embryoutveckling hos märkräfter samt träning i att analysera vitmärleembryon. Kvalitetssäkring sker kontinuerligt genom att olika utförare bestämmer samma äggkullar (ca 50 st) för att kontrollera graden av felprocent (se 11, 12). Portabel syremätare för mätning av syre i bottenvatten kalibreras enligt svensk standard SS-EN 25814 och 25813. Elektroder kalibreras enligt respektive manualer (se kapitlet om provtagningsmetodik).

Databehandling, datavärd

Rådata levereras till SGU (kontaktperson: Finn Baumgartner) enligt datavärdens önskemål. Data skall även levereras till ICES via SGU men ännu saknas parameterkoder.

Tabell 3 innehåller standardiserade begrepp för entydig och jämförbar dataregistrering. Den ger dessutom tips om en struktur för hur lagringen kan ske.

Rapportering, utvärdering

Några förslag på enkla presentationer:

- Andelen honor med missbildade embryon samt frekvensen missbildade ägg och embryon på recipients- och referensstationer.
- Andelen utvecklade /differentierade ägg och embryon, osv.

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

Tids- och kostnadsuppskattning

Eftersom en beräkning av kostnaden för undersökningen snabbt blir förlegad ska kostnadsberäkningar kompletteras med tidsåtgång.

Fasta kostnader: Avskrivningskostnader per år under fem år för nyinköpt utrustning:

- Stereomikroskop med stativ samt ljuskälla 200 000 kr
- Digitalkamera 50 000 kr
- 2 Syremätare a'20 000 kr
- Summa avskrivningskostnad per år = 58 000 kr

Material- och resekostnader beräknades i januari 2019 att uppgå till ca 1000 kr per prov (fartygskostnader ej inräknat).

Analyskostnader: I januari 2019 var den genomsnittliga kostnaden för biologisk och kemisk analys ca 3200 kr per prov.

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

Författare och kontaktpersoner

Här presenteras ansvarig handläggare på Naturvårdsverket att kontakta för bl.a. policyfrågor och eventuell expert som kan kontaktas för ytterligare upplysningar. Författare ska alltid anges.

Programansvarig, Naturvårdsverket:

Elisabeth Nyberg

Miljögiftsenheten

Naturvårdsverket

106 48 Stockholm

E-post: elisabeth.nyberg@naturvardsverket.se,

Tel: 010-698 17 68

Författare:

Expert, Institutionen för Miljövetenskap och Analytisk Kemi (ACES)

Elena Gorokhova

Tel: 08-674 73 41

E-post: elena.gorokhova@aces.su.se

Brita Sundelin

Tel: 070-3136059.

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

Karin Ström
Tel: 08-674 74 72.
E-post: karin.strom@aces.su.se
Institutionen för Miljövetenskap (ACES)
Stockholms universitet
106 91 Stockholm

Referenser

Metodreferenslista

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

12. Sundelin B., Eriksson Wiklund A-K, Ford A (2008). The use of embryo aberrations in amphipod crustaceans for measuring effects of environmental stressors. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences no 41 (TIMES)

13. HELCOM 2018. Reproductive disorders: malformed embryos of amphipods. HELCOM supplementary indicator report. Online <http://www.helcom.fi/baltic-sea-trends/indicators/reproductive-disorders-malformed-embryos-of-amphipods>

Rekommenderad litteratur

1. 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

2. 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

3. Bregazzi, P. K. (1973). Embryological development in *Tryphosella kergueleni* (Miers) and *Cheirimedon femoratus* (Pfeffer) (Crustacea: Amphipoda) *Bulletin / British Antarctic Survey* 32: 63-74

4. 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*

5. Conlan, K. E. (1994). Amphipoda crustaceans and environmental disturbance: a review. *Journal of Natural History* 28: 519-554

6. Davis, G. E. (1993). Design elements of monitoring programs: the necessary ingredients for success. *Environmental Monitoring and Assessment* 26: 99-105

7. Davey, K.G., Saleuddin, A. S. M., Steel, C. G. H., Webb, R. A. (1983). Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive function, Invertebrates: Some principals and recommendations. *In: Vouk, V. B., Sheehan, P. J. (eds.) Methods for assessing the effects of chemicals on reproductive functions. SCOPE reports 20, John Wiley & Sons, Ltd p. 483-497*

8. Donner, K. O. (1971). On vision in *Pontoporeia affinis* and *P. femorata* (Crustacea, Amphipoda). *Societas scientiarum Fennica. Commentationes biologicae* 41, p. 3-17

9. 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.

10. 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.

11. Eriksson, A-K., Sundelin, B., Broman, D., Näf, C (1996). Effects on *Monoporeia affinis* of HPLC-fractionated extracts of bottom sediments from a pulp

mill recipient. In: Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents. Servos et al (eds), St Lucie Press Florida, p. 69-78.

