

Programområde: **Kust och hav
Sötvatten**

Undersökningstyp: **Bakteriell
syrekonsumtion**

Mål och syfte med undersökningstypen

Syftet med att mäta bakteriell syrekonsumtion i havsvatten är främst att upptäcka gödning av vattenmiljön (metoden fungerar även i sötvatten). Metoden ger indirekt ett mått på den biokemiska syrekonsumtionen (BOD₇) *in situ*, vilken är kopplad till tillförseln av näring till en recipient (1). En mätning av syreförbrukningen ger möjlighet att upptäcka förekomst av ökande biokemisk syrekonsumtion, som kan leda till syrebrist. Undersökningstypen kan användas både lokalt i recipienter och i stor skala (Östersjöns delbassänger).

Målet är att med hjälp av mätningar av ökad bakteriell syrekonsumtion upptäcka att tillförseln av näring till området ökar. Dessutom är ambitionen att skilja klimatberoende eller andra naturligt betingade variationer i syrekonsumtionen från effekter som förorsakas av mänsklig (antropogen) verksamhet.

Undersökningstypen är användbar för att bedöma ett vattenområdes status i förhållande till miljömålet *Ingen eutrofiering*.

Undersökningstypen skall främst användas när det gäller hotbilden av övergödning i såväl kustvatten som utsjöområden.

Samordning

Undersökningstypen om bakteriell syrekonsumtion samordnas lämpligen med andra undersökningar i den fria vattenmassan (pelagialen) som omfattar hydrografi, biologi och kemi. Främst rekommenderas att mätningar av temperatur, syrehalt, totalfosfor och totalkväve görs i anslutning till undersökningstypen. Syrekonsumtion är också en värdefull förklaringsvariabel till program inriktade på undersökningar av bottenlevande djur respektive bottenvegetation.

Strategi

Bakteriell syrekonsumtion kan mätas i både sötvatten och i vatten med oceanisk salthalt (över 30 PSU (Practical salinity unit)). Det går att använda de omvandlingsfaktorer som nämns i litteraturen för den typ av miljö som man tänker mäta i. För att säkra högsta möjliga riktighet i mätningarna rekommenderas dock sådana faktorer som bestäms av de faktiska förhållandena i den aktuella miljön. Arbete pågår för att öka tillförlitligheten ytterligare genom en mer direkt omvandling till syreenheter.

Med metoden mäter man, förutom mängden syre som går åt för att bryta ned dött växtplanktonmaterial, också hur mycket syre som går åt för att bryta ner löst organiskt material som tillförts från land (åar, älvar, avlopp m.m.). I kustområden och sjöar kan bidraget av organiskt material från land vara större än den mängd organiskt material som har växtplankton som ursprung. Den bakteriella syrekonsumtionen ger där ett viktigt samlat mått på den totala näringstillförseln till ekosystemet.

Produktionen av bakteriell biomassa har lanserats som en indikator på flödet av lösta organiska föreningar i ett ekosystem (2). Produktionen av bakterieplankton påverkas direkt av halten och sammansättningen av organiskt material och närsalter i vattenpelaren vid temperaturer över c:a 5 °C (3, 4, 5). Ett positivt samband mellan näringsstatus och båda bakterievariablerna (bakteriebiomassa och produktion av bakterier) har generellt kunnat påvisas i akvatiska ekosystem (3). Man kan därför vänta sig att ökad produktion av organiskt material genom ökad produktion av växtplankton och/eller tillförsel utifrån av löst organiskt material (via t.ex. vattendrag eller avlopp) leder till en högre produktion och följaktligen en högre biomassa av bakterier. Likaså kan man räkna med en direkt gödning av bakteriesamhället via tillväxtbegränsande näringsämnen, främst kväve eller fosfor, i miljöer där kol och energi finns i överskott.

Den syrekonsumtion som bakterieplankton står för utgör en stor del av den biokemiska syreförbrukningen i akvatiska miljöer. Över 80 procent av sekundärproduktionen i havet (konsumtionen av organiskt kol) sker i den fria vattenmassan och bakterieplankton står för en betydande del av denna. Den faktiska andelen av bakteriell syrekonsumtion (20–50 procent), se även fig. 1, varierar globalt sett mellan olika akvatiska miljöer beroende på ekosystemets struktur (ex. säsongsvariation). I en näringsgradient i norra Sverige i augusti utgjorde bakteriell syrekonsumtion 28 % av den totala (Fig. 1). Kolkonsumtion och respiration är tätt kopplade i syrekrävande (aeroba) organismer och respirationskvoten (RQ) är följaktligen nära 1. Därmed innebär en hög konsumtion av kolföreningar också en hög syrekonsumtion.

Hur mycket syre som bakterieplankton konsumerar verkar vara proportionellt till den totala respirationen (t.ex. den biokemiska syreförbrukningen), och därmed till produktionen av organiskt material, i systemet (6 och Fig. 1). Bakteriell syrekonsumtion ger därmed ett indirekt mått på sekundärproduktionen (den totala respirationen av organiskt material) i en given miljö. Detta kan liknas vid en bestämning *in situ* av biokemiskt syrekrav. Vid beräkningen av biokemisk syrekonsumtion i form av bakteriell syrekonsumtion utgår man från att det är en försumbar mellanårsvariation i andelen bakteriell respiration av den totala respirationen. Detsamma antas för den genomsnittliga tillväxteffektivitet hos bakteriesamhället (alltså hur stor andel av tillgänglig näring som resulterar i faktisk tillväxt) och RQ-kvoten. Tillgängliga studier tyder på att dessa antaganden är rimliga (Fig. 1).

