



**NOVANA**

# Teknisk anvisning for marin overvågning

## 4.4 Miljøfarlige stoffer i muslinger

**Britta Pedersen †**  
**Martin M. Larsen**  
**Ingela Dahllöf**  
*Afdeling for Marin Økologi*

**Miljøministeriet**  
**Danmarks Miljøundersøgelser**

<b>4.4</b>	<b>Overvågning af miljøfarlige stoffer i bundfauna (muslinger)</b>	<b>3</b>
4.4.1	Formål	3
4.4.2	Princip	4
4.4.3	Prøvetagningsstrategi og kriterier for stationsplacering	5
4.4.3.1	Indledning	5
4.4.3.2	Arter, antal og størrelse	5
4.4.3.3	Område	6
4.4.3.4	Strategi for fastlæggelse af prøvetagningssted (lokalitet)	6
4.4.3.4.1	Blåmusling/sandmusling	6
4.4.3.4.2	Beskrivelse af lokalitet	8
4.4.3.5	Frekvens og prøvetagningstidspunkt	8
4.4.4	Prøvetagning og prøvehåndtering	9
4.4.4.1	Blåmusling/sandmusling	9
4.4.4.1.1	Prøvetagning og mærkning	9
4.4.4.1.2	Depurering (udsanding)	10
4.4.4.1.3	Måling af skallængden	10
4.4.4.1.4	Dissekering og vejning	10
4.4.4.1.5	Opbevaring og transport af dissekeret materiale	11
4.4.4.1.6	Homogenisering	12
4.4.5	Analysemetoder	12
4.4.5.1	Organiske miljøfarlige stoffer	12
4.4.5.1.1	Metoden	12
4.4.5.1.2	Fedt- og tørstofbestemmelse	13
4.4.5.2	Metaller	14
4.4.5.2.1	Metoden	14
4.4.5.2.2	Tørstofprocenten	14
4.4.6	Kvalitetssikring	14
4.4.6.1	Generelt	14
4.4.6.2	Kvalitetskrav, kvalitetskontrol og kvalitetssikring til/af den kemiske analyse	15
4.4.6.2.1	Kvalitetskrav	15
4.4.6.2.2	Detektionsgrænser	15
4.4.6.2.3	Præcision	15
4.4.6.2.4	Intern kvalitetskontrol	16
4.4.6.2.5	Nøjagtighed og ekstern kvalitetskontrol (præstationsprøvninger)	16
4.4.6.2.6	Kvalitetssikring	16
4.4.6.2.7	Uddannelse	16
4.4.7	Datarapportering	17
4.4.8	Referencer	18

Bilag 4.4.1 - Indholdsfortegnelse for Manual for måling af miljøfarlige organiske stoffer og metaller 4.4-19

## 4.4 Overvågning af miljøfarlige stoffer i bundfauna (muslinger)

Denne tekniske anvisning er udarbejdet for at sikre sammenlignelighed af målinger udført med det formål at undersøge forekomsten af miljøfarlige stoffer generelt i det marine miljø. Den beskriver prøvetagningsstrategi, prøveindsamling, analyse og rapportering af data vedrørende miljøfarlige stoffer i benthiske organismer (muslinger) og er udarbejdet med henblik på bestemmelse af de stoffer, der indgår i NOVANA-programmet. Der er i modsætning til NOVA-programmet nu to typer program: et basisprogram der udføres hvert år, og et supplerende program der udføres 2-3 gange i programperioden. De specifikke stoffer fremgår af programbeskrivelsen for NOVANA, men dækker for basisprogrammet stofgrupperne metaller, klorerede bifenyler (PCB'er) og enkelte andre klorerede organiske forbindelser, fx DDT, DDE, HCH, og HCB, polyaromatiske hydrokarboner (PAH'er), bromerede flammehæmmer samt organiske tinforsbindelser. Det supplerende program forventes i løbet af hele perioden at bestå af dioxiner og furaner, phthalater (blødgørere), PFOS og muskxylener. Der vil blive vekslet mellem de enkelte stoffer, og PFOS og muskxylener afventer, at screeningsundersøgelser påviser dem under danske forhold i løbet af programperioden. Hvilke stoffer, der aktuelt skal måles i de supplerende programmer, fastlægges senest året før prøverne skal udtages.

Denne tekniske anvisning består af en generel del, der er fælles for de ovennævnte stofgrupper, samt et antal tekniske appendikser, der mere detaljeret beskriver de specifikke tekniske anvisninger, der vedrører en enkelt stofgruppe. Der er p.t. udarbejdet følgende tekniske appendikser:

1. Metaller
2. Organiske klorforbindelser
3. Organotinforbindelser
4. Polyaromatiske Hydrokarboner

### 4.4.1 Formål

Formålet med en overvågning af miljøfarlige stoffer i benthiske organismer (muslinger) i det marine miljø er,

- at vurdere virkningen af de indgreb der er foretaget for at reducere tilførslen af udvalgte miljøfarlige stoffer, inklusive metaller til det marine miljø (tids trend overvågning)
- at vurdere de nuværende niveauer (og effekt) af forurening af udvalgte miljøfarlige stoffer, inklusive metaller i danske farvande, fra

åbent hav til fjord, fra Østersøen til Nordsøen (geografisk udbredelse)

- at kunne opfylde Danmarks internationale forpligtelser på området

#### *Parametervalg*

Valget af stoffer er hovedsagelig baseret på baggrund af en viden om disse stoffers forekomst og effekter i det marine miljø og de forpligtelser, der foreligger i henhold til de internationale havkonventioner og EU. Såvel hvilke parametre som udvælgelseskriterier fremgår af stoflisten i programbeskrivelsen for NOVANA.