12. 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.
13. Hill, C. (1991). Mechanisms influencing the growth reproduction and mortality of two co-occurring amphipod species in the Baltic Sea. Dissertation, University of Stockholm
14. 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
15. Lalitha, M., Shyamasundari, K., Hanumantha Rao, K. (1991). Embryological development in *Orchestia platensis* Kröyer (Crustacea:Amphipoda). Uttar Pradesh J. Zool. 11 (2): 107-112
16. 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
17. Leonardsson, K., Sörlin, T., Samberg, H. (1988). Does *Pontoporeia affinis* (Amphipoda) optimize age at reproduction in the Gulf of Bothnia? Oikos 52: 328-336.
18. Leonardsson, K. (1994). Multiple density dependence in two sub-populations of amphipod *Monoporeia affinis*: a potential for alternative equilibria. Oecologia 97: 26-34
19. Lindström, M., Lindström A. (1981). Swimming activity of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda) - Seasonal variations and usefulness for environmental studies. Anns. Zool. Fenn. 17: 213-219
20. Lindström, M. (1992). The migration behaviour of the amphipod *Pontoporeia affinis* (Lindström). Scientific reports / Walter and Andrée de Nottbeck foundation no 7. Dissertation, University of Helsinki
21. 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
22. McCahon, C. P., Pascoe, D. (1988 a). Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluations tests: culture and selections of a sensitive life stage. Ecotoxicol. and Environ. Safety 15: 245-252.
23. 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
24. Rappaport, R. Jr. (1960). The origin and formation of blastoderm cells of gammarid Crustacea. The J. of exp. Zool. vol 144: 43-59

25. Samter, M., Weltner, W. (1904). Biologische Eigentümlichkeiten der *Mysis relicta*, *Palleseilla quadrispinosa* und *Pontoporeia affinis* erklärt aus ihrer eiszeitlichen Entstehung. Zool. Anz. 27(22): 676-694
26. Sarvala, J., Uitto, A. (1991). Production of benthic amphipods *Pontoporeia affinis* and *P. femorata* in a Baltic archipelago. Ophelia 34 (2): 71-90
27. 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
28. Segerstråle, S. G. (1937). Studien über die Bodentierwelt in südfinnländischen Küstengewässern III. Zur Morphologie und Biologie des Amphipoden *Pontoporeia affinis*, nebst einer Revision der *Pontoporeia*-systematik. Societas Scientiarum Fennica. Commentationes biologicae 7(1): 1-183.
29. Segerstråle, S. G. (1938). Zur Fortpflanzungsbiologie des Amphipoden *Pontoporeia femorata* Kröyer. Societas Scientiarum Fennica. Commentationes biologicae 7 (5): 1-23
30. Segerstråle, S. G. (1959). Synopsis of data on the crustaceans *Gammarus locusta*, *Gammarus oceanicus*, *Pontoporeia affinis* and *Corophium volutator* (Amphipoda Gammaridae). - Societas Scientiarum Fennica. Commentationes biologicae 20(5): 1-23.
31. 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
32. Segerstråle, S. G. (1970). Light control of the reproductive cycle of *Pontoporeia affinis* Lindström (Crustacea Amphipoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 272-275
33. 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.
34. Sundelin, B. (1983). Effects of cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. Mar. Biol. 74: 203-212.
35. Sundelin, B. (1984). Single and combined effects of lead and cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea: Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. In: Ecotoxicological testing for the marine environment. G. Persoone, E. Jaspers, and C. Claus (Eds). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2. p. 237-258
36. 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.
37. Sundelin, B. (1989). Ecological effect assessment of pollutants using Baltic benthic organisms. Tesis, Stockholm University.
38. Sundelin, B. (1992). Effect monitoring in pulp mill areas using benthic macro- and meiofauna. In: Södergren (ed). Environmental fate and effects of bleached

pulp mill effluents: proceedings of a SEPA conference held at Grand Hotel Saltsjöbaden, Stockholm, Sweden, 19-21 November 1991. Rapport / Naturvårdsverket 4031: 371-380.