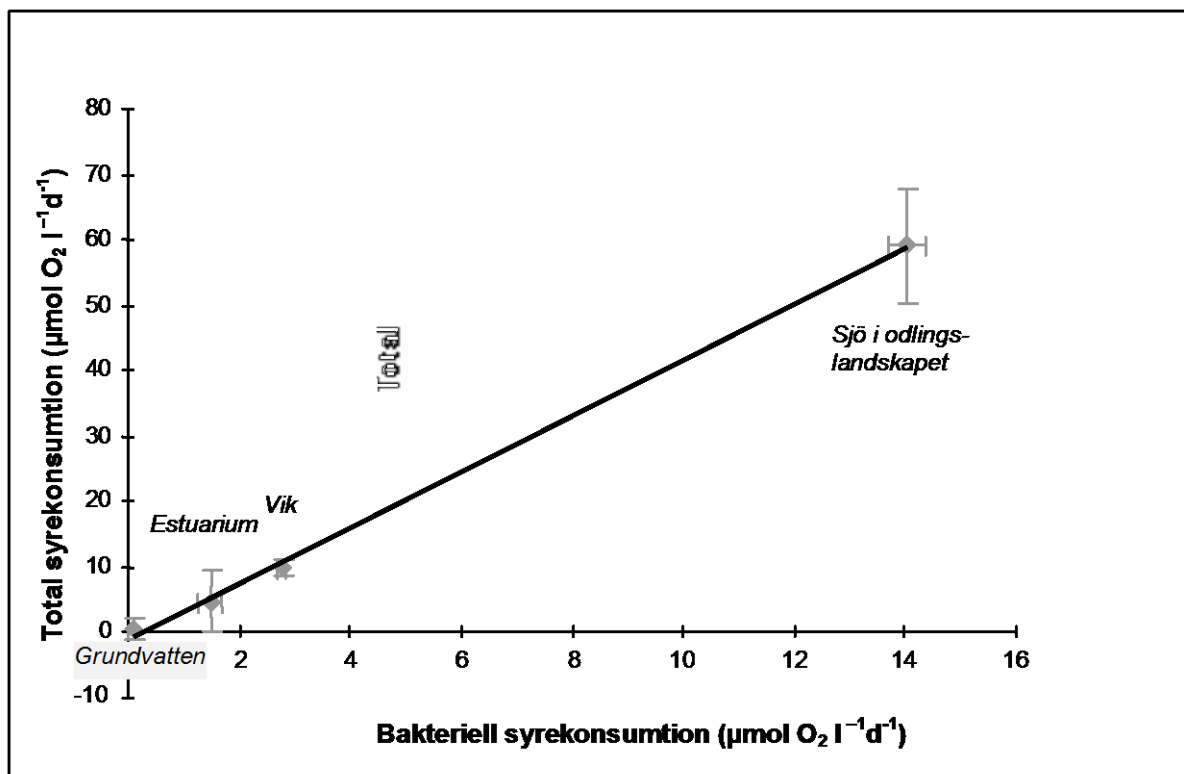


Fig. 1. Samband mellan total syrekonsumtion (Winkler-metoden) och bakteriell syrekonsumtion i fyra akvatiska miljöer med olika näringsstatus. Förklaringsgraden för sambandet är 0.999. Data (opublicerade, Wikner) är från en samtidig provtagning (inom 3 timmar) med tre verkliga provpunkter per miljö i slutet av augusti, Öreälvens avrinningsområde.

Storleken på den bakteriella syrekonsumtionen spänner globalt sett över fem tiopotenser (2, 3) från näringsfattigt grundvatten, via kustbassänger till övergödda sjöar. Den statistiska styrkan hos bakteriell syrekonsumtion möjliggör att vattenbassänger som skiljer sig åt mer än 30 procent kan särskiljas från varandra. I tioåriga tidsserier kan man med 80 procent sannolikhet upptäcka sjuprocentiga förändringar. Sannolikheten att upptäcka också relativt små förändringar i näringsstatus är därmed goda.

Som nämnts skall undersökningstypen främst användas när det gäller hotbilden övergödning i kustvatten och utsjöområden. Dock kan även vissa metaller – främst kvicksilver, kadmium, koppar, nickel och zink – med verkan på fundamentala cellprocesser inledningsvis tänkas påverka bakterierna (7). Den genetiska anpassningen hos bakteriesamhället går emellertid snabbt och redan inom några bakteriegenerationer (veckor) kan belastning av metaller vara omöjligt att upptäcka. Förändrad UV-instrålning och förändrat klimat (främst temperaturhöjningar) kan också orsaka förändringar hos bakterierna (8). Näringstillgången är dock den faktor som huvudsakligen påverkar den bakteriella syrekonsumtionen, enligt sammanställningar av fältdata (3).

Statistiska aspekter

Storleken på bakteriernas upptag av nukleinsyrakomponenten tymidin är grunden för beräkningarna av bakteriell syrekonsumtion. Mätning av tymidinupptag visar en god precision i förhållande till förväntade naturliga variationer. Värden på mätningar av tymidinupptag finns publicerade för de flesta akvatiska miljöer. Detta ger en god möjlighet till jämförelser med

värden från flera olika vattenmiljöer. Osäkerhet i skattningen av syrekonsumtionen kommer främst från osäkerheter vid omvandlingen från tymidinupptag till syreupptag.