Nye miljøfarlige stoffer tages løbende i brug i samfundet. For eksempel går udviklingen inden for brugen af pesticider i bundmaling stærkt. Det kan derfor senere i programmet blive et behov for justeringer med hensyn til stofvalg.

### **4.4.2 Princip**

Organismer kan akkumulere forskellige stoffer til koncentrationer, der er betydeligt højere end dem, der findes i de omkringliggende havområder. Denne bioakkumulation er et nettoresultat af et optag og en udskillelse. En vigtig forudsætning for kemisk biomonitoring er derfor, at det er et enkelt forhold mellem koncentrationen i organismen ( $C_i$ ) og koncentrationen i de omkringliggende farvande ( $C_e$ ). Der er i forskellige laboratorie- og feltforsøg vist, at der ofte opnås en ligevægt mellem  $C_i$  og  $C_e$ , så forholdet  $C_i / C_e$ , den såkaldte biokoncentrationsfaktor (BCF) er konstant. BCF varierer med forhold som art og stofgruppe. For at kunne sammenligne koncentrationer af et miljøskadeligt stof i biota indsamlet fra forskellige områder eller tidsperioder er det derfor væsentligt, at den samme art bliver indsamlet i hele området/tidsperioden.

Da bioakkumulationen er en forholdsvis langsom proces (uger-månedes-år afhængig af stofgruppen/organismen) repræsenterer koncentrationen i organismen ikke kun koncentrationen i omgivelserne i en kort periode lige inden indsamlingen af organismen, men en betydeligt længere periode. Organismen bliver herved en integrerende prøveopsamler.

Da  $C_i$  ofte er betydeligt større end  $C_e$ , kan det være nemmere at bestemme koncentrationen i en organisme end i en vandprøve, alt andet lige på grund af den mindre risiko for kontaminering af prøven.

Muslinger fanges/indsamles i de specielt udvalgte områder. Biologiske variabler (længde, vægt, etc.), som kan være af betydning ved en senere bedømmelse af resultatet, måles og noteres. Prøven dissekeres, det specifikke organ forbehandles og opløses, og koncentrationen af det miljøfarlige stof bestemmes (kvantificeres) som beskrevet i de enkelte forskrifter for det pågældende stof. Vedr. detaljer henvises til de enkelte tekniske appendikser.

## 4.4.3 Prøvetagningsstrategi og kriterier for stationsplacering

### 4.4.3.1 Indledning

Prøvetagningsstrategien skal sikre at man får en viden om variationen i koncentrationen af de enkelte stoffer og stofgrupper i et område samt årsagen hertil. Den skal desuden medvirke til at variationen i vores data på grund af den naturlige variation reduceres mest mulig. Dette gøres ved at minimere den biologiske co-variation i prøvematerialet, dvs. ved at udtage muslinger med en specifik størrelse, alder, etc., se *afsnit 4.4.3.2*. For bedst muligt at afspejle en nylig eksponering bør der indsamles unge dyr.

Et godt kendskab til og en minimering af variationen i de indsamlede data vil forbedre mulighederne for at fortolke data rigtigt, fx afgøre om der er en geografisk eller tidslig trend.

### 4.4.3.2 Arter, antal og størrelse

Ved valg af art skal der tages hensyn til nogle basale forudsætninger.

Den valgte art bør,

- afspejle en forandring i koncentrationen i omgivelsen, dvs. der er en sammenhæng mellem eksponering og indhold i organismen
- den enkelte art skal have den samme biokoncentrationsfaktor i hele undersøgelsesområdet
- akkumulere stoffet uden at blive alvorligt påvirket af det
- være repræsentativ for området
- forekomme hyppigt i området
- den valgte størrelse skal altid kunne indsamles i området
- være af en tilstrækkelig størrelse for at sikre en passende mængde vævs materiale til analyse
- være hårdfør og nem at håndtere, så der fx kan udføres relevante forsøg i laboratoriet, fx. studier af optagelse af stoffet

Hvilke arter, som er aktuelle i overvågningsprogrammet, fremgår af *Tabel 4.4.1*. Disse arter er valgt, så de opfylder de basale krav, der er beskrevet oven for.

For blåmusling, *Mytilus edulis*, er dette specielt veldokumenteret i en række undersøgelser, se fx *Philips & Rainbow 1994*.

**Den samme art skal derefter bruges hvert år i det samme område.**

Tabel 4.4.1 Arter og antal prøver pr. station/lokalitet i overvågningsprogrammet.

