

Programområde: **Kust och hav**

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

**Författare:** Se avsnittet ”Författare och övriga kontaktpersoner”.

## 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. Effektmätningar i fisk har under många år tillämpats i recipienter vars miljö påverkats av föroreningar, bl.a. i samband med komplexa utsläpp från metall- och skogsindustrier (Larsson et al., 1985; Förllin et al., 1986; Andersson et al., 1988; Södergren 1993; Larsson et al., 1995), och mer specifika utsläpp av kemiska ämnen från andra industrier eller kommunala reningsverk (Ericson et al., 1998; Larsson et al., 1999). Metodernas känslighet är därför väl dokumenterade och har en av sina främsta fördelar i att de ger ett snabbt 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 kunna följa tidstrender av biokemiska, fysiologiska, histologiska och patologiska effektvariabler hos fisk, och därigenom kunna påvisa långsiktiga förändringar av miljötillståndet i undersökningsområdet
- genom regelbundna undersökningar i opåverkade områden kunna 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 *Giffri 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 kan ske med övriga två undersökningstyper som berör fisk, dels ”Övervakning av kustfisk<sup>1</sup>” och dels ”Organiska miljögifter i biologiskt material<sup>1</sup>”. Därmed fås en sammanhållen Integrerad fiskövervakning. Med stöd av integrerad fiskövervakningen 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. 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

---

<sup>1</sup> Under omarbetning

upptäckas hos fisk som exponeras för kemiska ämnen (Larsson et al., 1985; Förlin et al., 1986; Andersson et al., 1988). 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 och tånglake, 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. De 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 två arterna är också lämpade för samordning mellan regional och nationell miljöövervakning.

## **Statistiska aspekter**

Fiskarnas fysiologiska status är, utöver en eventuell antropogen belastning, påverkad av en rad olika abiotiska faktorer som klimat, hydrografi, syrehalt och salinitet. Fysiologiska funktioner står dessutom under inflytande av biotiska faktorer såsom ålder, storlek, könstatus, näringsstatus, och parasitangrepp. 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 bör undersökningarna läggas upp 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 bör de årliga provtagningarna på abborre respektive tånglake ske under samma vecka varje år. Kön- och storleksberoende variationer minimeras genom att bara könsmogna honfiskar i ett bestämt storleksintervall studeras vid varje provtagningsområde.

För både abborre och tånglake rekommenderas att analysen omfattar 25 individer av honkön från varje provtagningsstation. 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). 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 vid Laboratoriet för akvatisk ekotoxikologi, Stockholms universitet, och Zoologiska institutionen, Göteborgs 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 (*determinander*) som ingår i undersökningstypen presenteras i nedanstående tabell. En utförlig beskrivning av de olika mätvariablerna finns i Bilaga 1.

#### **Fisk: Abborre (a) Tånglake (b)**

<i>Företeelse</i>	<i>Determinand (Mätvariabel)</i>	<i>Metod- moment</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Priori- tet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens till provtagnings eller observa- tionsmetodik</i>	<i>Referens till analysmetod</i>
Fisk ( <i>art och individ</i> )	Total längd		mm	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7, 17	
Fisk	Total vikt (massa)		g	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7, 17	
Fisk    Gonad	Vikt		g	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7, 17	
Fisk    Lever	Vikt		g	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7, 17	
Fisk	Somatisk vikt (tot vikt – gonadvikt) <sup>i</sup>	Beräknat värde	g	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		1, 7

