

Temporala och spatiala trender i föreslagna baslinjeorganismer för implementering av stabila isotoper i miljögiftsövervakningen

Long-term changes in stable carbon and nitrogen isotopes in Blue mussels from Kvädöfjärden, Baltic Proper (1981-2017), and spatial comparisons of the isotope composition in Blue mussel and the Baltic clam from 13 stations along the Swedish coast (2015-2017)

Agnes Karlsson

I samarbete med (alfabetisk ordning): Sara Danielsson, Caroline Ek, Suzanne Faxneld, Elisabeth Nyberg och Kerstin Pütz Winkens från Naturhistoriska Riksmuseet, Enheten för miljöforskning och övervakning.

Avtal: 213-18-025 Analys av stabila isotoper i mussla

Department of Ecology, Environment and Plant Science (DEEP)

Stockholm University
Stockholms universitet
S-106 91 Stockholm

Visiting address:
Svante Arrhenius väg 20 A
www.deep.su.se

Phone: +46 8 16 1246
E-mail: agnes.karlsson@su.se
www.su.se/english/profiles/agka0879-1.192788

<p>Report authors Agnes Karlsson, Department of Ecology, Environment and Plant Science (DEEP), Stockholm university Sara Danielsson, Caroline Ek, Suzanne Faxneld, Elisabeth Nyberg och Kerstin Pütz Winkens, Swedish Museum of National History, Department of Environmental Research and Monitoring</p>	<p>Responsible publisher Stockholm University</p> <p>Postal address Department of Ecology, Environment and Plant Sciences (DEEP) Stockholm University 106 91 Stockholm Telephone +46(0)8-16 12 46</p>
<p>Report title and subtitle</p> <p>Temporal och spatiala trender i föreslagna baslinjeorganismer för implementering av stabila isotoper i miljögiftsövervakningen</p> <p>Long-term changes in stable carbon and nitrogen isotopes in Blue mussels from Kvädöfjärden, Baltic Proper (1981-2017), and spatial comparisons of the isotope composition in Blue mussel and the Baltic clam from 13 stations along the Swedish coast (2015-2017)</p>	<p>Purchaser Swedish Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Unit SE-106 48 Stockholm, Sweden</p> <p>Funding National environmental monitoring</p>
<p>Keywords for location (specify in Swedish) Kvädöfjärden, Kas-Ångsfjärden, Långvinds-Skärsåfjärden, Gaviksfjärden, Norrbyn (Örefjärden), Östergarnsholm, Simpnäsklubb, Dragviksfjärden, Högby Fyr, Utlängan, Abbekås, Landskrona, Kullen, Glommen</p>	
<p>Keywords for subject (specify in Swedish) Stabila isotoper, kol, kväve, tidstrender, spatiala trender, blåmussla, östersjömussla, baslinje</p>	
<p>Period in which underlying data were collected 1981–2017 (Kvädöfjärden), 2015, 2016 or 2017 (all other stations)</p>	
<p>Summary The report summarises the long-term changes in the stable isotope composition of Blue mussels (<i>Mytilus edulis</i>) from Kvädöfjärden (1981-2017) and the spatial variation in the isotope composition in Blue mussels and the Baltic clam, <i>Limecola balthica</i> (syn. <i>Macoma balthica</i>), from 14 stations throughout the Baltic Proper (coast and offshore stations) and the west coast of Sweden.</p> <p>Time series and the spatial variability of analysed isotopes in Blue mussels and the Baltic clam are presented.</p> <p>The $\delta^{13}\text{C}$ values were rather stable over time and the year-to-year variation corresponds well to observations in the Askö area, suggesting the two reference stations are rather similar regarding ultimate carbon sources. However, the pattern for $\delta^{15}\text{N}$ increased over time in Kvädöfjärden (although not during the last 25 years). The difference in $\delta^{15}\text{N}$ between years in Kvädöfjärden was sometimes equivalent to one trophic level (i.e. a trophic shift of 3.4 per mill).</p> <p>Spatial comparisons of the isotope composition in mussels revealed large differences (equivalent to the trophic shift) among stations and between species, highlighting the need for site-specific isotope baselines when normalizing contaminant data to a specific trophic position according to the WFD (Water Framework Directive).</p>	