Art	Antal # (se også afsnit 4.4.3.4)	Størrelse	Køn	Vævstype
Blåmusling <i>Mytilus edulis</i>	2-3 "pools" á ca. 100 muslinger (tidstrendsstation) alternativt 1 "pool" á ca. 100 muslinger ("referencestation")	30-40 mm	-	Hele bløddyrssdelen
Sandmusling <sup>##</sup> <i>Mya arenaria</i>	3 "pools", hver pool med en samlet bløddelsvægt på min. 100 g (tidstrendsstation) alternativt 1 "pool" med en samlet bløddelsvægt på min. 100 g ("referencestation")	min. 20 mm		Hele bløddyrssdelen

# For muslinger skal der normalt være ca. 100 g efter dissektion i hver pool, kontakt laboratoriet hvis der skal analyseres andet end det årlige standardprogram. Hvis muslingerne er meget små, kan det være nødvendigt med flere muslinger pr. pool, end der er angivet her.

## I Ringkøbing Fjord og andre steder, fx i Limfjorden, hvor der ikke forefindes *Mytilus edulis*. Manglende nyrekruteret af muslinger (specielt i Ringkøbing Fjord) gør det svært at holde samme størrelse og alder.

#### 4.4.3.3 Område

Ved udvælgelse af områder, hvor de miljøfarlige stoffer skal måles, er der lagt vægt på følgende kriterier:

- områdevalg for det marine program koordineres med områdevalg for øvrige relevante programmer (kilder, vandløb)
- om der tidligere er udført undersøgelser i området
- området repræsenterer forskellige typer af påvirkning af miljøfarlige stoffer
- området repræsenterer forskellige danske kyst- og havtyper
- havstationer med lange tidsserier bevares
- området er specielt udvalgt for intensive eutrofieringsmålinger (stor viden om området vil blive etableret)

#### 4.4.3.4 Strategi for fastlæggelse af prøvetagningssted (lokalitet)

##### 4.4.3.4.1 Blåmusling/sandmusling

Den overordnede prøvetagningsstrategi for muslinger i et fjordområde er at indsamle langs en gradient fra kilden på to lokaliteter/stationer for at få en viden om variationen i koncentrationen af et stof i området. Den ene lokalitet skal være specielt udvalgt til at vurdere virkningen af de indgreb, der er foretaget for at reducere tilførslen af udvalgte miljøfarlige stoffer inklusive metaller til det marine miljø (tidstrend overvågning). Her skal der udtages tre parallelle prøver (pools). Den anden lokalitet skal give information om de nuværende niveauer af udvalgte miljøfarlige stoffer inklusive metaller i

danske farvande (referencestationen). Her skal der kun udtages en prøve (pool). Dvs. at der i hvert område skal udtages fire prøver (pools): Tre på tidstrend stationen og en på referencestationen.

Det betyder, at der muligvis ikke altid vil være et sammenfald mellem lokaliteter for samtlige stoffer, fx for antibegroningsmidler (havne og skibsfart) og PCB (spildevand, atmosfæren, m.m.), da disse stoffer har forskellige kilder og transportveje.

Den første lokalitet (tidstrend stationen) skal primært placeres tæt på kilden (ca. 500 - 1000 m), hvor man forventer den højeste koncentration, men ikke i selve nærområdet for at sikre, at den ikke kun er repræsentativ for et meget lille område. Den anden lokalitet (referencestationen) skal placeres i et område, hvor der kun forventes en diffus påvirkning fra punktkilden. I et område er der sandsynligvis flere kilder til et stof, og/eller kilden er ukendt. Det vil derfor ikke altid være muligt at finde den optimale position for samtlige stoffer, der indgår i programmet i forhold til den overordnede strategi, specielt hvis der ikke findes nogen viden i forvejen om stoffets udbredelse i området. I disse tilfælde skal lokaliteterne fastlægges, så man får den størst mulige viden om variationen i koncentrationen af et stof i hele området udenfor punktkildernes nærområder.

Andre forhold end kilden kan også have betydning for den stofkoncentration, der måles på en lokalitet. Disse er fx:

- afstand til land, som bør være > 50 m for at undgå direkte påvirkning fra land
- evt. graveaktivitet i området (området skal undgås)
- om området er berørt af skibstrafik (omrøring fra skibsskruer ved meget trafik i lavvandede områder, kilde)
- vanddybde (skal være den samme hvert år)
- strøm- og sedimentationsforhold

Derfor skal disse forhold på lokaliteten beskrives i prøvetagningsmanualen for evt. senere at kunne blive brugt i forbindelse med en vurdering af resultaterne.

Prøverne skal så vidt muligt udtages samme sted og dybde hvert år inden for lokaliteten. Såfremt prøvetagningen må flyttes (fx pga. iltsvind), skal dette bemærkes og vurderes i forbindelse med afrapporteringen. Der skal, så vidt det er muligt, indsamles bundlevende muslinger og ikke muslinger på sten, pæle og lignende. Prøvepositionen skal fastlægges med GPS (global positionerings system) eller med en teknik med tilsvarende nøjagtighed. I områder med tidevand skal prøverne indsamles så tæt på "low water spring tide" som muligt.

Det bør tilstræbes, at muslingeprøver og sedimentprøver udtages på samme lokalitet eller i nærliggende områder, hvor der kan forventes, at de samme kilder påvirker de to lokaliteter.