Version 1:1, 2006-02-10

**Fisk:** Abborre (a) Tånglake (b)

Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Metod- moment	Enhet / klassade värden	Priori- tet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- eller observa- tionsmetodik	Referens till analysmetod
Fisk Rensad fisk <sup>1</sup>	Vikt <sup>1</sup>		g	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		
Fisk	Somatiskt index	Beräknat värde	g/cm <sup>3</sup> 100×(som. vikt)/(längd i cm) <sup>3</sup>	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		1, 7
Fisk	Gonado- somatiskt index (GSI)	Beräknat värde	100×(gonad- vikt/ som. vikt)	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7	1, 7
Fisk	Lever-somatiskt index (LSI)	Beräknat värde	100×(lever- vikt/ som. vikt)	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7	1, 7
Fisk	Levertotalvikt index (LTI)	Beräknat värde	100×(lever- vikt/ total- vikt)	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7	1, 7
Fisk	Kön		Hane, Hona	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7	
Fisk	Ålder	(a) gällock; (b) otolit	År	(a) 1 (b) 1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		12
Fisk	Yttre sjukdomar, Skador			1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7	
Fisk Lever	Parasitangrepp			1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 7	
Fisk	Histopatologi (Histologiska förändringar)			1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	7	7
Lever	Nekrotiska celler Degenererade celler Makrofag- centra, Före- komst		% (av lever- vävnaden)	1 eller 2			
Mjälte	Makrofag- centra, Före- komst			1 eller 2			
Fisk Helblod	Andel vita blodceller Andel lymfo- cyter Andel granulo- cyter Andel trombo- cyter	Differential- räkning	%	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov	1, 17	13, 19

*Hälsotillstånd hos kustfisk -  
biologiska effekter på subcellulär och cellulär nivå*

*Version 1:1, 2006-02-10*

**Fisk:** Abborre (a) Tånglake (b)

<i>Företeelse</i>	<i>Determinand (Mätvariabel)</i>	<i>Metod- moment</i>	<i>Enhet / klassade värden</i>	<i>Priori- tet</i>	<i>Frekvens och tidpunkter</i>	<i>Referens till provtagnings- eller observa- tionsmetodik</i>	<i>Referens till analysmetod</i>
Fisk Helblod	Hematokrit		%	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		1, 6
Fisk Helblod	Bloodglukos		mmol/l blod	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		2, 3
Fisk Helblod	Hemoglobin		g/l blod	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		20
Fisk Blodplasma	Bloodlaktat		mg/100ml blodplasma	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		1, 6
Fisk Lever	Lever-glykogen		mg/100mg vävnad	Utgått fr.o.m 2000			1, 6
Fisk Muskel	Muskel- glykogen		mg/100mg vävnad	Utgått fr.o.m 2000			1, 6
Fisk Lever	Cytokrom P- 450-halt		nmol/mg protein	2	Under vissa betingelser, se bilaga 1		15
Fisk Lever	EROD-aktivitet (etoxyresorufin- O-deetylase)		nmol/(mg protein × minut)	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		1, 4, 8
Fisk Lever	Protein-halt		mg protein/g lever (våtvikt)	3	Årligen, (a) sept (b) april/nov		14
Fisk Lever	GR-aktivitet (glutation- reduktas)		nmol/(mg protein × minut)	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		5
Fisk Blodplasma	Vitellogenin- halt		ng/ml	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		11, 16
Fisk Lever	MT-halt (metallotionein)		nmol/mg protein	1 eller 2	Årligen, (a) sept (b) april/nov		10
Fisk Lever	DNA-addukter		nmol/mol	1 eller 2	Årligen, (a) sept (b) april/nov		7
Fisk Blodplasma	Kloridhalt		mmol/l	1	Årligen, (a) sept (b) april/nov		1, 9
	Na-halt		mmol/l	2			1, 9
	K-halt		mmol/l	2			1, 9
	Ca-halt		mmol/l	2			1, 9

**Fisk:** Abborre (a) Tånglake (b)

Företeelse	Determinand (Mätvariabel)	Metod- moment	Enhet / klassade värden	Priori- tet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- eller observa- tionsmetodik	Referens till analysmetod
Fisk Galla till provbank				3	Årligen (a)sept (b) april/nov		
Fisk Urval av organ till histologisk provbank				3	Årligen (a)sept (b)april/nov		
Fisk	Halter av miljögifter och deras nedbryt- ningsprodukter	Kemisk analys		3	Årligen a) sept b) april/nov	1, 7, 17	Eventuell analys enligt annan under- sökningstyp
Vatten	Temperatur		°C (Cel)	2			

<sup>i</sup> Det finns fler definitioner av "somatisk vikt" och det är viktigt att uppgifter om vilken definition som avses registreras ihop med data. Fiskeriverket använder definitionen Somatisk vikt = Kroppsvikt (d.v.s. den rensade fiskens vikt) + levervikt. Därför rekommenderas att i Hälsoundersökningen även mäta vikten hos den rensade fisken.

