



Prosedyre 003: Innsamling og prøvetaking av blåskjell

Innholdsfortegnelse

1.	Prosedyrens formål	2
2.	Innsamling i felt	2
2.1.	Fangstmetoder og håndtering	2
2.2.	Registrering av felldata	2
2.3.	Oppbevaring før forsendelse	2
3.	Forsendelse	2
3.1.	Emballasje	2
3.2.	Transport fra felt	3
4.	Prøvetaking i lab	3
4.1.	Nødvendig utstyr og rengjøringsprosedyrer	3
4.2.	Uttak av prøver	4
5.	Dataregistrering, merking og innfrysing	4
6.	Referanser	5



1. Prosedyrens formål

Denne prosedyren omhandler de ulike fasene i innsamling og prøvetaking av blåskjell (*Mytilus* spp.) som gjøres for den nasjonale miljøprøvebanken for miljøgifter (MPB). 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.

Blåskjell langs norskekysten utgjøres av et artskompleks bestående av tre fenotypisk svært like arter, *M. edulis*, *M. trossulus* og *M. galloprovincialis* og deres hybrider (Ridgway and Naevdal, 2004; Väinölä and Strelkov, 2011; Kijewski *et al.*, 2011, Brooks and Farmen, 2013). Det kan forventes at artene responderer noe ulikt med hensyn til bioakkumulering og biomarkører (Lobel *et al.* 1990). I prosedyren for miljøprøvebanken inngår det derfor uttak av prøver til genetiske analyser, slik som anbefalt av Brooks og Farmen (2013).

2. Innsamling i felt

2.1. Fangstmetoder og håndtering

Innsamlingsmetodene og den øvrige håndteringen av blåskjellene skal sikre at den ikke på noen måte kontamineres av potensielle miljøgifter eller skades slik at det går ut over dens egnethet som forskningsmateriale.

Perioden for innsamling skal skje etter et avtalt program for å minske effekten av sesongmessige variasjoner.

Til det ordinære prøvetakingsprogrammet skal samles inn minst 150 blåskjell i lengdeintervallet 3–5 cm på angitt sted. I tillegg skal det samles inn ca. 20 skjell som skal lagres med tanke på framtidig artsbestemmelse ved molekylærbiologiske metoder. Blåskjellene plukkes helst på stein eller svaberg ved å vasse i fjæra, ved snorkling eller fra båt. Unngå å samle inn skjell fra substrater som kan tenkes å kontaminere prøvene. Dersom det ikke finnes skjell i det ønskede lengdeintervallet samles det inn skjell av den størrelsen som finnes på lokaliteten. Blåskjellene pakkes gruppevis inn i aluminiumsfolie og legges i rene plastposer av polyetylen (PE). I posene legges det en merkelapp som identifiserer blåskjellene. Posene forsegles eller knyttes igjen og fryses ned så raskt som mulig etter innsamling.

2.2. Registrering av felldata

For hver gruppe av blåskjell, 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-koordinatsystemet som brukes for GPS-systemet.

2.3. Oppbevaring før forsendelse

Så raskt som mulig etter innsamling skal blåskjellene kjøles ned eller nedfryses fram til forsendelse til miljøprøvebanken. Oppbevaringssted og betingelser skal registreres på fangstskjemaet.

3. Forsendelse

3.1. Emballasje

De innsamlede blåskjellene sendes frosne eller nedkjølt til Miljøprøvebanken i en isolert forpakning.



Blåskjellene skal transporteres innpakket i aluminiumsfolie og PE-posere (alternativt Magic Vac®-posere) i kjølebag eller isoporeske. Skjellene bør pakkes i enheter på 25 individer. Emballasjen skal sikre at blåskjellene 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.

Der hvor blåskjellene innsamles i forbindelse med andre overvåkningsprogrammer, kan de sendes sammen med disse skjellene såfremt de pakkes og håndteres i henhold til overstående avsnitt.

3.2. Transport fra felt

Blåskjellene skal raskest mulig transporteres til miljøprøvebanken, f.eks. med en «ekspress 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.

4. Prøvetaking i lab

4.1. Nødvendig utstyr og rengjøringsprosedyrer

Forut for prøvetaking skal personellet ha forberedt rent disseksjons-utstyr, forhåndsmerkede prøveglass, og registreringsskjema. Prøvetaker skal bruke engangshansker, og kun utsiden av blåskjellen skal berøres.

