

Prosedyre 002: Innsamling og prøvetaking av marin fisk

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|---|
| 1. Prosedyrens formål..... | 2 |
| 2. Innsamling i felt..... | 2 |
| 2.1. Innsamlingsmetoder og håndtering | 2 |
| 2.2. Registrering av felldata | 3 |
| 2.3. Oppbevaring før forsendelse | 3 |
| 3. Prøvetaking i felt, nedfrysing av blod og lever | 3 |
| 4. Forsendelse..... | 4 |
| 4.1. Emballasje | 4 |
| 4.2. Transportrutiner | 4 |
| 5. Prøvetaking i lab..... | 4 |
| 5.1. Nødvendig utstyr og rengjøringsprosedyrer | 4 |
| 5.2. Individuelle data..... | 5 |
| 5.3. Otolitter | 5 |
| 5.4. Vevsprøver | 6 |
| 6. Dataregistrering, merking og innfrysing..... | 7 |
| 7. Referanser | 7 |
| 8. Vedlegg | 7 |

1. Prosedyrens formål

Denne prosedyren omhandler de ulike fasene i innsamling og prøvetaking av torsk (*Gadus morhua*) som gjøres for den nasjonale miljøprøvebanken for miljøgifter. Prosedyren skal beskrive de enkelte fasene på en måte som gjør at den kan benyttes som en frittstående og entydig veileder. Den skal ivareta alle krav til reproduserbarhet, kvalitet og registrering av data som stilles til prøvematerialet.

Antall individer av de ulike artene som skal innsamles fra hver lokalitet er gitt i de aktuelle årsprogrammene.

I denne prosedyren brukes betegnelsen innsamling om fangst av fisk som ender opp med hel fisk, død eller levende. Betegnelsen prøvetaking brukes om disseksjon av fisken og uttak av prøver av vev eller organer, samt registrering av individuelle data (lengde, vekt, kjønn etc.)

2. Innsamling i felt

2.1. Innsamlingsmetoder og håndtering

Fangstmetodene og den øvrige håndteringen av fisken skal sikre at den ikke på noen måte kontamineres av potensielle miljøgifter eller skades slik at det går ut over dens egnethet som forskningsmateriale. For vev som skal til effektanalyser gjelder generelt at det skal holdes kaldt (på is) inntil det kan fryses på flytende nitrogen.

Perioden for innsamling skal skje etter et avtalt program for å minske effekten av sesongmessige variasjoner. Om ikke annet er bestemt for den aktuelle bestanden skal innsamlingen skje om høsten og foretrukket fangstperiode er september-oktober.

Fangst, transport av levende individer og håndtering skal skje på en måte som er i overensstemmelse med Dyrevelferdsloven (2009). Innsamlingen skal skje fortrinnsvis med garn, ruse, trål eller krokredskap.

Avliving av fisken skal skje umiddelbart etter fangst såfremt den ikke overføres til oppsamlingskar eller liknende. Avliving bør skje med et kontrollert slag mot hodet. Avliving ved å kutte aorta eller gjellebuer (bløgging) skal ikke skje. Bruk av anestetiske eller kjemiske midler skal unngås på grunn av kontamineringsfaren. Bukhulen skal ikke åpnes og organer fjernes (sløyning) såfremt det ikke skal tas prøver i felt.

Under fangst og seinere håndtering skal fisken ikke komme i kontakt med potensielt kontaminerende flater eller stoffer. Unngå at den havner på dekket av båt hvor den kan komme i kontakt med forurenset vann. Bruk av engangshansker (nitril-gummi) skal benyttes såfremt praktisk mulig. Fisken bør oppbevares i kasser kledd med ren aluminiumsfolie. Tradisjonelle fiskekasser i ekspandert polystyren (EPS) skal unngås på grunn av faren for kontaminering av flammehemmere.

Er ikke annet bestemt i det aktuelle årsprogrammet skal det samles inn 25 individer av den aktuelle arten fra hver lokalitet. Hver enkelt fisk pakkes snarest mulig inn i tre lag med ren aluminiumsfolie og legges deretter i en ren pose av samme type som brukes til innfrysning i prøvebanken (MAGIC VAC®, polyetylen med ytre forsterkning av en nylonmembran), eventuelt rene poser eller sekker av ufarget polyetylen (PE). I posene legges det en merkelapp som identifiserer fisken. Merkelappen må være av et materiale som ikke går i oppløsning dersom det skulle bli vått, og opplysningene om fisken noteres med en blyant. Posene forsegles eller knyttes igjen.