Den rumsliga (horisontella) variationen hos bakterievariablerna är mindre än variationen i tid sett på årsbasis (9). I områden grundare än 25 meter är även den vertikala variationen relativt liten. Man anser idag att man får den bästa skattningen av årsmedelvärden för ett område genom att använda få stationer med hög tidsupplösning. För att bedöma påverkansområden i recipienter kan det dock vara bättre med en annan typ av uppläggning, med större rumslig spridning av provtagningspunkter och enstaka djup. Hur många provtagningspunkter man väljer att ha beror generellt sett på vilken storlek av förändring man vill kunna upptäcka.

Baserat på hög provtagningsfrekvens (18 gånger per år) har den statistiska styrkan hos bakterievariablerna – t.ex. sannolikheten att upptäcka en trend, $1-\beta$ – för bakteriebiomassa beräknats till 4,6 procent per år med 80 procents sannolikhet vid en tioårig mätserie (10). Motsvarande statistiska styrka för bakterieproduktionen är 6,6 procent per år ($1-\beta=0,80$). Styrkan hos bakterievariablerna är därmed jämförbar med den för oorganiska närsalter. De bästa skattningarna för ett område får man genom att göra minst tio provtagningar per år på minst två stationer. Vi har dock visat att det är möjligt att ranka akvatiska miljöer med tydligt olika näringsnivå också med månadsvärden (*Fig. 1; reproducerbara resultat*). För mätserier med månadsvärden bör man, enligt rekommendation av Helsingforskommissionen, använda en ”icke-parametriskt”, säsongsbaserad trendanalys av typen Mann-Kendall (11, 12). På serier där man vill beräkna årsproduktionen går det bra att använda parametrisk linjär regression enligt Modell I (standardtypen i linjär regression i vanliga datormjukvaror, jmf. Grundläggande statistisk litteratur).

Årsvärden för de flesta variabler är typiskt normalfördelade. Månadsvärden för bakterieproduktion kan vanligen logaritmttransformeras (\ln) till en approximativ normalfördelning. Mätvärden för bakteriebiomassa är oftast normalfördelade. Därmed kan parametriska variansanalyser (ANOVA) med efterföljande *post-hoc*-tester användas för att visa skillnader mellan lokaler och tidsperioder, under förutsättning att man har minst två provtagningspunkter i varje område och för varje tidsperiod. I de fall där det inte går att uppnå en normalfördelning rekommenderas att man använder icke-parametriska test av typen Mann-Whitney U-test eller Wilcoxon signed rank-test (13). Minst tre års mätningar (för en given månad eller ett helt år) behövs för att kunna ta hänsyn till naturliga variationer vid test av eventuell skillnad i förhållande till ett referensområde.

För att kunna bedöma huruvida en påvisad skillnad beror på påverkan av mänsklig verksamhet bör man bl.a. göra jämförelser med andra undersökningstyper, klimatbetingade förändringar och förekomst av industriell eller kommunal verksamhet i området. Generellt gäller detta företeelser som kan orsaka förändringar i vattentemperatur, halt av totalfosfor och kväve, syrehalt samt tillförsel av näringsämnen. Genom styrkan i undersökningstypen bakteriell syrekonsumtion upptäcks även naturliga skillnader inom typområden (*se Fig. 1 och områdena Estuarium och Vik*).

Plats-/stationsval

Det har visat sig att variationen mellan stationer, även i estuarier med älvutflöde, är liten i förhållande till säsongsvariationen (Wikner, opublicerade studier). Resurserna bör därför prioriteras på flera provtagningar i tiden på bekostnad av antal stationer. Vid val av mätstation är det bra att ha kännedom om lokala strömförhållanden för att undvika områden som påverkas av sötvattenplymer eller uppvällning av djupvatten (temporära eller stabila). Sötvattenplymer och speciellt turbulenta vattenområden (t.ex. på grund av deras strömmar och bottenpografi) bör undvikas om inte syftet är att mäta just dessa. Kustens påverkan på

näringsförhållandena kan variera mellan 0 och tiotals kilometer beroende på om det är öppen kust eller skärgårdsområde (20). En lägre salthalt p.g.a. sötvattentillförsel bedöms förekomma 30–40 km utanför kusten (29). Definitionen av typområden enligt Naturvårdsverkets *Bedömningsgrunder för miljö kvalitet: Kust och hav* bör beaktas vid placeringen av stationerna (28).

Mätprogram

Variabler

Huvudvariablerna ger i sig själva entydig information om näringstillståndet. Kringvariablerna ökar dock möjligheterna att förklara orsakerna till förändringar i huvudvariablerna. Kompletterande mätning av syrehalt medger en grov skattning av syretillförseln till recipienten när årsmedelvärden beräknas.

Produktionen av bakterieceller skattas, som nämnts, genom bakteriernas upptag av nukleinsyrakomponenten tymidin. Cellproduktionen omräknas till syrekonsumtion via kolbiomassa per cell, tillväxteffektivitet och respirationskvoten (se "Statistiska aspekter"). Bakteriell kolbiomassa beräknas genom volymbestämmning med hjälp av bildanalys och en volymberoende funktion för kolinnehåll. Kommentarer till använda omvandlingsfaktorer finns under "Strategi".

Vattentemperatur är en viktig förklaringsvariabel, eftersom temperaturen kan påverka ämnesomsättningen i cellerna. Halterna av totalfosfor och totalkväve är kopplade till bakteriernas tillgång till substrat. Syrehalten är ytterligare en viktig mätvariabel för att följa syresituationen i undersökningsområdet. Tillsammans med kunskap om syrekonsumtionen och hydrografisk kunskap gör också information om syrehalten det möjligt att göra en grov beräkning av syretillförseln till recipienten.