#### 4.4.3.4.2 Beskrivelse af lokalitet

For hvert område skal der for hver stofgruppe udarbejdes en beskrivelse af lokaliteterne.

Den skal bestå af en kort beskrivelse af:

- mulige kilder i området (hus- og industrispildevand, åer, havne, skibsruter, depoter, etc.)
- kort beskrivelse af lokaliteterne – herunder dybde, strøm og sedimentationsforhold
- information om der findes tidligere data fra området
- lokalitetens udbredelse skal defineres. Den rumlige variation af stofkoncentrationen på lokaliteten skal i princippet være kendt for at sikre, at de prøver, der udtages fra en lokalitet, er repræsentative for hele lokaliteten. Dette ville imidlertid være alt for kostbart at fastlægge ud fra strikte statistiske principper, da det ville kræve et stort antal målinger inden programmets start. Lokalitetens udbredelse må derfor defineres ud fra et skøn om, at variationen i koncentrationen i hele området sandsynligvis er lille, fx ud fra et lokalkendskab til hydrografien, afstand til forventede kilder, tidligere data, bundforhold herunder glødetabsindhold.
- beskrivelse af hvordan prøverne skal udtages (med dykker, muslingeskraber el. lign.)

Beskrivelsen skal ledsages af et kort, hvor de relevante oplysninger er angivet.

Beskrivelsen af lokaliteter skal indgå i amtets "Prøvetagningsmanual for måling af miljøfarlige organiske stoffer og metaller i biota". For yderligere information om manualen se afsnit vedr. kvalitetssikring og *Bilag 4.4.1* "Indholdsfortegnelse for Manual for måling af miljøfarlige organiske stoffer og metaller".

#### 4.4.3.5 Frekvens og prøvetagningstidspunkt

Prøver skal indsamles en gang årligt på et tidspunkt, hvor organismen (musling) befinder sig i en stabil fysiologisk tilstand.

Muslinger skal derfor hvert år indsamles i perioden oktober-november, dvs. på et tidspunkt som sandsynligvis er uden for deres gydeperiode, og hvor vægten er relativt konstant.



## 4.4.4 Prøvetagning og prøvehåndtering

### 4.4.4.1 Blåmusling/sandmusling

#### 4.4.4.1.1 Prøvetagning og mærkning

Fortrinsvis individer, der ikke er for begroede og har en pæn hel skal, skal indsamles. Sand, silt og andre partikler skal fjernes ved brug af vand fra stedet – evt. ved brug af en børste af nylon.

Generelt skal der anvendes bundlevende muslinger, og hvis der afviges fra dette princip, skal det fremgå tydeligt af prøvetagningsmanual og afrapportering.

En kommerciel "muslingeskraber" kan bruges, hvis prøven indsamles fra et skib. Sediment kan utilsigtet opsamles i skallet ved indsamling med bundskraber. Prøver, der indholder synlige mængder sediment, skal kasseres. Prøven kan også indsamles i hånden, fx af en dykker. Hvis prøven indsamles med hånden, bør der bruges en handske af hensyn til indsamleren.

Prøven skal mærkes på en unik måde, så den nemt kan identificeres senere. Pen og evt. etiketter, der bruges ved mærkning, skal kunne modstå fugt.

Der skal som minimum registreres følgende oplysninger i en logbog:

- Stationsnummer/navn
- Antal prøver/pools på station (tidstrend station alt. referencestation)
- Position\*
- Prøvenummer og type af prøve
- Prøvetagningsmetode\*
- Prøvetagningsdato
- Navn på prøvetager

\*) Hvis prøverne er taget med muslingeskraber, angives positioner, skrabetid og hastighed, så arealet af det skrabede område kendes.

Levende muslinger skal opbevares og transporteres ved 5 - 15°C, helst ved < 10°C i rene (= kontamineringsfri) beholdere som fx rilsan poser. Muslingerne kan fx holdes fugtige under transporten ved at lægge et fugtigt håndklæde over dem. Et min./maks. termometer kan bruges til at kontrollere temperaturen under længere transporter.

NB: Muslingerne må ikke fryses, før de dissekeres.

*Ved frysning, kan cellevæggen sprænges, og ved optøning af prøven kan cellevæske, der fx indholder metaller, løbe ud.*

#### 4.4.4.1.2 Depurering (udsanding)

Muslingernes tarm skal tømmes for dets indhold af sedimentpartikler, da dette kan indeholde en relativt høj koncentration af de miljøfarlige stoffer. De levende muslinger placeres i et akvarium af glas (ikke plastik, da dette kan indeholde fx organiske tinforbindelser og andre blødgørere, der kan forurene prøven). Akvariet skylles og fyldes med vand fra prøvetagningsstedet. Vandet skal renses for partikler, fx ved at filtrere det gennem et glødet GF/C-filter, eller ved at lade partiklerne sedimentere i prøvetagningsbeholderen og derefter forsigtigt dekantere vandet ned i akvariet. Muslingerne skal blive i akvariet i ca. 20 timer ved ca. samme temperatur som på prøvetagningsstedet. Iltning af vandet er sandsynligvis ikke nødvendigt og bør også undgås for at undgå en risiko for kontaminering. Hvis det er nødvendigt, skal luften være filtreret for partikler. En temperaturindikator, som kan fås specielt til akvarier, kan sættes på ydersiden af glasset til overvågning af temperaturen. Herved undgås en evt. kontaminering fra termometeret.