### **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 är den sexuella aktiviteten låg under våren (april). I november har ynglen kläckts och honorna har avkomman i en yngelsäck. Detta möjliggör studier av reproduktionskapacitet och status hos avkomman. Därför bör provtagningar på tånglake ske vid två tillfällen per år. Abborre fiskas lämpligen med nät under september och tånglake med ryssja under april respektive november.

### **Observations/provtagningsmetodik**

Endast köns mogna honor inom ett bestämt storleksintervall, 20-30 cm, används för att minimera köns- och storleksberoende variationer. 25 honor från varje provtagningsstation insamlas och analyseras. Fångst sker på ett standardiserat och skonsamt sätt med nät för abborre och ryssja för tånglake. Direkt efter fångst förs fisken i fisktransportkär 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 fiskarbod eller annat uthus, ett garage eller någon form av mobilt utrymme. Den totala tiden för hela provtagningen från

håvning av fisken ur sumpen till dess att samtliga prover omhändertagits och djupfrysts 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 och organprover för mätning av biokemiska, fysiologiska och histologiska variabler djupfryses eller placeras i fixerlösningar omgående för senare analys på laboratorium. För mätvariablerna hematokrit<sup>2</sup>, 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).

### Utrustningslista

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 djupfrysta (med 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 används ett protokoll (se Bilaga 3) där observationer och analyser som görs direkt vid provtagningen noteras.

### **Bakgrundsinformation**

En viktig orsak till att arterna abborre och tånglake rekommenderas 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 tillsammans med insamlade data från delprogrammen *Miljögifter i biologiskt material* och *Övervakning av kustfiskbestånd*. Därmed

---

<sup>2</sup> Volymandel röda blodkroppar i blodet.



Version 1:1, 2006-02-10

möjliggörs en sammanvägd tolkning av miljötillståndet avseende fiskhälsa, fiskbeståndens täthet och struktur, fiskens tillväxt och kondition, samt miljögiftsbelastning. I ett regionalt program, frikopplat från det nationella programmet, finns givetvis möjligheten till samtolkning med dessa data under förutsättningen att samma arter och sammansättning av undersökningsmaterial samt tidpunkt för fiskfångst tillämpas.

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, trend och områdesövervakning* finns en kvalitetsdeklaration som omfattar organisation, ansvarsfördelning och kvalitetsrutiner för miljöövervakningsverksamheten. Genomförandet av delprogrammet följer de kvalitets-säkringskrav som ställs av Naturvårdsverket vid upphandling av miljöövervakningsuppdrag (Naturvårdsverket, 2000).

Av största vikt är att fångst, provtagningsprocedurer, analyser och datahantering sker på ett standardiserat sätt och följer utarbetade metodanvisningar. Det är önskvärt att de provtagningsrutiner och analysmetoder som ingår i undersökningstypen Hälsotillstånd hos kustfisk omfattas av ackreditering.

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

*Insamling av fisk.* Fisket skall utföras 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. Vid byte av provtagningslokal sker parallella studier under en övergångstid i tidigare och ny lokal.

*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 minst 2-3 personer för att genomföra hela förfarandet inom den givna tidsramen (10 min.). Transport av prover till laboratorium/provbank skall ske enligt ett kvalitetssäkrat 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 bör parallellanalyser utföras under en övergångsperiod.

*Databearbetning och utvärdering.* Alla framtagna data bör genomgå 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 resultattillförlitlighet*

- 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 Fiskeriverket (adress se nedan).

Fiskeriverket är datavärd för fisk i inlands- och kustvatten. Kustlaboratoriet i Öregrund fullgör den del av datavärdskapet som omfattar föreliggande undersökningstyp samt undersökningstypen *Övervakning av kustfisk*.

#### *Kontaktperson för datavärdskapet:*

Gunilla Sandberg  
Fiskeriverket  
Kustlaboratoriet

#### *Adress:*

c/o Naturvårdsverket  
106 48 Stockholm  
Tel: 08-698 1288  
E-post: [gunilla.sandberg@naturvardsverket.se](mailto:gunilla.sandberg@naturvardsverket.se)

## **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. 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 miljökvalitetsmålen 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).