Tabell 1. Översiktstabell för variabler och tidsperioder, m.m.

Företeelse	Determinand	Metodmoment	Enhet	Prioritet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- och analysmetodik
Prov	Provtagningsdjup från ytan		m	1	10 ggr per år (alternativt i augusti)	
	DPM (Söderfall per minut), (även för standard och kontroll)					Bilaga 1
	Tymidinupptag ¹		mol/(ml.h)			Bilaga 1
	O ₂ - konsumtion	Beräknat värde	µmol/(l.d)			Bilaga 1
Bakterier	Bakterier, halt (d.v.s. antal per l)		/l	1	6 ggr per år (alternativt i augusti)	Bilaga 2
	Bakterievolum		µm ³ /cell			Bilaga 2
	Antal celler per mol tymidin ¹ (Omvandlingsfaktor)		/mol	2	1 gång per år (alternativt används litteraturvärden)	(24)
	Tillväxteffektivitet (biomassa-kol/assimilerat kol)		%			(5)

Företeelse	Determinand	Metodmoment	Enhet	Prioritet	Frekvens och tidpunkter	Referens till provtagnings- och analysmetodik
Vatten	Provtagningsdjup från ytan		m	3	10 ggr per år (alternativt i augusti)	
	Temperatur		Cel	3		(19) alt. (27)
	O2-halt		ml/l	3		(19) alt. (27)
	Ptot-halt		µmol/l	3		(19) alt. (27)
	Ntot-halt		µmo/l	4		(19) alt. (27)

¹ Utförs undersökningen istället med tritiummärkt leucin anges motsvarande för detta ämne.

Tidsperioder

Den säkraste skattningen av bakteriell syrekonsumtion får man om det bakteriella upptaget av tymidin mäts minst tio gånger per år. Två provtagningar bör göras före produktionssäsongens början och ett prov bör tas efter produktionssäsongens slut, medan övriga prov bör fördelas jämnt över produktionssäsongen. Om mätningar av olika skäl bara kan genomföras under en begränsad tidsperiod bör provtagningen göras i augusti för månadsmedelvärden. I augusti är också syrehalterna som lägst och syrekonsumtionen som högst i många akvatiska miljöer. Andra tidpunkter under den produktiva säsongen är dock möjliga. Kringvariablerna temperatur, totalfosfor och totalkväve ger möjlighet att särskilja klimatbetingade effekter som temperatur från effekter orsakade av mänsklig verksamhet, exempelvis tillförsel av fosfor och kväve. Tidsserier i kustbassänger kan också jämföras med tidsserier i öppna havet för att skilja storskalig påverkan från lokal påverkan. Förklaringsvariablerna kan också ta bort trender hos huvudvariabeln och därmed öka dess styrka.

När bakteriehalt och kolinnehåll per bakteriecell uppvisar relativt låg inomårsvariation räcker det att mäta bakteriell biomassa sex gånger per år. Syrehalten bör mätas samtidigt med huvudvariabeln och omfatta årsminimum. Totalhalter av syre skall mätas tio gånger per år och med provtagningarna jämnt fördelade över året. Där månadsvärden mäts bör man samordna mätningarna av olika variabler.

Bakterievariablerna krävs för att det skall vara möjligt att beräkna bakteriell syrekonsumtion och därmed, indirekt, den biokemiska syrekonsumtionen (BOD₇). Omvandlingsfaktorn för tymidin (bakteriernas upptag av och omvandling från tymidin till syreupptag) varierar lite med tillgång på organiskt material i vattenmiljön, och litteraturvärden för aktuell miljötyp kan, som nämnts under "Strategi", tillämpas. Bakteriernas tillväxteffektivitet (hur stor andel av tillgänglig näring som resulterar i faktisk tillväxt) varierar under året, medan genomsnittsvärden på årsbasis varierar mindre (5, 14). Vid studier där man använder sig av månadsvärden rekommenderas att man utifrån de faktiska förhållandena i området bestämmer tillväxteffektiviteten för den aktuella tidsperioden. När årsvärden används kan litteraturdata för aktuell miljötyp tillämpas. Kringvariablerna från andra undersökningstyper ökar möjligheten att särskilja klimatbetingade effekter från lokala effekter och effekter orsakade av mänsklig verksamhet, speciellt om det saknas tidsserier från ett jämförbart område i öppna havet.

Metoder

Mätning av bakterietillväxt utförs baserat på bakteriernas upptag av tritierat tymidin (se 30 och 15). Metoden har modifierats för enklare och billigare analys, enligt metodprotokoll i Bilaga 1 (16). Det bör poängteras att organisk berikning inte har visats ge tydlig effekt på

aktuella omräkningsfaktorer, medan viss effekt visats för fosfathalt. Denna effekt är dock liten i förhållande till skillnader i tymidinupptag mellan olika miljöer. Upptag av aminosyran leucin kan användas som alternativ, förutsatt att en empirisk omvandlingsfaktor bestäms.

Man gör skattningen av bakteriebiomassa genom märkning med färgämnet akridinorange och analys i epifluorescensmikroskop (17). Bildanalys ger samtidigt med cellantal även data om bakteriernas biovolym och cellmorfologier (26). Detaljerade anvisningar ges i metodprotokollet i Bilaga 2, där vikten av snabb preparation efter provtagning särskilt beaktats (18).

Syrehalt mäts med Winklermetoden (19). Totalhalter av fosfor och kväve mäts spektrofotometriskt efter uppslutning (19). Temperatur mäts med kalibrerad termometer med precision av $\pm 0,1$ °C eller en CTD-sond (se även undersökningstypen **Hydrografi och närsalter**).