Bakgrund:

Stabila isotoper av kol och kväve är relevanta i miljögiftsövervakning då de ger information om födovävens struktur genom att isotopsammansättning hos en organism reflekterar dess diets isotopsammansättning. Eftersom många av de miljögifter som analyseras i biota tas upp via födan kan biomagnifieringspotentialen hos dessa miljögifter utvärderas bättre om hänsyn tas till organismens trofiska position (Rolff et al 1993). Födovävsstrukturen kan dessutom skilja sig både rumsligt (t.ex. enklare födoväv i norra Östersjön jämfört med södra Östersjön och mycket mer komplex på västkusten) och över tid (storskaliga förändringar i Östersjöns födoväv till följd av övergödning och överfiske). Information om förändringar i födoväven (t.ex. förändringar i trofisk position, TP, eller förändrad födobas) kan därmed bidra till att förklara eventuella förändringar i miljögiftsbelastning i fisk förutsatt att nedbrytningsförmågan av miljögiftet i fråga inte skiljer sig mellan olika taxonomiska grupper.

Enligt EUs vattendirektiv (WFD), ska uppmätta miljögiftskoncentrationer i biota justeras till en specifik TP för att kunna jämföras med s.k. miljö kvalitetsstandarder (EQS_{biota}) och den rekommenderade metoden för att beräkna TP är genom mätningar av kväveisotoper ($\delta^{15}N$) (EC 2014). $\delta^{15}N$ i organismer anrikas för varje trofisk passage (en generell ökning med 3,4 promille), men denna anrikning påverkas även av organismens fysiologiska status, t.ex. kan födobegränsning leda till förhöjda $\delta^{15}N$ värden (Gorokhova 2017). $\delta^{15}N$ reflekterar dessutom även bakgrundsbelastning vad gäller kväve (t.ex. antropogent ursprung eller från cyanobakteriers kvävefixering) och detta kan resultera i olika isotopbaslinjer, rumsligt såväl som tidsmässigt (Rolff 2000, Savage & Elmgren 2004, Karlson et al 2015). Därför bör $\delta^{15}N$ i t.ex. fisk normaliseras mot en geografiskt och tidsmässigt närliggande baslinje för att inte ev. förändringar i fiskens $\delta^{15}N$ och därmed den trofiska positionen ska misstolkas. Långlivade, stationära och filtrerande organismer som musslor som integrerar växtplankton-produktion över hela året anses vara lämpliga baslinjeorganismer för detta ändamål (Vander Zanden & Rasmussen 1999).

Syfte:

- 1) Att utvärdera eventuella temporala förändringar i isotopsammansättning i blåmusslor från Kvädöfjärden, den enda station i Östersjön där blåmusslor samlats in under lång tid (sedan 1981). Om temporala förändringar i kväveisotopen är av samma magnitud som den trofiska anrikningsfaktorn på 3.4 så kommer förändringarna ha konsekvenser för angivandet av trofisk position i fisk.
- 2) Att jämföra isotopsignaturen i blåmussla och östersjömussla med avseende på rumslig variation mellan stationer längs svenska kusten.

Metod:

Individuella musselprover av liknande storlek (ca 2 cm) från NRMs miljöprovbanks (förvarats frysta) användes. Dessa har samlats in under september eller oktober månad sedan 1981. Större individer är äldre och har därför hunnit anrika $\delta^{15}N$ under en längre tid vilket orsakar en onödig ytterligare källa till variation i tidsserien. Frysning är optimalt för att förvara biologiskt material ämnat för isotopanalys. Musslorna dissekerades och relevanta vikt och längdmått togs för att få en uppfattning om ev. förändring i konditionsfaktorn (kvoten mjukdelar:skal) hos musslorna. Mjukdelarna (ej skal) torkades i 60 grader och packades för isotopanalys. Proverna analyserades på UC Davis Stable Isotope Facility, det laboratorium som används av NRM sedan 2013, då stabila isotoper infördes i den marina miljögiftsövervakningen. För att upptäcka eventuella förändringar över tid i isotopsammansättning ($\delta^{15}N$ och $\delta^{13}C$) samt i konditionsfaktorn utfördes linjära regressioner för hela tidsserien från Kvädöfjärden (1981-2017) samt från 1993-2017 (för att möjliggöra jämförelse med en