For prøvetaking av blåskjell trengs følgende utstyr:

- Pinsetter
- Kniv
- Skalpell og ekstra skalpellblader
- Vekter (presisjon: 0,1 g)
- Skyvelær
- Ren aluminiumsfolie
- Glødet aluminiumsfolie
- Prøveglass (nedfrysing til -25°C)
- Kryorør (nedfrysing til -80 °C)
- Løsemidler (HPLC grade aceton og sykloheksan)
- Beholdere/glass for vasking av utstyr
- Engangshansker, nitril-gummi

Alle flater som blåskjellene legges på skal dekkes av ren aluminiumsfolie for at overskuddsvann skal kunne renne av. Et eventuelt underlag for bearbeiding av prøver skal være dekket av glødet aluminiumsfolie. All 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 rengjøringsprosedyrer (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 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/boks 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.

4.2. Uttak av prøver

Blåskjellene tas ut av fryser for opptining. Skjellene (skallene) som skal oppbevares skrapes rene for begroing med kniv eller skalpell. Skjellene åpnes og settes med den åpne siden ned på et ren aluminiumsfolie for at overskuddsvæske skal renne ut av skjellene (Figur 1a).

Blåskjellinnmaten må ikke berøres av annet enn rengjort redskap. Fortrinnsmessig skrapes den ut med en skalpell og samles i rene glødede prøveglass (Figur 1b). Skalpellblader og annet prøvetakingsutstyr byttes mellom hver lokalitet.

Blåskjellene fordeles på seks egnede prøveglass slik at det blir replikate prøver á ca. 25 gram. Både innveid materiale og brutto vekt av prøveglassene uten lokk og Al-forsegling skal registreres. Eventuelt vekttap på grunn av tørking under nedfrysingsperioden kan derved beregnes.

Med tanke på framtidig artsbestemmelse med molekylærbiologiske metoder skal det for hver lokalitet og år tas ut individuelle delprøver av bløtvev på omlag 100 mg for et tilfeldig utvalg på 20 individer. Hver individuelle prøve overføres til et eget kryorør, og disse samles i en egen boks for hver lokalitet og år.

Skall fra ca. 25 blåskjell tørkes i varmeskap ved 60°C i ett døgn, og legges deretter i en plastpose som merkes og lagres ved romtemperatur.



Figur 1a. Åpne blåskjell lagt til avrenning og videre prøvetaking.



Figur 1b. Prøveglass av innmat fra blåskjell før nedfrysing.

5. Dataregistrering, merking og innfrysing

Data som er notert på fangstskjema og prøvetakingskjema overføres til databasen. Hver prøve gis et unikt prøvenummer (P_ID) generert fra miljøprøvebankens database. I databasen legges det også inn entydig informasjon om prøvenes plassering i fryselageret, det vil si hvilken reol, seksjon i denne, hylle og boks som prøven legges i, alternativt deres plassering i en ultrafryser.

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

Boksene med prøver beregnet for artsbestemmelse (kryorørene) oppbevares ved -80 °C i en ultrafryser.

Alle prøveglass eller bokser skal merkes med etiketter (frysesikre) påtrykt unike prøvenummere (P_ID).



6. Referanser

Brooks, S.J. and Farmen, E. 2013. The distribution of the mussel *Mytilus* species along the Norwegian coast. J. Shellfish Res., 32:1-6.

Kijewski, T., Śmietanka, B., Zbawicka, M., Gosling, E., Hummel, H. and Wenne, R. 2011. Distribution of *Mytilus* taxa in European coastal areas as inferred from molecular markers. J. Sea Res. 65:224– 234.

Lobel, P.B., Belkhode, S.P., Jackson, S.E. and Longerich, H.P. 1990. Recent taxonomic discoveries concerning the mussel *Mytilus*: Implications for biomonitoring. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19:508-512.

Ridgway, G. and Naevdal, G.N. 2004. Genotypes of *Mytilus* from waters of different salinity around Bergen, Norway. Helgol. Mar. Res. 58:104-109.

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)

Väinölä, R. and Strelkov, P. 2011. *Mytilus trossulus* in Northern Europe. Mar. Biol. 158: 817-833.