Avvik fra prosedyren vedrørende fangst noteres på fangstskjemaet, og overføres til tabellen «Fisk» i databasen.

2.2. Registrering av felldata

For hver gruppe av fisk, eventuelt hver fisk, skal det utfylles et fangstskjema som redegjør for sted, tidspunkt og metode for fangst, samt person ansvarlig for innsamling. Eventuelle avvik fra prosedyrene skal noteres her.

Koordinatene for innsamlingssted skal oppgis, fortrinnsvis som UTM/EUREF89 (Universal Transvers Mercator) med sone 33N (epsg projection 32633), eventuelt i WGS84 (World Geodetic System 1984) i desimalgrader (Statens kartverk, 2009). Sistnevnte er referanse-kordinatsystemet som brukes for GPS-systemet.

2.3. Oppbevaring før forsendelse

Så raskt som mulig – og helst ikke seinere enn etter 4 timer etter fangst – skal fisken kjøles ned eller nedfryses fram til forsendelse til miljøprøvebanken. Oppbevaringssted og betingelser skal registreres på fangstskjemaet.

3. Prøvetaking i felt, nedfrysing av blod og lever

For lokaliteter hvor det bestemmes å fryse ned blod og lever for senere effektstudier, genetiske analyser mm. skal disse matriksene prøvetas i felt og fryses direkte ned i flytende nitrogen før overføring til laboratorium.

Av utstyr trengs det følgende:

- Pinsetter
- Skalpell og ekstra skalpellblader
- Tørkepapir, klorfritt
- Ren aluminiumsfolie
- Merkepenn
- Cryo-rør (tåler sentrifugering og nedfrysing til -196°C)
- Hepariniserte sprøyter og kanyler (5-10 ml; 0,6-1,2 mm)
- Pasteur-pipetter
- Mikro-sentrifuge (2000 g)
- Heparin-løsning (1000 IU/ml)
- Nitrogen-beholder/transporttank preparert med flytende N₂

For prøvetakingen gjelder de samme rutiner for rent prøvetakingsutstyr og håndtering som gitt i punkt 5.1. Prøverør merkes med en på forhånd avtalt unik kode for hvert individ og matriks. Sprøyter med påsatte kanyler prepareres med en heparin-løsning ved å fylle sprøyten full med løsning for deretter å tømme dem. Dersom de ikke brukes umiddelbart oppbevares de kaldt (optimalt 4 °C) fram til prøvetaking.

Fisken må være levende fram til prøvetaking. De kan oppbevares i en egnet beholder, fangst-ruse eller stengsel fram til prøvetaking, men dette bør være av kort varighet. Sørg for tilstrekkelig vannutskifting eller lufting av vannet slik at fisken ikke blir stresset av oksygenmangel. Før prøvetaking drepes fisken med et slag mot hodet. Deretter tas det en blodprøve fra kaudal-venen ved haleroten med en heparinisert sprøyte.

Såfremt det er mulig ut fra logistiske hensyn bør blodprøven sentrifugeres i felt, og separeres i en plasma-fraksjon og blodceller. Det gjøres ved at blodprøven overføres til mikro-sentrifugerør og sentrifugeres i 5 min. ved 2000 g. Supernatanten eller plasma suges opp med en Pasteur-pipette og overføres et cryo-rør som fryses

ned i nitrogenbeholderen, mens fraksjonen med blodcellene fryses i sentrifugerørret. Blodprøvene kan oppbevares kaldt (4 °C) i inntil 30 min før de sentrifugeres.

Hvis det ikke er praktisk mulig å sentrifugere prøven i felt, så overføres blodprøven til et merket cryorør som umiddelbart fryses ned i nitrogenbeholderen.

Deretter åpnes fiskens bukhule ved et ventralt snitt mellom bukfinnene med en skalpell, og en bit av lever (0,5-1,5 g) dissekeres ut fra dens midtparti. Leverprøven overføres til et merket cryorør som umiddelbart fryses ned i nitrogenbeholderen. Snittet i bukhalen lukkes igjen, og fisken emballeres i ren aluminiumsfolie, merkes med en unik kode som korresponderer med vevsprøvene, og behandles videre som i punkt 2.

Leveranse av transportbeholderen med flytende nitrogen avtales med miljøprøvebanken.