#### 4.4.4.1.3 Måling af skallængden

Inden dissekering skal samtlige muslingers længde måles med en skydelære til den nærmeste mm. Længden noteres i en logbog. Skallerne gemmes (se nedenfor).

#### 4.4.4.1.4 Dissekering og vejning

Der skal normalt anvendes ca. 100 g til at gennemføre alle de ønskede analyser ved det årlige program. Kontakt evt. laboratoriet inden prøvetagning for at sikre, at der er nok materiale til alle analyser. Dette er specielt vigtigt ved de tilfælde, hvor ikke kun de årligt tilbagevendende parametre skal måles.

Prøvehåndteringen og dissekeringen skal gøres under så rene forhold som muligt for at undgå en kontaminering af prøven, helst i en såkaldt ren bæk (laminar flow bæk) hvor luften filtreres for partikler gennem et filter. Arbejdet bør derfor udføres i det laboratorium, der skal udføre analysen.

Muslinger skal åbnes levende med så lidt skade som muligt på bløddelene. Dette gøres ved at løsgøre adduktormusklen fra indersiden. Ved overskæringen af adduktormuskel og den efterfølgende dissekering skal man være opmærksom på ikke at skrabe noget af perlemorslaget af, da dette kan kontaminere prøven. Havvand, der er samlet mellem skallen og bløddelen fjernes ved at den stilles på højkant og drænes på et rent sugende underlag i ca. 5 minutter.

Muslingen dissekeres derefter så hurtigt som muligt. Muslinger fra den samme "pool" af prøver samles i en beholder (se tidligere afsnit) og vægten af den enkelte musling registreres ved at veje beholderen løbende med mindst 0,01 grams nøjagtighed. Vægten noteres i en logbog.

Skallerne tørres, hvorefter de vejes, og vægten noteres i en logbog.

Ved dissekering af prøver til organiske analyser skal der bruges en ren rustfri stål skalpel og en pincet af rustfrit stål. Hænderne skal være omhyggeligt vasket, skyllet og tørret i et rent håndklæde. Håndlotion må ikke anvendes, da det kan indeholde stoffer, der kan kontaminere prøven. Hvis man vil bruge handsker, fx på grund af sår på hænderne, skal de være pulverfri nitril handsker fx fra Ansell Edmont.

Ved dissekering af prøver til metalanalyser skal der bruges en ren rustfri stål skalpel og farveløse pincetter af polyætylen eller teflon. Skalpellen skal være forsynet med en kniv af titanium eller et keramisk materiale, hvis man vil undgå en kontaminering fra Cr og Ni. Alternativt kan en skalpel af rustfrit stål testes for en evt. afsmitning af relevante metaller. Talkumfri handsker skal bæres, da talkum kan indeholde metaller – brug fx. nitril handsker fra Ansell Edmont.

Skalpellen/pincetten skal skylles mellem hver prøve. Følgende procedure anbefales:

- vask i acetone eller alkohol og demineraliseret vand (Milli-Q vand eller af tilsvarende kvalitet)

Nye instrumenter af rustfrit stål kan være overtrukket med et limlag. For at fjerne dette skal de derfor behandles enten i en varmeovn ved 460°C nogle timer eller ved 250°C i 24 timer. Hvis dette ikke er muligt, rengøres instrumentet omhyggeligt med opvaskemiddel, hvorefter det skylles i rigeligt demineraliseret vand (Milli-Q vand eller af tilsvarende kvalitet). Det anbefales at anvende skalpeller pakket enkeltvis uden lim.

#### **4.4.4.1.5 Opbevaring og transport af dissekeret materiale**

De dissekerede prøver skal opbevares dybfrosne (-20°C) eller frysetørrede i hertil velegnede beholdere, se *Tabel 4.4.2*. Prøver til metal, PCB, dioxin og organotinanalyser kan opbevares dybfrosne i op til et år.

Prøver til PAH og bromerede flammehæmmer skal analyseres så hurtigt som muligt og senest inden 4 måneder.

Tomme prøvebeholdere skal kontrolleres med relevante blankprøver for evt. kontamineringsproblem.

Prøverne skal transporteres dybfrosne eller frysetørrede. Som ved transport af levende muslinger kan et enkelt min./maks. termometer – eller bedre en temperaturlogger – bruges til at kontrollere temperaturen under længere transporter.

Tabel 4.4.2 Oversigt over egnede prøvebeholdere til lagring af vævsprøver.