Observations/provtagningsmetodik

Vattenprover tas med en vattenhämtare per djup. Lämplig volym är fem liter och hämtare av exempelvis Niskin-typ (PVC-plast) kan användas. Se även Bilaga 1 (Bakteriell syrekonsumtion) och Bilaga 2 (Bakteriehalt med direkt mikroskopi).

Säsongsvariationen hos bakterieplankton är betydande, medan den rumsliga variationen är mindre (9). För att få en god uppfattning om årsproduktion och medelbiomassa skall man, som nämnts tidigare, ta minst tio prover per år på minst två mätstationer per lokal (t.ex. en bassäng eller ett typområde). Samtidig provtagning av flera områden under en månad med relativt liten mellanårsvariation kan vara ett alternativt sätt att göra karteringar över flera områden eller att göra en recipientkontroll. Augusti rekommenderas som provtagningsmånad. Två prov bör tas på två stationer inom området under denna månad.

I områden som är grundare än 25 meter är djupfördelningen av bakterieplankton relativt homogen och man tar prov på fyra vattendjup per vattenpelare för att skatta den totala (integrerade) bakteriella syrekonsumtionen. I djupare områden är värdena för bakteriell syrekonsumtion klart högre i det belysta (trofoga) vattenskiktet än i den underliggande vattenmassan. Sju prov används idag för att beräkna bakteriell syrekonsumtion i områden på större vattendjup än 100 meter. Proverna fördelas så att man får representativa tidsserier ovanför (tre mätdjup) och under (fyra mätdjup) täthetsprångskiktet, som utgör gränsen mellan vattenmassor med olika salthalt och temperatur. För mätning av bakteriebiomassa provtas två djup vid kuststationer respektive fyra djup i öppna havet med motsvarande fördelningsstrategi. Faktiska provtagningsdjup skall harmoniseras med dem som HELCOM rekommenderar för närsalter.

Utrustningslista

Bakteriell syrekonsumtion

- Scintillationsräknare
- Eppendorf EDOS
- Niskinhämtare
- Centrifug, 1,5 ml rör, kyld
- Kylinkubator (2 °C), 1,5 ml rör
- 2 Termosar
- Pipetter 1 ml, 100 µl, 2 µl

Bakteriebiomassa

- Mikroskop

- Filtrebytta
- Ejektorsug
- Dator
- Kamera
- Mjukvara
- Grabberkort, hårddisk

Tillvaratagande av prov, analysmetodik

Prover för bakterieproduktion måste tas tillvara inom 30 minuter och inom den tidsperioden skall också upptagsexperiment göras. Prov där triklorättiksyra (TCA) tillsatts kan sparas vid 4 °C i sju dagar. Analys av radioisotop i upparbetade prover bör göras inom sju dagar. För övrig analysmetodik hänvisas till Bilaga 1.

Prover för bestämning av bakteriebiomassa konserveras med formalin. Mikroskoppreparat skall göras inom 12 timmar och lagras frysta. Ett konserverat prov kan dock sparas 14 dagar innan mikroskoppreparat görs. Sådan förvaring medför bara en försumbar påverkan på mätresultatet (se Bilaga 2) och övriga variabler.

Fältprotokoll

I metodprotokollen i Bilaga 1 och Bilaga 2 anges i detalj hur metoderna utförs. Dessa protokoll bör följas vid provtagning, eftersom man riskerar att missa provtagningsmoment eller göra fel om man förkortar protokollen. Användning av separata protokoll ställer också krav på att metodikändringar förs in på alla nödvändiga ställen, med ökad risk för fel som följd. Det rekommenderas att endast ett korrekt protokoll finns per metod (t.ex. Bilagorna 1 och 2) och att metodiken baseras på detta.

Rapporteringsformat för datavärden har specificerats under "Datalagring".

Bakgrundsinformation

Mätvärden från etablerade miljöövervakningsstationer (t.ex. BIOMAD-databasen: Database on Marine Biological Monitoring Data), eller från vattenmiljöer som liknar den undersökta (exempelvis samma typområde), kan användas som referensvärden. För referensvärden från internationell litteratur, se (3) och (2).

Det är viktigt att ha kunskap om strömningsförhållanden (sötvattenplymer, uppvällningsområden) och utbytestider vid valet av plats för provtagningsstationer; sådan kunskap bidrar till att resultaten blir mer generaliserbara. Tillgång till mer än tre års mätdata ger möjlighet att ta viss hänsyn till naturlig variation mellan år. Vattentemperatur är en värdefull förklaringsvariabel, framförallt på stationer där prover tas mer än tio gånger per år. Tillgång till övriga planktonvariabler och information om bottenfauna bidrar också till att öka säkerheten i en tillståndsbedömning.

Databehandling

Mängden bakterier beräknas typiskt från mer än 1 000 celler per prov, där medianvärdet för bakteriesamhället används som genomsnitt. Bakteriernas biovolym beräknas från samma data och bakteriebiomassan beräknas från dessa värden och ett allometriskt förhållande mellan kolinnehåll och bakteriernas biovolym (21, 22; se även Bilaga 2 för ytterligare information).

Bakteriell syrekonsumtion beräknas utifrån bakteriernas nettoupptag av radioaktivt tymidin, baserat på prov och avdödad kontroll. Man använder sig av en omvandlingsfaktor från

tymidinupptaget (räknat i mol) till antal bildade bakterieceller. Det är bäst om denna faktor baseras på bestämmningar från det aktuella havsområdet. Produktion av kolbiomassa beräknas från kolinnehåll per bakterie enligt ovan. Kolproduktionen omvandlas till syrekonsumtion via tillväxteffektivitet och respirationskvoten. Bakteriell syrekonsumtion räknas om till dagskonsumtion under antagande att dygnsvariationen är betydligt mindre än säsongsvariationen (23, 24; se även Bilaga 1 för ytterligare information).