liknande, kortare tidsserie från Asköområdet, som är referensområde för miljöövervakning av vegetationsklädda bottenar, mjukbottenar och fria vattenmassan sedan 1993; HAV är uppdragsgivare för dessa program).

För stationsjämförelsen (Fig 1) användes färdiga homogenat baserat på ca 20 individer, där homogenaten även analyserats för bl.a. läkemedel enligt avtal 213-18-013 till Naturhistoriska riksmuseet. Varje stations isotopdata plottades mot koordinaterna (longitud och latitud, SWEREF 99) samt stations- och djup-specifik salthalt (data extraherat från Data Assimilation System, DAS <http://nest.su.se/das/>, Sokolov 2003). Icke-linjära Spearman rank korrelationer utfördes för blåmussla separat (n=10 när också station Kvädöfjärdens inkluderas) och kombinerat med östersjömussla (endast n=4 för Östersjömussla, för litet datamaterial för artspecifik korrelationsanalys). Inget exakt p-värde erhålls för Spearman-korrelationerna, sambanden är signifikanta om $p < 0.05$. Regressioner och korrelationer utfördes i statistikprogrammet Statistica (Statsoft).

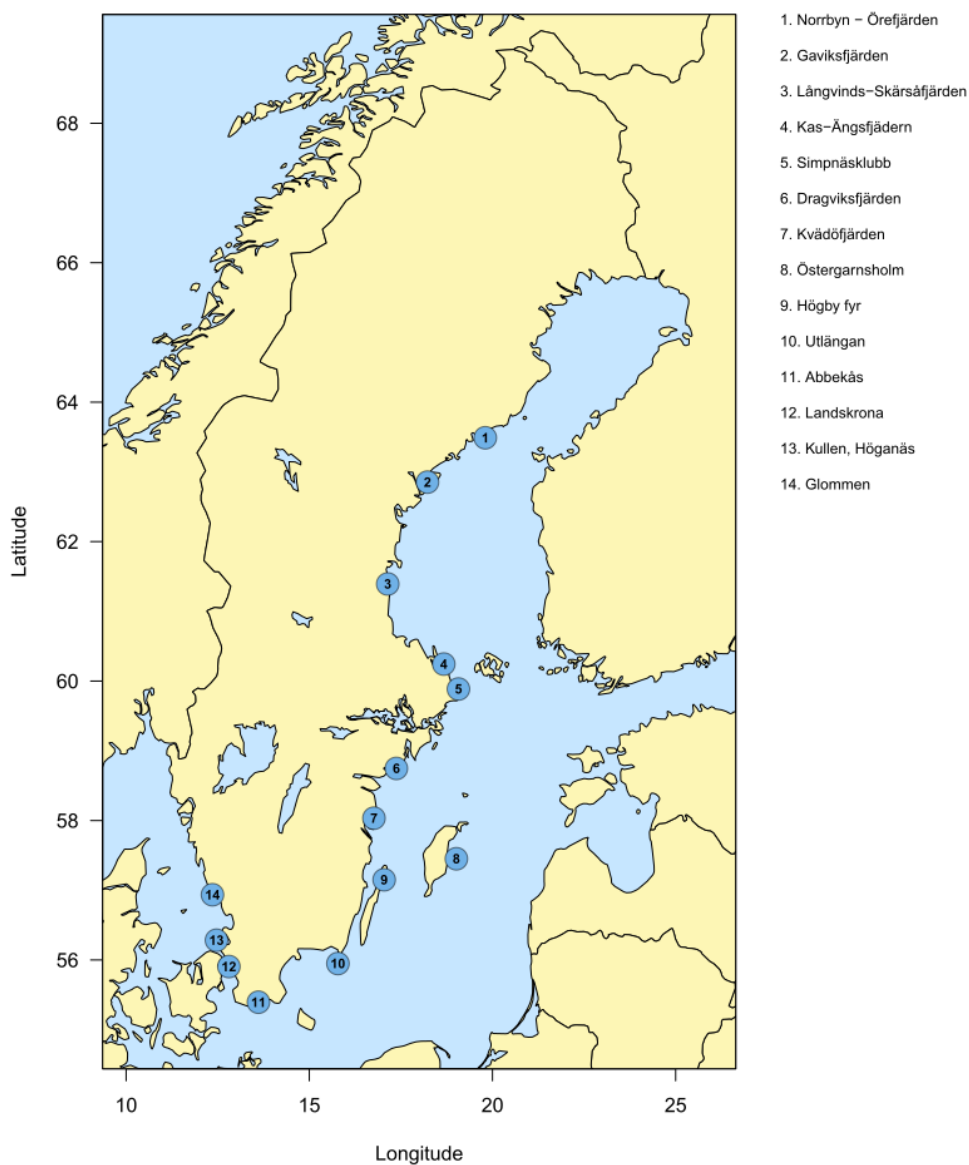


Fig 1. Provtagningsplatser för östersjömussla (1-4) och blåmussla (5-14).

Resultat:

Inga tydliga förändringar i musslornas kondition kunde observeras i tidsserien i Kvädöfjärden ($R^2=0.02$, $p=0.46$). Över hela tidsserien kan en ökning av $\delta^{15}\text{N}$ över tid ses (Fig 2), men under perioden 1993-2017 (den tidsperiod som analyserats från Askö) är trenden snarare negativ (dock ej signifikant, $p=0.35$). För $\delta^{13}\text{C}$ är långtidstrenden ej signifikant ($p=0.32$), men om endast perioden 1993-2017 analyseras är förändringen signifikant negativ (Fig 2).

