



# Prosedyre 005: Innsamling og prøvetaking av egg

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. Prosedyrens formål</b>                      | <b>2</b> |
| <b>2. Innsamling i felt</b>                       | <b>2</b> |
| 2.1 Fangstmetoder og håndtering                   | 2        |
| 2.2 Registrering av felldata                      | 2        |
| 2.3 Oppbevaring før forsendelse                   | 2        |
| <b>3. Forsendelse</b>                             | <b>2</b> |
| 3.1 Emballasje                                    | 2        |
| 3.2 Transport fra felt                            | 3        |
| <b>4. Prøvetaking i lab</b>                       | <b>3</b> |
| 4.1 Nødvendig utstyr og rengjøringsprosedyrer     | 3        |
| 4.2 Individuelle data                             | 4        |
| 4.3 Tømming av egg                                | 4        |
| 4.4 Homogenisering av egg                         | 5        |
| <b>5. Dataregistrering, merking og innfrysing</b> | <b>5</b> |
| <b>6. Transport til Miljøprøvebanken</b>          | <b>5</b> |
| <b>7. Referanser</b>                              | <b>5</b> |



## 1. Prosedyrens formål

Denne prosedyren omhandler de ulike fasene i innsamling og prøvetaking av fugleegg 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.

## 2. Innsamling i felt

### 2.1 Fangstmetoder og håndtering

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

Under innsamling og seinere håndtering skal eggene ikke komme i kontakt med potensielt kontaminerende flater eller stoffer. Bruk av engangshansker skal benyttes såfremt praktisk mulig. Under innsamlingen i felt pakkes eggene i 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 av ufarget polyetylen (PE). I posene legges det en merkelapp som identifiserer egget. En skal ikke skrive med tusj direkte på egget! Posene forsegles eller lukkes. De legges fortløpende i egnede støtsikre beholdere av plast, papp eller metall.

### 2.2. Registrering av felldata

For hvert egg skal det utfylles et feltskjema som redegjør for sted, tidspunkt, art og kullstørrelse, samt person ansvarlig for innsamling. Eventuelle avvik fra prosedyrene skal noteres her. Koordinater oppgis med UTM-koordinater som er angitt i nasjonalt kartverk M711, fortrinnsvis som UTM/EUREF89 (Universal Transverse 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 fangst skal eggene kjøles ned og oppbevares fram til forsendelse til NINA. Egg som er skadet eller sprukket bør fryses ned.

## 3. Forsendelse

### 3.1 Emballasje

Eggene skal transporteres nedkjølt og innpakket som nevnt ovenfor (hvert enkelt egg særskilt innpakket) i solide transportkasser. Fuglestasjonene vil bli forsynt med spesielle koffertter til dette formålet.. Emballasjen skal sikre at eggene fraktes uskadet, nedkjølt og uten å komme i kontakt med potensielt forurensende flater eller stoffer. For å holde temperaturen nede, bør fryseelementer legges i koffertene eller kassene. De skal merkes tydelig med avsenders navn og adresse, og med NINA Trondheim og en kontaktperson der som adressat. Forsendelsen skal merkes med at den inneholder biologisk materiale som skal holdes nedkjølt.



## 3.2 Transport fra felt

Eggene skal raskest mulig transporteres til NINA. Forut for transport skal en kontaktperson ved NINA 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. Egg sent fra Arktis (Svalbard) kan holdes frossne til de sendes til laboratoriet ved NINA Trondheim for prøvetaking i lab.