Om man beräknar årsvärden skall den totala (integrerade) syrekonsumtionen för ytskiktet respektive djupskiktet skattas, varefter proverna integreras över året. Årsvärdena från minst två stationer inom det område som övervakas används som provtagningspunkter (parallellprov) för trendanalyser av tidsserien, korrelationsanalyser med förklaringsvariabler, eller test av skillnader mellan områden.

När månadsvärden används beräknas integrerad produktion för ytskikt respektive djupvatten för provtagningarna. Dessa används som parallellprov för aktuell månad och år.

Kvalitetssäkring

Kvaliteten säkras fortlöpande om man är noggrann i alla steg från provtagning till analys och följer de tidsbegränsningar för upparbetningen av proverna som anges i de metodprotokoll som används.

Reproducerbarheten av variationen mellan parallellprov och nivån på blankvärden för bakteriell syrekonsumtion är god med nuvarande protokoll. Blankvärden för bakteriellt tymidinupptag skall normalt ligga under 100 dpm och det har inte påvisats någon systematisk variation med djupet. Blankvärden från olika djup kan därmed behandlas som parallellprov.

Beräknade mätvärden skall kvalitetskontrolleras för rimlighet genom jämförelse med andra data i djupprofilen och djupprofiler från motsvarande säsong. Absolutvärden och deras spridning granskas i kvalitetskontrolldiagram (exempelvis X-diagram), där alarmgränsen är två gånger standardavvikelsen (SD) för dataserien och aktionsgränsen är tre gånger SD.

Det laboratorium som utför analyserna bör årligen kalibrera bakteriellt tymidinupptag mot tillväxt av bakterier i utspädningskulturer från aktuell vattenmiljö enligt (25). Kalibrering bör även ske mot total syrekonsumtion. Deltagande i interkalibreringar med andra laboratorier rekommenderas.

Analyserna av bakterieantal och bakteriell biomassa har automatiserats med hjälp av bildanalys, där bakterierna identifieras automatiskt via ett s.k. neuralt nätverk. Detta säkrar i sig reproducerbarheten och gör analysen oberoende av vem som är operatör, samt är mer ekonomisk. Standardfelet för cellantal skall understiga 10 procent mellan bildfält på ett mikroskoppreparat. Antal räknade celler per prov skall överstiga 300. Bakterieantal och bakterievolum kvalitetskontrolleras genom jämförelse med andra data i djupprofilen och djupprofiler från motsvarande säsong med X-diagram som ovan.

Bildanalysutrustningen kalibreras vid varje användningstillfälle med plastkuler med definierad diameter enligt (26). Interkalibrering med andra laboratorier rekommenderas.

Rapportering

Data rapporteras till den regionalt kvalitetssäkringsansvarige för vidare leverans till den nationella biologiska databasen. Kompetens för kvalitetssäkring av bakterievariablerna finns vid Umeå Marina Forskningscentrum.

Rapportering till datavärd skall ske separat för varje djup och parallellprov och omfatta uppgifter om:

- utförare
- fartyg
- station (enligt HELCOM:s BMPnomenklatur, om definierad)
- koordinater
- datum
- klockslag (när man börjar inkuberingen)
- klockslag (när man avslutar inkuberingen)
- djup (m)
- ¹bakteriellt tymidinupptag (dpm)²
- ¹tymidinupptag i kontroll (dpm)
- ¹tymidinetns specifika aktivitet
- ¹tymidinomvandlingsfaktorn (celler [mol tymidin]⁻¹)
- bakterieantal, (hela bakteriesamhället, celler ml⁻¹)
- bakterievolum (median, µm³ cell⁻¹)
- tillämpad eller uppmätt tillväxteffektivitet (produktion av kolbiomassa./assimilation av kol) i procent
- tillämpad eller uppmätt respirationskvot (mol O₂ /mol CO₂)
- syrehalt (ml liter⁻¹)
- totalfosfor (µmol/liter)
- totalkväve (µmol/liter)
- temperatur (°C)

¹ om leucin används som radioaktivt spårämne skall motsvarande anges i leucinenheter.

² disintegrations per minute

Grundläggande variabler (rådata) rapporteras till databasen för att ge utrymme för korrigeringar av faktorer och funktioner vartefter riktigare och precisare bestämningar blir tillgängliga. Utifrån grundvariablerna kan man skapa enkla beräkningsark i kalkylprogram för att bestämma de storheter som skall rapporteras enligt nedan.

Presentation

Bakteriell syrekonsumtion för hela bakteriesamhället på årsbasis redovisas i rapporter som mol O₂ m⁻² år⁻¹ för årsserier med mer än tio provtagningar per år. För månadsvärden anges värden för varje provtagning i mol O₂ m⁻² dag⁻¹. Prefixen tusendels (m) eller miljondels (µ) används beroende på värdets storlek (e.g. vattendjup. För beräkningen från bakteriecellproduktion till syrekonsumtion används bästa skattning av bakteriell tillväxteffektivitet och respirationskvot i det aktuella vattenområdet eller värden som anges i litteraturen (se Bilaga 1). Kolinnehåll per bakterie beräknas enligt en allometrisk funktion beroende av cellvolum (Bilaga 2).