4. Forsendelse

4.1. Emballasje

Fisken skal transporteres nedkjølt eller nedfrost innpakket i aluminiumsfolie og MAGIC VAC® eller PE-poser i transportkasser godkjente for næringsmiddelindustrien, fortrinnsvis av polypropylen (PP) eller HD-polyetylen (HD-PE). Emballasjen skal sikre at fisken fraktes uskadet, nedkjølt og uten å komme i kontakt med potensielt forurensende flater eller stoffer. Den skal merkes tydelig med avsenders navn og adresse, og med miljøprøvebanken og en kontaktperson her som adressat. Forsendelsen skal merkes med at den inneholder biologisk materiale som skal holdes nedkjølt. Avvik fra transportrutinene eller skader på forsendelsen ved ankomst noteres på fangstskjemaet som følger forsendelsen, og de noteres i tabellen «Fisk» i databasen.

4.2. Transportrutiner

Såfremt fisken ikke kan holdes nedfrost skal den raskest mulig transporteres til miljøprøvebanken, f.eks med en «ekspres over natten» forsendelse. Forut for transport skal en kontaktperson ved prøvebanken informeres om leveringstidspunkt slik at forsendelsen kan tas i mot på en forsvarlig måte. Benyttes post eller et spedisjonsfirma skal pakken sendes på en sporbar måte.

5. Prøvetaking i lab

Her omtales prosedyrene for disseksjon, uttak og lagring av vevsprøver, skjell og otolitter, samt registrering av individuelle data. Etter prøvetaking kastes restene av fisken i beholder/sekker for biologisk avfall i Miljøprøvebanken. Eventuelle avvik fra prosedyrene for prøvetaking noteres i tabellen «Prøver» i databasen for miljøprøvebanken.

5.1. Nødvendig utstyr og rengjøringsprosedyrer

Forut for dissekering og uttak av vevsprøver skal personellet ha forberedt rent disseksjons-utstyr, et arbeidsbord dekket med ren aluminiumsfolie, forhåndsmerkede prøveglass, skjellkonvolutter, og registreringsskjema. Prøvetaker skal bruke rene hansker (nitril-gummi), og kun utsiden av fisken skal berøres.

For prøvetaking av marin fisk trengs følgende utstyr:

- Pinsetter
- Kniv

- Saks
- Skalpell og ekstra skalpellblader
- Målebrett eller målebånd
- Vekter (presisjon: 1 g og 0,1 g)
- Tørkepapir, klorfritt
- Ren aluminiumsfolie
- Prøveglass (nedfrysing til -25°C)
- Prøverør
- Skjellkonvolutt
- Vakumpakkemaskin med godkjente poser (MAGIC VAC®)
- Løsemidler (HPLC grade aceton og sykloheksan)
- Beholdere/glass for vasking av utstyr
- Engangshansker, nitril-gummi

Alle flater som fisken legges på skal dekkes av ren aluminiumsfolie. Vevsprøvene skal ikke komme i kontakt med dette underlaget. Et eventuelt underlag for bearbeiding av vevsprøver skal være dekket av glødet aluminiumsfolie. Alt redskap som benyttes i prøvetakingen skal enten være i stål eller av glass, kvarts eller annet uorganisk keramisk materiale. Det skal være rengjort i henhold til egne rengjøringprosedyrer (se følgende to avsnitt).

Rengjøring av redskap: Vaskes i uorganisk, alkalisk såpe (Neodisher UW) ved hjelp av oppvaskmaskinen installert i miljøprøvebanken (Miele G4230, 75 °C og 2 timers vask). Redskapen skylles så tre ganger med destillert vann, alternativt ionebyttet Milli-Q vann, for så å bades i løsemidler (HPLC grade), først 5 min. i aceton, deretter 5 min. i sykloheksan. Bading i løsemidler gjøres to ganger. Renset utstyr oppbevares innpakket i aluminiumsfolie inntil bruk.

Rengjøring av prøveglass: Prøveglassene skal være ubrukte og alle organiske rester skal være brent bort ved å gløde glassene i 2 timer ved 500 °C. Glassene forsegles med glødet aluminiumsfolie under korkene. Glassene skal merkes med etiketter (frysesikre) påtrykt et unikt prøvenummer (P_ID) generert fra miljøprøvebankens database.

Under prøvetaking skal personalet benytte egne frakker og sko, eventuelt sko-overtrekk. Langt hår skal dekkes til med plasthetter. Bruk av personlige pleieprodukter, med unntak av banken godkjente såper og sjampoer, skal unngås brukt et døgn før prøvetakning.