## 4. Prøvetaking i lab

### 4.1 Nødvendig utstyr og rengjøringsprosedyrer

Forut for prøvetaking skal personellet ha forberedt rent utstyr, et arbeidsbord dekket med ren aluminiumsfolie, forhåndsmerkede prøveglass og registreringsskjema. Prøvetaker skal bruke rene hansker (nitril-gummi), og kun utsiden av eggene skal berøres. Skitne egg bør vaskes utvendig, helst med ionebytta eller destillert vann. Prosedyren er modifisert etter Bowerman et al. (1992)

For prøvetaking av egg trengs følgende utstyr:

- Pinsetter
- Spatler
- Petriskåler
- Eggbor
- Utblåsingsutstyr
- Skalpell og ekstra skalpellblader
- Skyvelær, helst elektronisk
- Mikrometer for måling av skalltykkelse
- Vekter (presisjon: 0,01 g)
- Tørkepapir, klorfritt
- Ren aluminiumsfolie
- Prøveglass (nedfrysing til -25°C)
- Vaskemidler (aceton, 96 % alkohol eller rektifisert sprit)
- Beholdere/glass for vasking av utstyr
- Engangshansker, nitril-gummi

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) Redskaper 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 cyclohexan eller etanol. Bading i løsemidler gjøres to ganger. Renset utstyr oppbevares innpakket i aluminiumsfolie inntil bruk. Ved bruk av skalpell brukes det ny for hver prøve. Det bør være godt avtrekk på stedet.

Rengjøring av prøveglass: Prøveglassene skal være ubrukte. 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.

## 4.2 Individuelle data

Følgende individuelle data registreres: Eggets lengde måles fra ende til ende, eggets største bredde ved ekvator, og hull diameter etter tømning (mm, 0,1 mm presisjon). Egget med innhold veies før tømning (minimum 0,1 g presisjon). Brutto vekt av de tomme prøveglassene med lokk og Al-forsgling skal registreres. Eventuelt vekt tap på grunn av tørking under nedfrysingsperioden kan derved beregnes. Egget gis et eget unikt identifikasjonsnummer som genereres i databasen (Egg\_ID). Eggenes mål skrives inn i lab skjemaet, hvor også individuelle data om art, innsamlingssted, dato, koordinater, innsamler og reproduksjonsdata blir skrevet inn. Skjemaene oppbevares i et arkiv.

## 4.3 Tømning av egg

Egginnholdet må ikke berøres av annet enn rengjort redskap. Berøring med hånd eller hansker skal ikke skje. Prøvetakingen bør foretas i et rent rom. Mellom hvert egg skal alt utstyr som kommer i berøring med egg og egginnhold rengjøres. Det skal tørkes av nøye med tørkepapir og destillert vann, deretter vaskes med løsemidler (acetone og cyclohexan eller etanol, 2 ganger med hver). Skalpellblader skal byttes for hvert egg. Eggeskallene skal fortrinnsvis berges hele. Utblåsningshullet bores ved ekvator, og det trenger normalt ikke være større enn 5 mm for å få ut innholdet. Det bores et hull ca. 2 mm bredt på motsatt side av egget for innblåsning av luft under tømning. Til dette kan brukes en sprøyte (50 ml) eller gummiblåse påmontert en pipette. Sprøyta eller pipettespissen rengjøres mellom hvert egg destillert vann og acetone. Egginnholdet tømmes direkte på prøveglasset. I tilfelle egget inneholder foster, kan det være fordelaktig å jobbe over en petriskål, for senere å tømme egginnholdet over i prøveglasset. Petriskålen vaskes mellom hvert egg på samme måte som ovenfor. Forskjellige redskaper kan da være nødvendig for å få ut innholdet, så som pinsett og spatel. Disse vaskes mellom hvert egg som ovenfor. Det kan noen ganger være nødvendig å lage et hull som er større enn eggbores diameter. I så fall beregnes hullets areal, og en tilnærmet hull diameter beregnes etter formelen  $D = 2 \sqrt{A/\pi}$ , hvor A er arealet i mm.

Pakk inn glassene i aluminiumsfolie og sett dem på fryselager i ei eske merket innholdsbeskrivelse og den fagansvarliges navn. Det slås en strikk e.l. rundt prøvene som kommer fra ett og samme egg.