Tidsserier redovisas i X-Y-diagram med separata värden för varje station inom området. Jämförelse mellan områden redovisas som stapeldiagram med felstaplar som anger standardavvikelse mellan stationer inom området. Områdeskartering presenteras enligt GIS-

teknik som konturlinjer eller staplar på en karta över området. Tidserier eller stationsjämförelser av bakteriebiomassa kan redovisas i mmol C m^{-2} .

Datalagring, datavärd

Bakterievariablerna har rapporterats till datavärd sedan 1991.

En förteckning över datavärden finns att hitta på Naturvårdsverkets webbplats under adressen <http://www.naturvardsverket.se/tillstandet-i-miljon/miljoovervakning/miljoovervakningsdata/>

En regional databas för bakterievariabler finns vid Umeå Marina Forskningscentrum (UMF) med mätvärden från 1984. Kontaktperson är Johan Wikner (tel: 090-786 50 00, e-post: Johan.Wikner@umf.umu.se).

Utvärdering

Syftet med undersökningstypen är att påvisa förändringar av den biokemiska syrekonsumtionen (BOD_7) i tid och rum. Vid enstaka mätningar eller i början av tidsserier kan års- eller månadsvärden jämföras med referensstationer i kust eller öppet hav. Med hjälp av litteraturuppgifter och tidsserier från befintliga intensivstationer (provtagningar mer än 10 gånger per år) kan gränser för påverkan definieras med utgångspunkt från fastställda statistiska konfidensintervall (28). I detta sammanhang är information från intensivstationer med längre mätserier, företrädesvis från samma typområde, värdefull. Värderna som är signifikant högre än 75-procentkvartilen hos mätvärdena för typområdet och referensperioden bör följas upp (värden finns för typområde 1 och 2 i databasen BIOMAD).

Tidsserier för en tioårsperiod börjar kunna ge tillförlitliga trendskattningar. För årsmedelvärden kan linjär regression (Modell I) tillämpas. En ökande trend, exempelvis mer än sju procent ökning per år, tyder främst på högre näringstillgång i området. Jämförelse med förklaringsvariabler och stationer i öppet hav ger information huruvida klimatbetingade faktorer eller lokala utsläpp kan förklara observerade förändringar. Dock är kunskapen om naturliga variationer under längre tidsperioder (10–100 år) fortfarande begränsad, varför man bör iakttä viss försiktighet i tolkning av trender tills det finns längre tidsserier att tillgå. Som nämns ovan (se "Strategier") spänner globalt sett skillnaden i bakteriell syrekonsumtion mellan vattenmiljöer med olika näringsstatus över fem tiopotenser (2, 3). Statistiskt säkerställda skillnader kan operativt antas uppträda om det är minst 80-procentiga förändringar som består i minst tre år (baserat på +2 standardavvikelse hos befintliga tidsserier). För trendanalys av månadsvärden rekommenderas icke-parametriskt Mann-Kendall test. Månadsvärden ger sannolikt sämre möjligheter (t.ex. styrka) att upptäcka en trend i ett område.

Kostnadsuppskattning

Fasta kostnader

Utrustning (Inköpsår): Pris (exkl. moms)

Bakteriell syrekonsumtion

- Scintillationsräknare (1999): 195 000:-
- Eppendorf EDOS (1992): 20 000:-

- Niskinhämtare (1994): 13 000:-
- Centrifug (1994): 55 000:-

Bakteriebiomassa

- Mikroskop (1997): 120 000:-
- Filterbytta (1993): 12 000:-
- Ejektorsug (1993): 1 000:-
- Dator (1993): 40 000:-
- Kamera (1993): 120 000:-
- Mjukvara (1993): 20 000:-
- Grabberkort, hårddisk (1993): 40 000:-

Materielkostnad per provdjup skattat 1999**Materiel: Kostnad***Bakteriell syrekonsumtion*

- Provtagningskärl: 3:-
- Scintburkar: 1:28
- Centrifugrör 1,5 ml: 0:64
- Handskar: 0:52
- Scintillationsvätska: 0:96
- 3H-tymidin: 6:80
- Triklorättiksyra (TCA): 0:33

Bakteriebiomassa

- Provkärl: 6:-
- Formalin: 0:02
- Acridinorange: 0:15
- 0,2 µm filter: 5:60
- GF/C filter: 1:2:
- Objektglas: 0:2
- Täckglas: 0:4
- Acrodiskfilter: 1:-

Analyskostnader skattat år 1999**Variabel: Kostnad per djup**

- Bakteriell syrekonsumtion: 70:-
- Bakteriebiomassa: 114:-
- Temperatur: 98:-
- Syrehalt: 85:-
- Totalfosfor: 106:-
- Totalkväve: 106:-

Tidsåtgång

Tidsåtgång för provtagning och analys för bakteriell syrekonsumtion beräknas till mellan 1,5 och 1,8 timmar, beroende av antal provdjup per station (max. 12). Den effektiva arbetstiden

skattas till mellan en halv och en timme, varför tidsåtgången delvis kan samordnas med annat analysarbete (exempelvis analyser av bakterieantal och syrehalt).

Provtagning och analystid för bakteriebiomassa beräknas kräva ca 15 minuter per prov för upp till nio provdjup. Detta arbete kan samordnas med upparbetning av prover för analys av bakteriell syrekonsumtion.

Förutom ovanstående tillkommer tid för att föra in data i kalkylblad på datormedium. Denna tidsåtgång beror av antal djup och stationer per område. För två stationer med sex olika djup bedöms arbetstiden uppgå till en halvtimme.