5.2. Individuelle data

Følgende individuelle data registreres: lengde målt fra snute til ytterkant av halefinnen når denne er naturlig utspilt (0,1 cm), total vekt (g, minimum 1 % presisjon), vekt av lever (0,1 g), kjønn, eventuelle synlige parasitter i bukhulen og eventuelle sår og skader. Individet (fisken) gis et eget unikt identifikasjonsnummer som genereres i databasen (Fisk_ID). Data skrives inn på et eget skjema, og overføres deretter til databasen. Skjellkonvolutten påføres fiskens identifikasjonsnummer og øvrige individuelle data. Registreringsskjema og skjellkonvolutter oppbevares i et arkiv.

5.3. Otolitter

Dette er strukturer som brukes til aldersbestemmelse, men otolitter kan også brukes til analyser av stabile isotoper og sporelementer. Otolittene må derfor ikke behandles på en måte som kan kontaminere dem eller gjøre dem uegnet for slike analyser.

Otolitter (sagittae) dissekeres ut ved å løsne skalletaket på fisken med en kniv eller skalpell, for så å hente dem ut med en spiss pinsett. Hjernen på fisken må ikke ødelegges dersom den skal dissekeres ut som en egen prøve. Otolittene tørkes rene for slim med et stykke rent tørkepapir. De oppbevares hele i et stykke sammenbrettet mykt, ufarget tørkepapir som legges i en lynlåspose i skjellkonvolutten.

5.4. Vevsprøver

Fisken tas ut til tining. Alle prøveglass, poser og konvolutter merkes med klistrelapper med unike koder. Engangshansker (nitril-gummi) skal brukes under prøvetakingen. Alle organer eller vev som skal prøvetas bør ikke berøres av annet enn rengjort redskap. Berøring med hånd eller hansker skal om mulig unngås. Mellom hver vevstype og hver fisk skal alt utstyr som kommer i berøring med organer og vev rengjøres. Det skal tørkes av nøye med tørkepapir og destillert vann, deretter vaskes med løsemidler (acetone og sykloheksan, 2 ganger med hver). Skalpellblader skal byttes. Både innveid materiale og brutto vekt av prøveglassene med lokk og Al-forsegling skal registreres. Eventuelt vekttap på grunn av tørking under nedfrysingsperioden kan derved beregnes. Alle prøvetakningsglass skal tilslutt gis en ytre forsegling med Parafilm™ som dekker overgangen mellom lokk og glass, eventuelt vakumpakkes i Magic Vac®-poser.

Dersom fisken har vært nedfrost bør lever dissekeres ut mens den ennå ikke er fullstendig tint. Hos torskefisk, hvor fett lagres i egne celler i leveren, vil disse cellene sprenge ved nedfrysing og leveren blir derfor lett utflytende etter tining. Leveren må derfor bare halvtines slik det skal være mulig å dele opp leveren i definerte biter før fordeling på replikater.

1. Lengde måles til nærmeste mm og vekt måles til nærmeste gram.
2. Fisken undersøkes for parasitter og skader
3. Åpne buken på fisken med saks eller skalpell. Dette må gjøres forsiktig slik at indre organer ikke blir skadet.



4. Bestem kjønn.
5. Disseker ut galleblæren, eller sug ut gallen ved hjelp av en sprøyte. Gallen overføres til et glassrør av egnert størrelse (ca 1-3 ml) som forsegles med glødet Al-folie og skrukork.



6. Lever kuttes løs ved hjelp av en pinsett og skalpell, eventuelt saks. Pass på at galleblæren ikke punkteres. Leveren sjekkes for synlige deformiteter/abnormiteter og misfarginger, og slike opplysninger noteres om de registreres. Total vekt av lever registreres. Mengde per prøve er minimum 5 g, og inntil seks replikater tas per individ. For å unngår effekter av lokale konsentrasjonsforskjeller i leveren deles den opp i flere biter fra ulike områder som kombineres til de replikate prøvene. Fra hver bestand lages også en blandprøve bestående av en delprøve fra hver fisk såfremt det er tilstrekkelig materiale. Prøvene fryses ned på 10 ml glass, eventuelt større glass om det er rikelig med materiale. Glassene forsegles med glødet Al-folie under lokkene.
7. Muskelen deles i flere biter og inntil seks replikate prøver á ca. 25–35 gram lages ved å kombinere biter fra ulike definerte deler av fileten. Fra hver lokalitet lages også en blandprøve bestående av en delprøve fra hver fisk såfremt det er tilstrekkelig materiale. Prøvene fryses ned på 45 ml glass. Glassene forsegles med glødet Al-folie under lokkene. Skjær av skalletaket på fisken. Ta ut hjernen på fisken og legg den over i et på forhånd veid glassrør av egned størrelse (ca. 1-3 ml). Prøven av hjernen veies på analysevekt og vekten noteres. Glassrøret forsegles med glødet Al-folie og skrukork.
8. Prøvene av filét, lever, galle og hjerne plasseres i fryseren i Miljøprøvebanken.