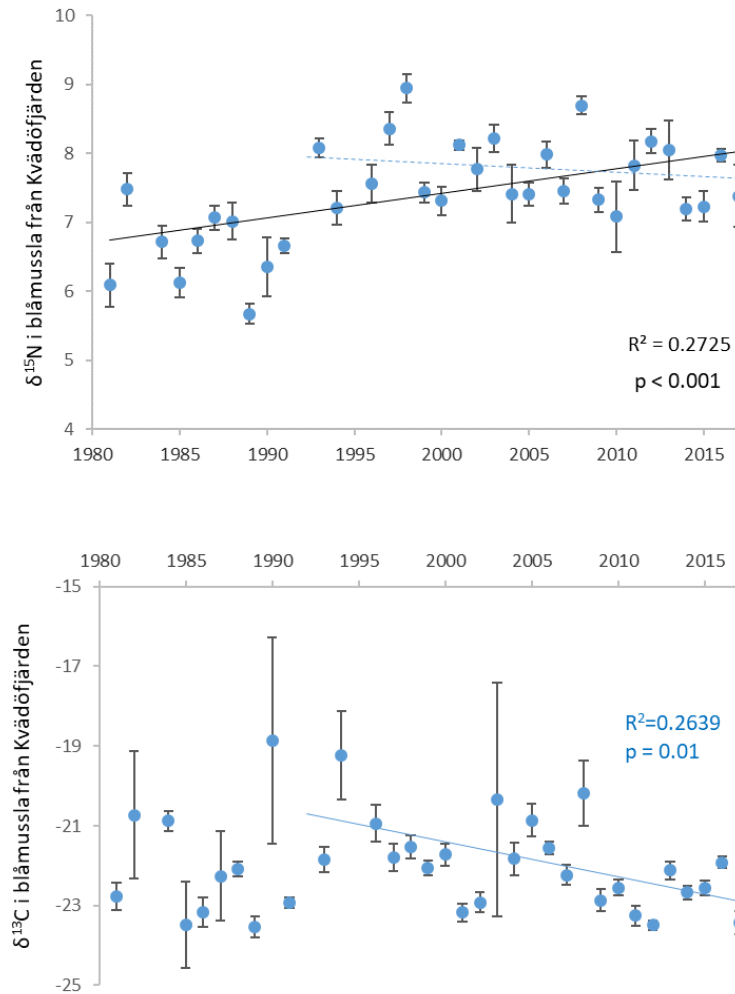


Fig 2. $\delta^{15}\text{N}$ (överst) och $\delta^{13}\text{C}$ (underst) över tid i blåmussla från Kvädöfjärden. Linjerna representerar signifikanta förändringar över tid ($\delta^{15}\text{N}$ i hela tidsserien, $\delta^{13}\text{C}$ under perioden 1993-2017). I figuren visas medelvärden med standardfel ($n=5$ per år).

I figur 3 jämförs blåmusslans och östersjömusslans isotopsammansättning (poolade prover) mellan stationer (se även figur 1 för stationernas geografiska position); östersjömusslan ligger ofta högre i $\delta^{15}\text{N}$ än blåmusslor (förväntat då östersjömusslan äter även detritus) men inom arterna är skillnaderna mellan stationerna också stora, både i $\delta^{15}\text{N}$ och $\delta^{13}\text{C}$. När data från båda arterna av mussla kombineras är endast korrelationen mellan $\delta^{13}\text{C}$ och salthalt signifikant (Spearman korrelation: 0.70, fig 4c), vilket innebär att mer negativa (lättare) $\delta^{13}\text{C}$ värden erhålls i norra Östersjön. Inget generellt samband erhålls för $\delta^{15}\text{N}$ när båda arterna kombineras i analyser. Om endast blåmussla analyseras är sambandet mellan $\delta^{15}\text{N}$ och salthalt signifikant positivt (0.65), och

sambandet med longitud signifikant negativt (-0.83, fig 4a-b). Salthalt och longitud samvarierar dock (-0.87) vilket innebär att effekten av salthalt och longitud inte kan separeras.