Även fartygstid och andra transportkostnader, övertid och eventuella andra lönetillägg tillkommer. Kvalitetssäkring, statistisk analys, utvärdering och rapportering ingår inte i beräkningen.

Kontaktpersoner

Programområdesansvarig, Havs- och vattenmyndigheten:

Ulrika Stensdotter Blomberg (Sötvatten)
Enheten för miljöövervakning
Havs- och vattenmyndigheten
Box 119 30
404 39 Göteborg
Tfn: 010 – 698 60 11
E-post: ulrika.stensdotter@havochvatten.se

Karl Norling (Kust och hav)
Enheten för miljöövervakning
Havs- och vattenmyndigheten
Box 119 30
404 39 Göteborg
Tfn: 010 – 698 6138
E-post: karl.norling@havochvatten.se

Expert, UMF:
Johan Wikner
Umeå Marina Forskningscentrum (UMF)
Umeå universitet
901 87 Umeå
Tel: 090–786 50 00
E-post: Johan.Wikner@umf.umu.se

Referenser

1. Vattenundersökningar – Bestämning av biokemisk syreförbrukning efter n dagar (BOD⁵) – del 2: metod för outspädda prover. – Stockholm : SIS (Svensk standard ; SS-EN 1899-2

2. Billen, G., Servais, P. and Becquevort, S. 1990. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control ? *Hydrobiologia* 207, 37-42.
3. Cole, J.J., Findlay, S. and Pace, M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross systems overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43, 1-10.
4. Wikner, J. and Hagström, Å. 1991. Annual study of bacterioplankton community dynamics. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1313-1324.
5. Zweifel, U.L., Norrman, B. and Hagström, Å. 1993. Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 23-32.
6. Biddanda, B., Opsahl, S. and Benner, R. 1994. Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton on the Louisiana shelf. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1259-1275.
7. Duxbury, T. 1985. Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. In: *Advances in microbial ecology*, Marshall, K.C. (ed.). Plenum Press, London, p. 185-235.
8. Herndl, G.J., Mulleriklas, G. and Frick, J. 1993. Major Role of Ultraviolet-B in Controlling Bacterioplankton Growth in the Surface Layer of the Ocean. *Nature* 361, 717-719.
9. Heinänen, A. and Kuparinen, J. 1991. Horizontal variation of bacterioplankton in the Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3150-3155.
10. Kousa, H., Kuparinen, J. and Wikner, J. 1996. Pelagic biology [Gulf of Bothnia]. In: *Third periodic assessment of the state of the marine environment of the Baltic Sea, 1989-93 : background document*. - Helsinki Commission (Baltic Sea environment proceedings ; 64 B), p. 38-42.
11. Hirsch, R.M., Slack, J.R. and Smith, R.A. 1982. Techniques of trend analysis for monthly water quality data. *Water Resources Research* 18, 107-121.
12. Hirsch, R.M. and Slack, J.R. 1984. A non-parametric trend test for seasonal data with serial dependence. *Water Resources Research* 20, 727-732.
13. Clarke, G.M. 1988. Statistics and experimental design. Edward Arnold, London, 188 p.
14. del Giorgio, P., Cole, J. and Cimbleris, A. 1997. Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385, 148-151.
15. Bell, R.T. 1993. Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, p. 495-503.
16. Smith, D.C. and Azam, F. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar. Microb. Foodwebs* 6, 107-114.
17. Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. 1977. Use of nucleporefilters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
18. Turley, C.M. 1993. Direct estimates of bacterial numbers in seawater samples without incurring cell loss due to sample storage. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, p. 143-147.

19. Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K. 1983. Methods of Seawater analysis. Verlag Chemie Weinheim, Weinheim, 419 p.
20. Pitkänen, H., Kangas, P., Ekholm, P. and Perttilä, M. 1986. Surface distribution of total phosphorus and total nitrogen in the Finnish coastal waters in 1979-1983. - Helsinki : Vesihallitus. *Publications of the Water Research Institute* 68, 40-54.
21. Simon, M. and Azam, F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201-213.
22. Norland, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, p. 303-307.
23. Riemann, B., Nielsen, P., Jeppesen, M., Marcussen, B. and Fuhrman, J.A. 1984. Diel changes in bacterial biomass and growth rates in coastal environments, determined by means of thymidine incorporation into DNA, frequency of dividing cells (FDC), and microautoradiography. *Mar Ecol Prog Ser* 227-235.
24. Wikner, J., Rassoulzadegan, F. and Hagström, Å. 1990. Periodic bacterivore activity counterbalances bacterial growth in the marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 35, 313-324.
25. Kirchman, D.L. and Ducklow, H.W. 1993. Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production. In: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, p. 513-518.
26. Blackburn, N., Hagström, Å., Wikner, J., Cuadros Hansson, R. and Bjørnsen, P. 1998. Automatic counting, measurement, morphology, and growth rate estimates of bacteria in aquatic samples by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3246-3255.
27. HELCOM, 2002. Manual for marine monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM.
<http://sea.helcom.fi/Monas/CombineManual2/CombineHome.htm>
28. Naturvårdsverket, 1999 : Bedömningsgrunder för miljö kvalitet. Kust och hav. *Rapport / Naturvårdsverket* 4914.
29. Pers.komm. Lars Andersson, SMHI
30. Guidelines for the Baltic Monitoring Programme for the Third Stage. 1988. – Helsinki : Helsinki Commission. *Baltic Sea environment proceedings* 27 A, 27 B, 27 C and 27D.

Uppdateringar, versionshantering

Version 1:1, 2003-05-21. Revidering.

Version 1:2, 2016-12-02. Korrigering till HaV-logotyp och – kontaktperson.