## Kostnadsuppskattning

Som exempel redovisas nedan beräknade kostnader för genomförande av de nationella hälsoundersökningarna på abborre vid tre undersökningsområden. Beräkningsår är 2005. Hälsoundersökningarna på tånglake har i stort sett samma kostnader.

### Fasta kostnader

Löner/mötesverksamhet:	Projektledning/samordning, fast provtagningspersonal, resor/planeringsmöten	213 500 kr/år
Fångst/fältprovtagning:	Yrkesfiskare, nätkostnader, båthyra, provtagning (resor, logi, materiel)	34 500 kr/år
Adm kostnader:	Förvaltningsavgifter, lokalavgifter vid Göteborgs universitet (35 %)	176 000 kr/år

### Analyskostnader

Kostnaderna för biokemiska, fysiologiska, histologiska och patologiska analyser avser 3 undersökningslokaler, 24 mätvariabler på 25 honabborrar/lokal och 6 mätvariabler på 10 hanfiskar/lokal.

Analyserna omfattar:	hematologi och övriga blodanalyser (plasmajoner); leverenzym; vitellogenin; metallothionein; DNA-addukter; leverhistologi.	166 000 kr/år
----------------------	--	---------------

### Tidsåtgång

För varje provtagningslokal (totalt 3 lokaler) beräknas följande tidsåtgång:

Fångst, sumpning (inkl förarbete och efterarbete):	1 personvecka/lokal
Provtagning, inkl restid, 3 personer × 2 dagar:	1 personvecka/lokal
Analys inkl databearbetning; 24 mätvariabler:	8 personveckor/lokal
Utvärdering/rapportering:	1 personvecka/lokal
<b>Sammanlagt för tre provtagningslokaler:</b>	<b>33 personveckor</b>

## Undersökningar enligt det nationella programmet

Det nationella delprogrammet för *Hälsotillstånd hos kustfisk* är idag uppdelat på två delar:

1) Undersökningar på abborre i Bottniska viken och egentliga Östersjön som utförs av Avdelningen för Tillämpad miljövetenskap, Göteborgs universitet samt

2) Undersökningar på tånglake i Skagerack och egentliga Östersjön som utförs av Zoologiska institutionen, Göteborgs universitet. Ansvaret för samordning av de två delarna, samt samordningen av den integrerade fiskövervakningen (som inkluderar *Hälsotillstånd hos kustfisk*, *Övervakning av kustfisk* samt *Organiska miljögifter i biologiskt material*) är Åke Larsson vid Institutionen för Växt- och Miljövetenskaper vid Göteborgs universitet. Utöver de två institutionerna vid Göteborgs universitet så medverkar främst Laboratoriet för akvatisk ekotoxikologi, ITM, Stockholms universitet, i delprogrammet.

En viktig målsättning är att få en ökad integrering med övriga program för fisk. En sådan integrerad fiskövervakning kräver att variablerna i de olika programmen knyts samman på ett optimalt sätt. Genom detta angreppssätt får man möjligheten att kunna göra mekanistiska kopplingar mellan de olika biologiska organisationsnivåerna.

Efter en utförd intern utvärdering av de första 12 årens mätningar gjordes en revision av delprogrammet år 2000. Följande variabler infördes i mätprogrammet: Histologi i lever och mjälte (abborre och tånglake), metallothionein (abborre, en kuststation), vitellogenin (abborre samt tånglake från vårprovtagningen vid Fjällbacka) glutationreduktas (båda arter och samtliga kuststationer), och DNA-addukter (abborre från en kuststation samt tånglake från vårprovtagningen vid Fjällbacka). Dessutom samlas andra organ (ex. tarm, gonad), utöver lever och mjälte, in och läggs i en provbank för eventuell framtida histologisk analys.