Parameter/stofgrupper	Beholder og låg	Rensningsprocedure
Organiske stoffer  (PCB, PAH, bromerede flamme-hæmmer, dioxiner og organotin)	Glas/aluminium	Beholderen skal vaskes med en detergent, skylles, opvarmes og straks inden brug skylles med et organisk opløsningsmiddel (fx hexan/acetone). For yderligere detaljer se bilag i teknisk appendiks 2 for organiske klorforbindelser.
	Teflon	
Metaller	Glas/polyethylen	Beholderen skal vaskes i 10 % v/v HNO <sub>3</sub> og derefter skylles tre gange med demineraliseret vand.
	Teflon	

#### 4.4.4.1.6 Homogenisering

Inden delprøver kan udtages til de enkelte analyser, skal prøven homogeniseres. Homogenisering af prøven udføres som beskrevet i de respektive tekniske appendikser.

### 4.4.5 Analysemetoder

Forskellige analysemetoder kan bruges til at bestemme koncentrationen af miljøfarlige stoffer og metaller i biologisk materiale. Hvilken metode, det enkelte laboratorium vælger, kan være afhængig af det udstyr, man har adgang til. Fx kan både atomabsorptionsspektrofotometri (AAS) og induktiv koblet plasma massespektrometri ICP-MS med fordel bruges til den kvantitative bestemmelse af metaller i biota. Induktiv koblet plasma atomemission (ICP-AES) har normalt ikke nok følsomhed for bly og nikkel til at kunne anvendes.

Disse tekniske retningslinier er der derfor kun vejledende for, hvordan den enkelte analyse skal udføres. Kun i de tilfælde hvor erfaring har vist, at metodikken kan have en afgørende betydning for analyseresultatet, vil det være beskrevet som et absolut krav, at analysen skal udføres med en bestemt metodik. Detaljer vedr. de forskellige analysemetoder er beskrevet i de tekniske appendikser 1-3.

*Det er imidlertid vigtigt at bemærke, at for samtlige analysemetoder gælder det, at det til enhver tid skal kunne opfylde de kvalitetskrav, der er beskrevet i afsnit vedr. kvalitetssikring.*

#### 4.4.5.1 Organiske miljøfarlige stoffer

##### 4.4.5.1.1 Metoden

En bestemmelse af koncentrationen af de organiske miljøfarlige stoffer i biota omfatter generelt følgende punkter:

- homogenisering

- tørring
- ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel
- oprensning/fjernelse eller destruktion af fedtstoffer
- fraktionering og separering med gas- eller væskkromatografi
- detektion, hvor detektortypen vil være afhængig af den stofgruppe, man ønsker at analysere for. Afhængig af om detektoren er specifik eller ej, bruges en kolonne eller to kolonner med forskellig polaritet. Fx bestemmes PCB og andre klorerede forbindelser enten på en kolonne med en massespektrometer som detektor eller på to kolonner med electron capture detektor (ECD).

#### 4.4.5.1.2 Fedt- og tørstofbestemmelse

Organiske miljøfarlige stoffer opkoncentreres i fedtvæv. Oplysning om vævets fedtindhold er derfor af afgørende betydning ved bedømmelsen af resultatet og skal derfor bestemmes og rapporteres sammen med analyseresultatet. Forskellige metoder til fedtbestemmelse bestemmer forskellige fedtfraktioner. Det er derfor væsentligt, at alle bruger den samme metode.

Såvel den totale som den ekstraherbare fedtkoncentrationen skal bestemmes. Den ekstraherbare mængde fedt kan bestemmes ud fra ekstrakten til selve stofbestemmelsen. Den totale fedtbestemmelse skal udføres i henhold til *Bligh & Dyer (1959)* eller *Smedes (1999)*. Tørstofprocenten skal være kendt ved fedtbestemmelser og skal derfor også bestemmes og rapporteres.

Tørstofprocenten bestemmes enten:

- som vægttab efter tørring til konstant vægt ved 105°C af en delprøve af homogenatet, der skal analyseres

eller

- som vægttab ved frysetørring til konstant vægt af en delprøve af homogenatet, der skal analyseres

Tørstofindholdet angives i %.

For flere detaljer vedrørende analysen, herunder fedtbestemmelse, henvises til følgende tekniske appendikser:

- Organiske klorforbindelser
- Organotinforbindelser
- Polyaromatiske hydrokarboner

#### 4.4.5.2 Metaller

##### 4.4.5.2.1 Metoden

En bestemmelse af koncentrationen af metaller i biota omfatter generelt følgende punkter:

- homogenisering
- tørring
- oplukning
- fortynding
- (evt. en matrix separation)
- detektion med en elementspecifik detektor (fx AAS, ICP-MS, ICP-AES, NAA)

##### 4.4.5.2.2 Tørstofprocenten

Tørstofprocenten i prøven (homogenatet) skal bestemmes og rapporteres sammen med indholdet af metaller. Metallerne analyseres ofte i en tørret prøve, dog skal man være opmærksom på, at især kviksølv er flygtigt, således at tørreproceduren skal kontrolleres for tab af kviksølv.

Tørstofprocenten bestemmes og rapporteres som beskrevet for organiske analyser.

For flere detaljer vedrørende analysen henvises til teknisk appendiks nr. 1: Metaller.

#### 4.4.6 Kvalitetssikring

##### 4.4.6.1 Generelt

En kvalitetssikring af en måling af miljøfarlige stoffer og metaller i biota skal sikre, at de indsamlede data opfylder de kvalitetskrav, der er opstillet til målingen.