Data som er notert på fangstskjema og prøvetakingsskjema overføres til databasen. Hver fisk gis et unikt identifikasjonsnummer (Fisk_ID) som tilordnes et unikt prøvenummer (P_ID). I databasen legges det også inn entydig informasjon om hvilken reol, seksjon i denne, hylle og boks som prøven legges i.

Etter at prøvene er overført til oppbevaringsglassene og forseglet, fryses de ned ved -25 °C i fryselageret til miljøprøvebanken.

6. Dataregistrering, merking og innfrysing

Data som er notert på fangstskjema og prøvetakingsskjema overføres til databasen. Hver fisk gis et unikt identifikasjonsnummer (Fisk_ID) som tilordnes et unikt prøvenummer (P_ID). I databasen legges det også inn entydig informasjon om hvilken reol, seksjon i denne, hylle og boks som prøven legges i.

Prøveglassene skal være merket med en etikett (frostsikker) påført et unikt prøvenummer. Etter at prøvene er overført til oppbevaringsglassene og forseglet, fryses de ned ved -25 °C i fryselageret til miljøprøvebanken.

7. Referanser

Dyrevelferdsloven. 2009. Lov om dyrevelferd. Lovdata. URL: <http://www.lovdata.no/all/nl-20090619-097.html> (04.01.2013).

Statens kartverk. 2009. Koordinatbaserte referansesystemer. versjon 2.1 – Desember 2009. 48 s. URL: http://www.statkart.no/filestore/Standardisering/docs/koo_referansesyst.pdf. (04.01.2013)

8. Vedlegg

Vedlegg 1. Fangstskjema

Vedlegg 2. Prøvetakingsskjema med individuelle data for hver fisk



Fangstskjema, marin fisk

Skjemaet skal følge fisken fra den blir fanget og til den leveres til miljøprøvebanken (MPB). Opplysninger om fangst, oppbevaring og transport registreres på skjemaet. Skjemaet skal følge forsendelsen. Mottaker ved MPB skal kvittere på skjemaet og registrere forsendelsens tilstand ved ankomst. Eventuelle tilleggsopplysninger noteres på baksiden av skjemaet. Skjemaet arkiveres i miljøprøvebanken.

Fangstopplysninger

| | | | |
|---|--|---|----------|
| Lokalitet, navn: | Lokalitet, koordinater UTM sone 33(EUREF89) eller desimalgrader (WGS84) | <input type="checkbox"/> UTM <input type="checkbox"/> Grader | N: Ø: |
| Stasjon, navn: (fyller kun inn om nærmere spesifisering er nødvendig) | | <input type="checkbox"/> UTM <input type="checkbox"/> Grader | N: Ø: |
| Fangstdato: | Antall fisk: | Art: | |
| Fangstmetode: | Tid og temp. før fisken ble brakt til oppbevaringssted: Tid, timer: Ble fisken lagt på is eller nedkjølt etter fangst : | | |
| Fisker og fartøy: Navn, adresse, fartøy, mm. | | | |
| Innpakningsmetode: | <input type="checkbox"/> Alu-folie <input type="checkbox"/> Polyetylenpose | <input type="checkbox"/> Magic Vac Annet: | |
| Oppbevaring før forsendelse: | Temp. °C: | Oppbevaringssted: | |
| Foresendelse til MPB | | | |
| Sendt dato: | Transportmetode: | | |
| Ansvarlig for forsendelse: Navn, adresse mm. | | | |
| Mottatt dato: | Mottaker ved MPB, navn: | | |
| Temp. på fisk ved mottak: | <input type="checkbox"/> Nedkjølt på is | <input type="checkbox"/> Frossen | Annet: |
| Var forsendelsen uskadet? | <input type="checkbox"/> Ja Kommentar: <input type="checkbox"/> Nei | | |