De ökade kostnaderna för detta tillägg av mätvariabler har huvudsakligen finansierats genom förändringar av delprogrammet. Variablerna glykogen i lever respektive muskel, som ej har visat sig vara tillräckligt känsliga och stabila, har utgått som obligatoriska variabler. Dessutom har undersökningarna på tånglake vid Holmöarna utgått till förmån för en utökning med en vårprovtagning på tånglake vid Fjällbacka. Slutligen har det skett en utglesning av undersökningarna på abborre vid den inre stationen i Kvädöfjärden, vilka i fortsättningen utförs vart 3:e år. 2000 års revision av delprogrammet, som skedde efter noggrant övervägande, innebär att mätprogrammet på ett effektivare sätt uppfyller målsättningen att beskriva hälsotillståndet hos kustfisk. Det bör även understrykas att den inbyggda långsiktiga strategin i delprogrammet med långa mätserier inte har brutits med denna revidering.

Efter bearbetning och sammanställning av årets data sker en utvärdering av resultaten av respektive utförare i samverkan med samtliga deltagande institutioner. Resultaten diskuteras också vid regelbundna möten i *Gruppen för Integrerad fiskövervakning* i syfte att få en sammanvägd tolkning av miljöövervakningsdata för kustfisk.

De utförande institutionerna har ett gemensamt ansvar för rapportering och spridning av miljöövervakningsresultat. Sakrapportering sker i form av lägesrapporter eller temaartiklar som redovisas årligen vid seminarier och i publikationer från de marina forskningscentra. Det är också av stor vikt att data redovisas i vetenskapliga tidskrifter, vid vetenskapliga möten och vid möten med avnämare såsom miljömyndigheter eller industri-företrädare. Därigenom möjliggörs en kritisk granskning av erhållna resultat och gjorda tolkningar. Strävan är också att regelbundet göra en integrerad rapportering av miljötillståndet avseende fiskhälsa, fiskbeståndens struktur och täthet, samt miljögiftsbelastning.

## **Författare och övriga kontaktpersoner**

*Programområdesansvarig* vid Naturvårdsverket:

Tove Lundeberg

Miljöövervakningsenheten

Naturvårdsverket

106 48 Stockholm

Tel: 08-698 1611

E-post: tove.lundeberg@naturvardsverket.se

*Experter att kontakta angående undersökningstypen och delprogrammet:*

Åke Larsson

Inst för Växt- och Miljövetenskaper

Göteborgs universitet

Box 461

Version 1:1, 2006-02-10

405 30 Göteborg  
Tel: 031-773 3824  
E-post: ake.larsson@miljo.gu.se

Lars Förlin  
Zoologiska institutionen  
Göteborgs universitet  
Box 463  
405 30 Göteborg  
Tel: 031-773 3676  
E-post: l.forlin@zool.gu.se

Författare: Åke Larsson

## 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 Glucose-Bestimmung 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 *Percafluviatilis* 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 6<sup>th</sup> 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.

**Rekommenderad litteratur** (citerad i texten)

21. 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.
22. 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.
23. 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.

*Version 1:1, 2006-02-10*

24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Naturvårdsverket, 2002. Checklista – kvalitetssäkringsaspekter vid upphandling etc av miljöövervakningsuppdrag.  
[http://www.naturvardsverket.se/upload/02\\_tillstandet\\_i\\_miljon/miljoovervakning/handledning/checkkval.pdf](http://www.naturvardsverket.se/upload/02_tillstandet_i_miljon/miljoovervakning/handledning/checkkval.pdf)
28. Naturvårdsverket. Kvalitetsdeklaration för delprogrammet Kustfisk hälsa, trend och områdesövervakning.  
[http://www.naturvardsverket.se/upload/02\\_tillstandet\\_i\\_miljon/miljoovervakning/programomraden/kust\\_och\\_hav/kvalitetsdeklaration\\_fisk\\_halsa.pdf](http://www.naturvardsverket.se/upload/02_tillstandet_i_miljon/miljoovervakning/programomraden/kust_och_hav/kvalitetsdeklaration_fisk_halsa.pdf)
29. 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.
30. 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.
31. 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.

## **Uppdateringar, versionshantering**

Arbetsmaterial, 1997-06-30.

Version 1:1, 2006-02-10. 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**

Nedan följer en beskrivning av de variabler som presenteras i mätprogrammet.