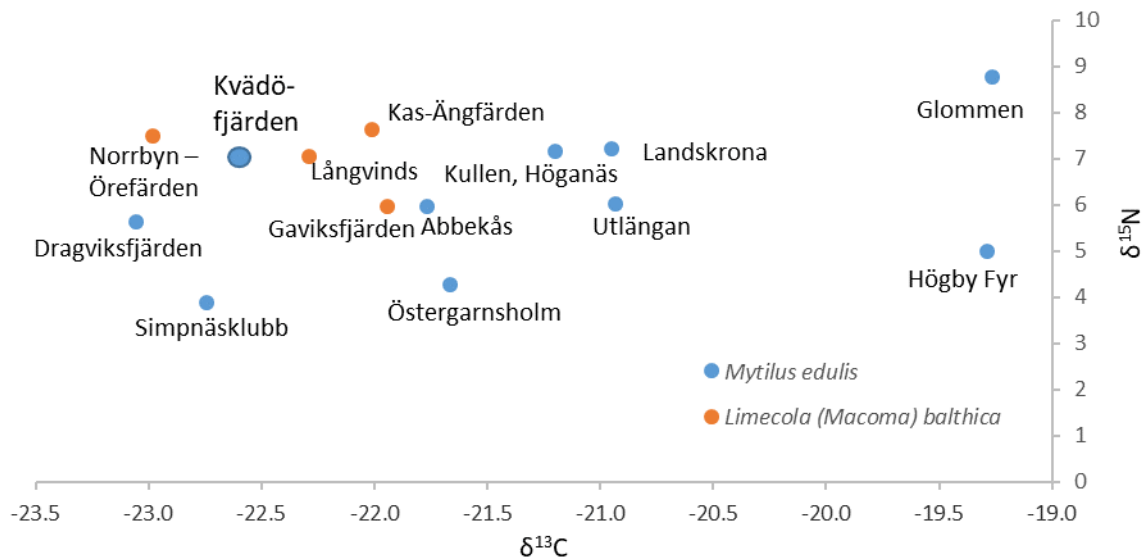
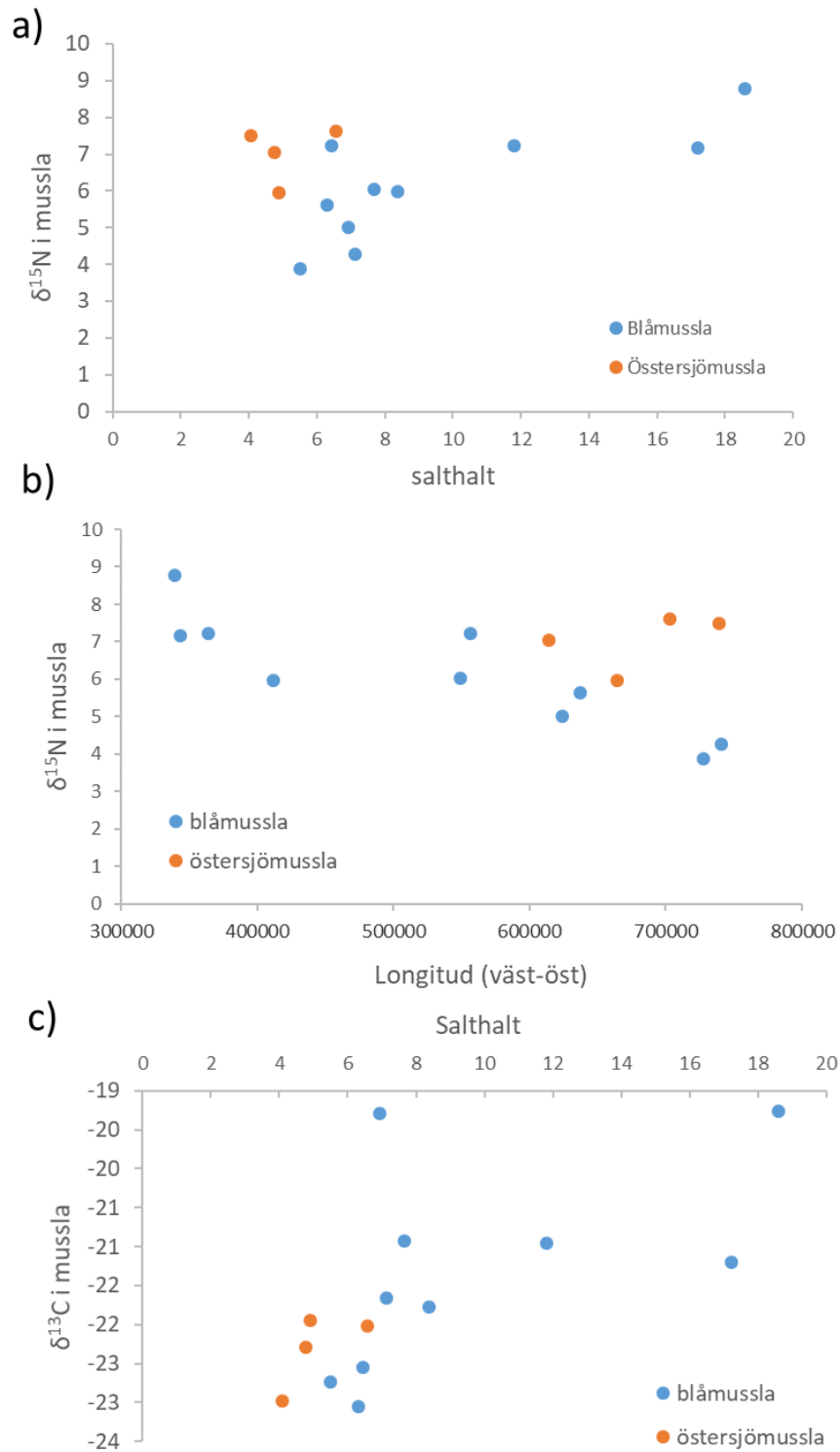


Fig 3. Isotopsammansättning i blåmussla (blå symboler, samtliga provtagna 2015 utom Östergarnsholm som provtogs 2016) och östersjömussla (röda, samtliga provtagna 2017) från olika stationer. Varje station representerar ett homogent av ungefär 20 individer, se avtal 213-18-013 för mer information om provtagning. Kvädöfjärdens isotopdata för 2017 (medelvärde av n=5) är inkluderade för jämförelse.