Den omfatter derfor ikke kun den analytisk kemiske del af målingen, dvs. det der i hovedsagen foregår i laboratoriet, men samtlige processer der indgår i målingen, dvs.:

- planlægning
- prøvetagning
- prøvehåndtering
- transport og opbevaring

- prøveforberedelse og analysen
- datahåndtering
- rapportering

Hver delproces skal derfor kvalitetssikres. Dette *skal* foregå ved, at

- de kritiske processer identificeres og beskrives i en manual for målinger af miljøfarlige stoffer og metaller i biota. Denne manual vil udgøre en del af det enkelte amts kvalitetsstyringssystem

(Vedr. en mere detaljeret beskrivelse af indholdet i en sådan manual henvises til *Bilag 4.4.1.*)

- der udarbejdes en kontrolprocedure for de kritiske processer, der beskrives
- der udpeges en ansvarlig for hver kontrolprocedure
- kontrollen, der er udført, dokumenteres, fx ved at udfylde et skema (på papir eller som en logfil)

Til at identificere og beskrive de kritiske delprocesser kan et flowdiagram bruges, i hvilket der markeres, hvor der skal udføres en kontrolprocedure.

Manualen for målinger af miljøfarlige stoffer skal indsendes til Det Marine Fagdatacenter til arkivering sammen med de indsendte data.

#### 4.4.6.2 Kvalitetskrav, kvalitetskontrol og kvalitetssikring til/af den kemiske analyse

##### 4.4.6.2.1 Kvalitetskrav

##### 4.4.6.2.2 Detektionsgrænser

Krav til detektionsgrænser for de forskellige stoffer, der indgår i overvågningsprogrammet opdelt pr matrice (sediment, vand, biota) fremgår af [www.dmu.dk/Overvågning/NOVANA/Programbeskrivelse del 2/Hav og fjord, bilag 9.1 og 9.2](http://www.dmu.dk/Overvågning/NOVANA/Programbeskrivelse%20del%202/Hav%20og%20fjord). Detektionsgrænsen er her defineret som 3x standardafvigelsen (inden for dagen) af en naturlig prøve med et lavt indhold af det pågældende stof (analyten) eller af en blankprøve, der i begge tilfælde har gennemgået hele analyseproceduren. For organiske stoffer **skal** blankprøven være tilsat analyten, "spiket", i et niveau på op til 5 gange detektionsgrænsen.

##### 4.4.6.2.3 Præcision

Præcisionen på metoden skal være af en sådan kvalitet, at de stillede krav til detektionsgrænser og ekstern kvalitetskontrol (præstationsprøvninger) kan opfyldes.

#### 4.4.6.2.4 Intern kvalitetskontrol

Analyserne skal udføres i serier på maks. 20 prøver.

Laboratoriet skal i samme analyseserie som prøven analysere følgende kontrolprøver:

- blankprøver
- et relevant internt kontrolmateriale (LRM) eller certificeret reference materiale (CRM)
- et passende antal dobbeltbestemmelser af naturlige prøver, der dækker koncentrationsintervallet. Minimum en dobbeltbestemmelse pr. analyseserie.

Hvis laboratoriet anvender LRM, skal der desuden regelmæssigt analyseres et certificeret referencemateriale (CRM), og dette skal altid analyseres når fx der fremstilles en ny stamopløsning til kalibrering, når et internt kontrolmateriale erstattes af et nyt, eller når der er problemer med metoden. For yderligere information om relevante CRM henvises til de respektive tekniske appendikser.

Laboratoriet skal føre kontrolkort over kontrolanalyserne og have defineret grænser, inden for hvilke kontrolprøvens resultater skal ligge, for at analyseserien kan godkendes.

#### 4.4.6.2.5 Nøjagtighed og ekstern kvalitetskontrol (præstationsprøvninger)

De deltagende laboratorier skal 1-2 gange pr. år deltage i en relevant præstationsprøvning, dvs. en præstationsprøvning hvor prøverne består af marine prøver med et koncentrationsniveau, der svarer til dem, der forekommer i naturlige prøver. Se også de tekniske appendikser. Det Marine Fagdatacenter kan også give yderligere oplysninger om eksisterende relevante præstationsprøvninger. Laboratoriets resultater skal i princippet ligge inden for de acceptable grænser, der er sat af udbyderen af præstationsprøvningen.

#### 4.4.6.2.6 Kvalitetssikring

Resultatet af:

- præstationsprøvninger
- det interne og certificerede kontrolmateriale
- dobbeltbestemmelser

skal løbende rapporteres sammen med analyseresultatet.

#### 4.4.6.2.7 Uddannelse

Der vil ca. en gang årligt blive arrangeret temadage af Det Marine Fagdatacenter, hvor specifikke problemer i relation til prøvetagningsmåling af miljøfarlige stoffer inklusive metaller, vurdering af resultat og andre relevante emner vil blive diskuteret.