### **GSI och LSI**

GSI (gonadosomatiskt index) är gonadvikten uttryckt som procent av den somatiska kroppsvikten. Den normala utvecklingen av reproduktionsorganen 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.

LSI (leversomatiskt index) är levervikten uttryckt som procent av den somatiska kroppsvikten. 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 aktivitet av xenobiotika-transformerade enzym.

Samtliga somatiska index 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 för-



*Version 1:1, 2006-02-10*

ändringarna 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. Här kan t.ex. nämnas immunohistokemiska tekniker där man med antikroppsteknik kan märka in för t.ex. avgiftningsenzymmer. Utvecklingen inom detta område går snabbt och här finns möjligheter att i framtiden tillämpa nya analyser på äldre redan insamlat och fixerat material.

Fördelar med histologiska metoder är att de ofta påvisar någon form av strukturell förändring som tydligare kan vara underlag till en åtgärd än t.ex. en subcellulär mer reversibel förändring. Analyser kan även utföras av mycket små provmängder som t.ex. av yngel eller embryon. Dessutom fungerar de som en intermediär biomarkör mellan de tidigt inducerbara biokemiska och fysiologiska förändringarna och förändringar på en högre biologisk organisationsnivå. Med hjälp av histologiska/histokemiska metoder underlättas därmed förståelsen för betydelsen av de subcellulära förändringarna högre upp i systemet.

I det nationella programmet utförs en övergripande histopatologisk undersökning av levern inklusive en kvantifiering av nekros/degeneration. Dessutom mäts förekomsten av makrofagcentra (MC) 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.

Histologiska undersökningar av lever och mjälte har prioritet 1. Histologiska prover av andra organ läggs i provbank för eventuell framtida analys (prioritet 3).

### ***Kolhydratmetabolism***

Den mest studerade stresseffekten 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 öknings 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.

Leverglykogen har ej mätts kontinuerligt då det jämfört med muskelglykogen ej 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 2.

### Laktat i blod

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

Analysen av laktat har prioritet 1.

### **EROD-aktivitet i lever**

Utsöndringen av fettlösliga organiska gifter från fisk och andra ryggradsdjur påskyndas av olika enzysystem som omvandlar ämnena till vattenlösliga produkter. Dessa kan sedan utsöndras via galla eller urin. Den första omvandlingen i denna avgiftning är ofta katalyserad av enzysystem som kallas cytokrom P450 monooxygenaser (äldre namn är mixed function oxidas, MFO).

Cytokrom P450 finns i flera former, som representerar enzymer med närbesläktade men specifika funktioner och egenskaper. En av dessa former som återfinns i fisklever kallas cytokrom P450 1A och har egenskapen att den induceras när fisken exponeras för ämnen såsom TCDD, plana PCB och polyaromatiska kolväten. Det vanligaste sättet att mäta detta enzym och därmed enzyminduktion är att mäta EROD-aktiviteten<sup>3</sup>. EROD-aktiviteten har använts som en känslig biomarkör för t.ex. oljeförorening eller utsläpp från skogsindustrier. I fallet skogsindustrier har man 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.

### Cytokrom-P-450

Den totala halten av cytokrom P450 är en relativt okänslig biomarkör för giftexponering. Den rekommenderas om man observerar en stor EROD-aktivitetsökning eller har andra indikationer på att fiskens avgiftningsskapacitet är kraftigt störd.

Variabeln har prioritet 2.

### **Proteinhalt i lever**

Proteinhalt mäts i lever och ingår som ett led i analysen av leverenzymer, såsom EROD. Normalt används inte protein som självständig mätvariabel. Redovisningen av variabeln har givits prioritet 3

---

<sup>3</sup> EROD är en förkortning för 7-etoxyresorufin-O-deetylas.

### **Glutationreduktas-aktivitet i lever**

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

Bestämning av glutationsreduktasaktivitet 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  $17\beta$ -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 i blodplasma hos hanfisk exponering för östrogenliknande ämnen och utgör en varningssignal för störningar i de funktioner som östrogen reglerar.

Analys av vitellogenin i blodplasma 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.

Analys av metallotionein har prioritet 1.