Etter at innholdet er tømt, skylles eggeskallet gjentatte ganger innvendig med springvann til alle rester av innhold er fjernet. Siste skylling foregår med destillert vann. Det er viktig at spesielt kantene rundt utblåsningshullet er rene, av hensyn til senere måling av skalltykkelse. Eggeskallet tørkes så av utvendig med tørkepapir, og eggets ID-nummer påføres egget med en myk blyant. Eggene legges åpent i et Al-beger forta med tørkepapir til tørk i et skap som ikke er lufttett. Det tomme skallets vekt måles etter at det er tørket og har nådd en stabil vekt. Normalt tar dette en til to uker. Et par egg prøveveies med jevne mellomrom for å fastslå dette tidspunktet. Eggeskallvekten føres deretter inn på prøvetakingsskjemaet (se pkt. 5.2). Mål skalltykkelsen med et spesialmikrometer, eks. Starrett 0101M (se Fig. 1).

**Figur 1.** Måling av skalltykkelse.

Tykkelsen måles gjennom utblåsningshullet, til nærmeste hundredels millimeter. Minst fire mål, hvert til sin side, tas. Hvis hinna har løsna fra egget, angis at målene er tatt uten hinne. Gjennomsnittet av målene føres på skjema. Hvis egget er gått i stykker, måles ca. 10 fragmenter, og gjennomsnittet føres på skjema. Som ovenfor angis det om de er tatt med eller uten hinne.

Eggene oppbevares i små forede esker enkeltvis, og oppbevares i en solid kasse eller beholder.



#### 4.4 Homogenisering av egg

For eggene som skal homogeniseres gjelder følgende: Etter tømning over på prøveglass homogeniseres innholdet med en profesjonell homogenisator (slik som Pro Scientific Pro250). Stavmikser bør ikke brukes. Innholdet deles i fem like deler, som overføres til mindre, forhåndsrengjorte prøveglass. Disse merkes med samme ID-nummer og andre opplysninger som hovedprøven, med undernummer 1-5. Embryoer homogeniseres sammen med annet egginnhold, Embryoets omtrentlige lengde noteres. Større embryo tas ut separat og måles panne-stjert (mm). Noter eventuelle synlige abnormaliteter. Homogenisatoren rengjøres mellom hvert egg med rent vann og løsemidler (se punkt 4.1).

### 4. Dataregistrering, merking og innfrysing

Data fra feltskjema og prøvetakingsskjema (event. NINAs labskjema) overføres elektronisk til Miljøprøvebanken av fagansvarlig ved NINA etter kvalitetssikring. Hvert egg gis et unikt identifikasjonsnummer (Egg\_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 merkes med en etikett (frosstikker) påført prøvenummer.

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

Eggeskallene oppbevares i et eget skap ved romtemperatur.

### 5. Transport til Miljøprøvebanken

Prøveglassene med frossent egginnhold pakkes i solide kasser, gjerne av aluminium av typen Zarges. Innsiden av kassen fores først med bobleplast. En strimmel med bobleplast tapes rundt hvert glass for å unngå støtskader. Kassen fylles opp med støtabsorberende materiale. Kassene sendes som frysegods eller fraktes til MPB med egen transport etter avtale. Forut for transport skal en kontaktperson ved Miljøprøvebanken 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.

De tomme eggeskallene skal ikke til Miljøprøvebanken, men lagres/anvendes i henhold til avtale mellom utførende institusjon og Miljødirektoratet.

### 6. Referanser

Statens kartverk. 2009. Koordinatbaserte referansesystemer. versjon 2.1 - Desember 2009. 48 s. URL: [http://www.statkart.no/filestore/Standardisering/docs/koo\\_referansesyst.pdf](http://www.statkart.no/filestore/Standardisering/docs/koo_referansesyst.pdf). (04.01.2013)

Bowerman, W. W., Giesy, J., Sikarskie, J. G. & Best, D. A. 1992. Protocol for handling and processing eggs for contaminant analyses. Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA. s 1-8.