Figur 4. a) $\delta^{15}\text{N}$ relaterat till salthalt, korrelationen är signifikant för blåmussla (n=10) samt b) $\delta^{15}\text{N}$ relaterat till longitud (endast signifikant korrelation för blåmussla). c) Sambandet mellan $\delta^{13}\text{C}$ och salthalt är signifikant oavsett om arterna testas ihop (n=14) eller om endast blåmussla testas.

Diskussion:

Som tydligt kan ses i långtidsdatat varierar isotopsammansättningen i både kol och kväve mellan åren, men även mellan individer inom samma år. För $\delta^{15}\text{N}$ var långtidstrenden ökande (Figur 2, överst), vilket kan indikera lokalt ökat läckage av tungt kväve från jordbruk med animaliskt gödsel eller ännu tyngre restkväve från reningsverk med denitrifikation (därtill även naturlig denitrifikation som varit omfattande under denna tidsperiod med stora volymer av syrefattigt vatten), alternativt fysiologisk stress hos musslorna (dock var konditionsfaktorn mjukdel:skal oförändrad över tid). På bassängskala skulle minskning över tid av lätt kväve från förbränning (kväveoxider, NO_x Walters et al. 2015) eller minskad användning av konstgödsel (Bateman och Kelly 2007), exempelvis från östblocket under 90-talet efter Sovjettidens sista fas, kunna bidra till en tyngre $\delta^{15}\text{N}$ -signal över tid i musslorna. Eftersom cyanobakterieblomningar som har negativ $\delta^{15}\text{N}$ -signal har ökat över tid i öppna egentliga Östersjön (Kahru och Elmgren 2014), så var den förväntade trenden snarare att en minskning i $\delta^{15}\text{N}$ skulle ha skett över tid (Karlson et al. 2015). Förändringen över den senare tidsperioden är dock aningen minskande (signifikant minskande i Askö, Lienart et al in prep.) men alternativa förklaringar kan vara förändringar i salthalt som påverkar musslornas respiratoriska kostnader och därmed tillväxt av proteinrik vävnad. Att lägsta $\delta^{15}\text{N}$ värden uppmättes österut i Östersjön, skulle dock kunna indikera att inflytandet av cyanobakterieblomningar är större och/eller att inflytandet från gödselläckage och antropogent denitrifikationskväve avtar med ökande avstånd från kusten. När det gäller $\delta^{13}\text{C}$ var tidstrenden (minskning sedan 1993) samt mellanårs-variationen snarlik den som observerats i Askö-musslorna (1993-2017), vilket indikerar att landbaserade kolkällor (mer negativa i $\delta^{13}\text{C}$) ökat i musslornas födobas över tid samt att denna utveckling gäller för både Askö och Kvädöfjärden. Från stationsjämförelsen är det tydligt att de lättare $\delta^{13}\text{C}$ värdena återfinns i norra Östersjön, vilket också indikerar att landbaserade kolkällor utgör en betydande del i födobasen här (Rolff and Elmgren 2000), medan den marina tyngre $\delta^{13}\text{C}$ signalen dominerar på västkusten (station Högby fyr på Ölands östkust som provtogs 2016 uppvisade också en tydligt marin signal, Fig 3.)