### **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.

Det vanligaste sättet att mäta förekomsten av DNA-addukter i vildlevande fisk är med så kallad  $^{32}\text{P}$ -postlabellingmetodik. Metoden innebär att DNA renas fram från vävnaden. Efter enzymatisk nedbrytning till enskilda nukleotider märks de förändrade nukleotiderna, addukterna, in med en radioaktiv substans och kan därmed detekteras och kvantifieras. Metoden har hög känslighet och har använts på ett stort antal fiskarter från olika delar av världen framförallt för att påvisa exponering för polyaromatiska kolväten. DNA-addukter har även påvisats hos abborre i en skogsindustrirecipient.

DNA-addukter av högmolekylära polyaromatiska kolväten har visat sig vara mycket stabila om proverna förvaras i lågtemperaturfrys, vilket gör det möjligt att spara prover för senare analys eller att analysera arkiverat material

Analys av DNA-addukter har prioritet 1.

### **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 i blodplasma har prioritet 1. Analys av natrium-, kalium-, och kalciumjoner har prioritet 2 (ingår som frivilliga variabler i mätprogrammet).

## **Bilaga 2. Utrustningslista för fiskprovtagning**

Håv (Obs lämplig maskstorlek för 100-300 gr fisk)  
Dissektionsbestick  
Skalpell  
Provtagningsprotokoll  
Bänkpapper  
Sax  
Hushållspapper  
Termometer (för vattentemperatur)  
Pappersnäsdukar  
Plasmacentrifug  
Hematokritcentrifug  
Hematokritrör + kletplatta  
Hematokritavläsare  
Killer/bedövare  
Skärbräda  
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 i kylskåp)  
Heparin (förvaras i kylskåp)  
Kyvetter för histologi  
Formalinbuffert  
70 % Etanol  
Objektglas  
Blodutstryksglas  
Preparatbricka  
Preparatlåda  
Hårtork  
Handskar  
Dest.vatten  
Kanyler för Blod (21G\*11/2" nr. 2 0,8 mm \* 40mm)  
Kanyler för Galla (23\*1" – nr.16 0,6 mm\*25mm)  
Elkablar  
Rör för Galla  
Bricka till vågen (för fisk)  
Tång för att hantera prover i flytande kväve  
Skyddsglasögon  
Sprutor för blod och galla (1 ml)  
Slaskburk för kanyler och skalpellblad  
Påsar för gällock  
Plastlåda med fackindelning (för rengörning av gällock)  
Vattenkokare

Plastpåsar 2-liters till fiskkadaver  
Plastpåsar till plasmaprovernas kapslar (joner + laktat)  
Plastpåsar till plasmaprovernas kapslar (VT)  
Plastpåsar till leverproverna i folie (EROD)  
Plastpåsar till leverproverna i preparatrör (MT)  
Plastpåsar till leverproverna i preparatrör (DNA-addukter)  
Skarvsladdar  
Märkpenor  
Kylboxar med kolsyreis  
N<sub>2</sub>-kärl med flytande kväve  
Sopsäckar stora  
Soppåsar  
Tejp  
Vitt A4 papper till fiskkadavermärkning  
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 0,5 ml till plasma (joner och laktat)  
Eppendorfrör 0,5 ml till plasma (VT)  
Automatpipetter 200 µl o 1000 µl  
Tippor till pipetterna

**Bilaga 3.**

**Fältprotokoll - Hälsotillstånd hos kustfisk (Svensk miljöövervakning)**

Station:                      År:                      Vecka:                      Art:                      Vattentemp:  
 Provtagare:                      \_\_\_\_\_

*Uttagna prover*

Fisk nr	Blod volym	Ext. sj.d.	Längd	Vikt	Kön	Gonad vikt	Lever vikt	Ht	Gluk	Hb	Prov bank	Blod utstr.	Plasma	Muskel	Hist.	MT	DNA add.	Galla	Övr.

Blodvolym: anges i ml med en decimal; Ext.sj.d. (yttre sjukdomar): anges med 1 och beskrivs på protokollets baksida; 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; Uttagna prover: provuttag anges med 1, gallprovet anges med nr för respektive provrör; Plasmagelé anges med gelé. Övriga anmärkningar: anges med 1 och beskrivs på protokollets baksida.