## 4.4.7 Datarapportering

Følgende data skal noteres og rapporteres sammen med analyse-resultatet:

### *Prøvetagning*

- stationsnavn
- position (er)
- dato og tid (UTC) for prøvetagning
- prøvetagningsdybde
- prøvetagningsudstyr
- navn på institut/laboratorium, der har udtaget prøven
- evt. bemærkninger, fx om der har været nogle afvigelser i forhold til manualen

### *Biologiske parametre*

#### Muslinger

- antal af individer i den "poolede" prøve
- antal af "poolede" prøver på stationen/lokaliteten
- middel-minimum-maksimum samt standardafvigelsen af skal-længden
- middel-minimum-maksimum samt standardafvigelsen af bløddelsvægten
- middel-minimum-maksimum samt standardafvigelsen af vægten af de tørrede skaller

### *Analyse-og kvalitetskontrolparametre*

- LRM (type, referenceværdi, resultat)
- CRM (navn, certificeret værdi, resultat)
- præcisionen på metoden beregnet fra dobbeltbestemmelser af naturlige prøver
- detektionsgrænser for hver variabel
- metode (beskrivelse af ekstraktions-oprensning/opluknings- og instrumentel metode med kodesystem)
- deltagelse i præstationsprøvning (resultat samt hvilken prøvning)

- total fedtprocent og metodeangivelse
- tørvægtsprocent

#### 4.4.8 Referencer

Oslo and Paris Commission 1996: Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota.

HELCOM 1997: Draft Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM, Part D. Programme for Monitoring of Contaminants and the Effects of Monitoring.

Quevauviller, Ph. (Ed.): Quality assurance in environmental monitoring. Sampling and sample pretreatment. VCH Publishers, INC., Weinham and New York, 306 pp.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. – Can. J. Bioche. Physiol. 37, 911-917.

Phillips, J.H.D. & Rainbow, S.P. 1994: Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Chapman and Hall, Alden Press Ltd, Oxford.

Smedes F. 1999: Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. – The Analyst 124 (11): 1711-1718.

## **Bilag 4.4.1 - Indholdsfortegnelse for Manual for måling af miljøfarlige organiske stoffer og metaller**

### **Prøvetagning og analyser**

#### **Amt**

#### **Formål med prøvetagning**

#### **Undersøgelingsprogram**

- Stationer med stationsbeskrivelse (lokalitetsbeskrivelse, som tidligere beskrevet i afsnit 4.4.3.4.3, skal indgå her)
- Parameter og matrice

#### **Tidsplan**

- Plan over hvornår der er togt/prøvetagning
- Bemanding inkl. ansvarlig for prøvetagning

#### **Ansvarsfordeling**

- I princip en liste, der løbende justeres, over hvem der gør hvad hvornår

#### **Checkliste for prøvetagningsudstyr**

- Udstyr der skal bruges, som står på skib
- Prøveflasker, prøvebeholder, etiketter, pen (blyant), evt. akvarier mv., der skal medbringes, herunder vask og klargøring af disse
- Beskrivelse af hvordan man dokumenterer, at procedurer for "checklisten" er fulgt, fx ved at den ansvarlige noterer det i et skema

#### **Prøvetagnings fremgangsmåde**

- Evt. stationsparametre der skal noteres på prøvetagningstidspunktet i en logfil/skema (vind, vejrforhold etc.)
- Detaljeret beskrivelse over hvordan muslingerne/fisken fanges, herunder en beskrivelse af evt. udstyr, der er brugt
- Beskrivelse af evt. aftaler med 3. person for udtagelse af prøver

- Beskrivelse af hvordan man sikrer/dokumenterer, at procedurer for prøvetagning er fulgt

### Håndtering af prøver på skib/ved prøvetagning

- Mærkning
- Opbevaring
- Evt. anden behandling af prøver
- Beskrivelse af hvordan man sikrer/dokumenterer, at procedurer for "håndtering af prøver på skibet" er fulgt

### Håndtering af prøver efter hjemkomst

- Hvem gør hvad, og hvor skal prøverne hen
- Beskrivelse af hvordan man sikrer/dokumenterer, at procedurer for håndtering af prøver efter hjemkomst er fulgt

### Kvalitetssikring og analysemetoder

Kort beskrivelse over amtets inkl. laboratoriets kvalitetssikring og analysemetoder for de målte parametre, herunder:

- Diagram/tabel over hvem, der analyserer for hvad, inkl. laboratoriets navn
- Beskrivelse af analysemetoder, fx beskrevet med et skema over brugte metoder og litteraturhenvielse.

Analyse variabel	Analysemetode	
	Ekstraktion/ oplukning	Separation (kolonnetype) Detektions- grænse
Metaller		
PAH		
Organotin		
PCB		

- Kvalitetskontrolprøver:  
Beskrivelse af den interne kvalitetskontrol udført på laboratoriet herunder blankprøver, type kontrolprøver til den interne kvalitetskontrol, deltagelse i præstationsprøvninger.
- Beskrivelse af hvordan man sikrer, at procedurer for kvalitetssikring er fulgt på laboratoriet.

### **Databehandling og rapportering**

De målte data vil sandsynligvis indgå i forskellige typer af rapporter. I alle tilfælde er det nødvendigt, at man har beskrevet en procedure for hvordan, man kontrollerer og dokumenterer, at data er korrekt beregnet, overført og behandlet. Det gælder alle registrerede data som fx. dato, tid og vanddybder og ikke kun analyseresultat.