39. Sundelin, B., Eriksson, A-K. (2001). Mobility and bioavailability of trace metals in sulfidic coastal sediments. *Environmental toxicology and chemistry* 20(4): 748-756
40. Sundelin, B., Ryk, L, Malmberg, G. (2000) Effects on the sexual maturation of the sediment-living amphipod *Monoporeia affinis*. *Environmental toxicology* 15(5): 518-526
41. Shiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., McDonald, R.W. (2007). Interactions between climate change and contaminants, a review. *Mar Poll Bull* 54: 845-856.
42. Sundelin, Rosa, R., Eriksson Wiklund, A-K (2008). Reproduction disorders in a benthic amphipod, *Monoporeia affinis*, an effect of low food quality and availability. *Aquatic Biology*, 2:179-190.
43. Sundelin, B., Eriksson Wiklund, A-K., Ford, A. (2008). The use of embryo aberrations in amphipod crustaceans for measuring effects of environmental stressors. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* no 41 (TIMES).
44. Eriksson Wiklund, A-K., Sundelin, B., Rosa, R. (2008). Population decline of the amphipod *Monoporeia affinis* in Northern Europe, consequence of food shortage and competition. *J Exp Mar Biol Ecol*, 367; 81-90.
45. Eriksson Wiklund, AK., Dahlgren, K., Sundelin, B., Andersson, A. (2009). Effects on benthic production of Climate induced alteration in the pelagic food web. *Mar Ecol Prog Ser*, 396: 13–25.
46. Gorokhova, E., Löf, M., Halldórsson, H., Tjärnlund, U., Lindström, M., Elfving, T., Sundelin, B. (2010). Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* 99 (2010) 263–274
47. Gorokhova, E., Löf, M, Reutgard, M., Lindström, M., Sundelin, B. (2013). Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquatic Toxicology* 127:46-53
48. Lehtonen, K., Sundelin, B., Lang, T., Strand, J. (2014). Development of tools for integrated monitoring and assessment of hazardous substances and their biological effects in the Baltic Sea. *Ambio* 43: 69-81.
49. Reutgard, M., Eriksson Wiklund, A-K., Breitholtz, M., Sundelin, B. (2014). Embryo development of the benthic amphipod *Monoporeia affinis* as a tool for monitoring and assessment of biological effects of contaminants in the field: A meta-analysis. *Ecological indicator* 36:483-490
50. Guban, P., Wennerström, L., Elfving, T., Sundelin, B., Laikre, L. (2015). Genetic diversity in *Monoporeia affinis* at polluted and reference sites of the Baltic Bothnian Bay. *Mar Poll. Bull* 93:245-249
51. Löf, M., Sundelin, B., Bandh, C., Gorokhova, E. (2016), Embryo aberrations in the amphipod *Monoporeia affinis* as indicator of toxic pollutants in sediment, a field evaluation. *Ecol Indicator* 60:18-30.

52. Löf, M., Sundelin, B., Liewenborg, B., Bandh, C., Broeg, K., Schatz, S., Gorokhova, E. (2016). Biomarker-enhanced assessment of reproductive disorders in *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment in the Baltic Sea. *Ecol Indicator* 63:187-185.

Uppdateringar, versionshantering

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

Version 1:3, 2005-09-23. Vissa mindre revideringar.

Version 1:4, 2021-03-16. Mindre revideringar fa. gällande strategi, datavårdskap och datahantering, kostnader samt kontaktpersoner.

Bilaga 1. Fältprotokoll

Tabell 1. Fältprotokoll för Brygga, fler kolumner kan behövas och antalet är beroende av antalet hugg/skrap per station.

Stationsnamn		
Datum		
Start tid		
Slut tid		

Positionskoordinater (WGS 84)			
	Latitud N°.....',°.....',
	Longitud O°.....',°.....',
Djup (m)		m	m
Vindriktning			
Vindhastighet (m/s)		m/s	m/s
Våghöjd (m)		m	m
Övrig väderinfo			

Tabell 2. Fältprotokoll för ett prov

Stationsnamn _____	
Datum _____	Start tid: _____ Slut tid: _____
Temperatur bottenvatten: _____	Syrgashalt bottenvatten ovan sedimentytan: _____
Svavelvätelukt: Ja <input type="checkbox"/> Nej <input type="checkbox"/>	
Sedimentbeskrivning _____	

Biologisk beskrivning av provet _____
Antal skrap med bottenskrapa: _____
Antal hugg med Van Veen huggare: _____ (där EJ går att provta m. bottenskrapa)

Tabell 3. Reproduktionsparametrar som ingår i undersökning (Löv et al. 2016).

Metric	Explanation	Derived variables
Fecundity	Eggs per female	Fecundity
Developmental stage	Embryo development on an arbitrary scale from 1 (the first cell divisions) to 9 (newly hatched juveniles)	Stage
Malformed embryos	Embryos with shortened and irregular midgut, shortened limbs or irregular comma-like compound eye	Percentage of females carrying malformed embryos in the brood. Median value for the percentage of malformed embryos in the brood. Only females carrying such embryos are used for calculations.
Membrane-damaged embryos	Embryos with leakage of lipids between the inner and outer egg membranes, enlarged egg (edema) or aberrant (irregular) egg shape	Percentage of females carrying membrane-damaged embryos in the brood. Median value for the percentage of membrane-damaged embryos in the brood. Only females carrying such embryos are used for calculations
Malformed and/or membrane-damaged embryos	Malformed and membrane-damaged embryos pooled	Percentage of females carrying malformed and/or membrane-damaged embryos in the brood Median value for the percentage of malformed and membrane-damaged embryos in the brood. Only females carrying such embryos are used for calculations
Embryos with arrested development ^a	Undifferentiated embryos whose development halted before gastrulation	Percentage of females carrying embryos with arrested development in the brood Median value for the percentage of embryos with arrested development in the brood. Only females carrying such embryos are used for calculations
Dead brood ^b	Dead eggs or decomposing embryos. Individual eggs/embryos cannot be identified; they are visible as a dark fat residue in the brood pouch	Percentage of females with dead brood
Partially dead brood	Dead brood in combination with living eggs or embryos	Percentage of females with partially dead brood