Orsaker till förhöjda $\delta^{15}\text{N}$ värden i Kvädöfjärdens blåmusslor jämfört med övriga Östersjöstationer (Fig 3) vore intressant att undersöka vidare. Provtagning av musslor görs årligen i slutet av augusti i Askö, medan Kvädömusslorna provtagits under hösten, vilket innebär att den lätta signalen från kvävet från cyanobakterier kan förväntas avklinga gradvis under hösten. Utöver födobasen så påverkas musslornas $\delta^{15}\text{N}$ (samt lipofila miljögifter) av dess fysiologisk status genom återuppbyggnad av muskelvävnad under sensommar och höst efter att ha frisatt gonader under försommaren. En mindre varierande tid för provtagning mellan stationer vore därför önskvärd om stabila isotoper ska användas för att standardisera TP. Kompletterande analyser av ämnesspecifika isotopanalyser av Kvädömaterialet skulle kunna hjälpa till att utröna om det är den s.k. "source"-aminosyran fenylalanin som blivit tyngre över tid eller om det är de trofiska aminosyrorna som förändrats (dvs förhöjd fraktionering i organismen till följd av t.ex kontaminantexponering, Ek et al. 2018). Framtida provtagningar i Kvädöfjärden skulle dessutom kunna kompletteras med insamling och isotopanalys av fintrådiga alger för en jämförelse av näringsbelastningen i motsvarande alger från Askö, baserat på $\delta^{15}\text{N}$. Det skulle kunna ge mer detaljerad information om näringsbelastning vs. eventuell fysiologisk stress av Kvädöfjärden-musslorna. De två stationerna på västkusten, Nidingen och Fjällbacka, där blåmusslor också provtagits under en längre tid vore intressant att jämföra med utvecklingen i Östersjön; här bör inte kväve från cyanobakterier kunna påverka $\delta^{15}\text{N}$ -värdena (eftersom cyanobakterieblomningar inte förekommer i västerhavet), dock borde minskning av kväveoxider över tid kunna leda till en förhöjd $\delta^{15}\text{N}$ signal även här.

Det är värt att notera att den stora mellanårsvariationen i framförallt $\delta^{15}\text{N}$ ibland motsvarar en hel trofisk position (3.4 promille) vilket kommer ha konsekvenser för normalisering av $\delta^{15}\text{N}$ i fisk (från Kvädöfjärden) mot blåmussla. Vi undersöker för närvarande värdet av att justera varierande kontaminantkoncentrationer i blåmussla i tidstrenden mot $\delta^{15}\text{N}$ (Ek et al, data kommer presenteras på Environmental Specimen Bank-konferensen i juni 2019 vid Naturhistoriska riksmuseet). Samma resonemang gäller för den rumsliga variationen mellan stationer, den stora variation som återspeglas i figur 2 och 3 mellan arter och stationer, understryker behovet av geografiskt "matchande" isotop-baslinjer för att bättre kunna tolka isotopsammansättning i stationär fisk som t.ex abborre och tånglake inom den nationella övervakningen av miljögifter (Danielsson et al 2015). Ytterligare studier där östersjömussla och blåmussla samlas in från samma lokal skulle förbättra jämförelsen av arterna med avseende på systematiska förändringar i $\delta^{15}\text{N}$ mellan regioner i Östersjön. Särskilt intressant vore mätningar vid stationen i Asköområdet, där övrig miljöövervakning gör mätningar, t.ex. av näringsämnen i vattnet och förekomsten av cyanobakterier, som kan stärka tolkningarna.

Avtackande: Sara Bernhardtz dissikerade och vägde tålmodigt hundratals musselprover. Matias Ledesma extraherade ut stationsspecifik salinitetsdata från DAS. Ragnar Elmgren och Carl Rolff tackas för värdefulla kommentarer.

Referenser:

Bateman AS & Kelly SD. 2007. Fertilizer nitrogen isotope signatures, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 43:3, 237-247, DOI:10.1080/10256010701550732

Danielsson S. et al. 2015. Carbon and nitrogen stable isotopes within the Swedish national monitoring of contaminants in marine biota. Report nr 9:2015 Swedish Museum of Natural History

EC 2014. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) - Guidance Document No. 32 on Biota Monitoring (the Implementation of EQS_{biota}) under the Water Framework Directive, Technical Report -2014 -083, The European Commission

Ek et al 2018. Using Compound-Specific and Bulk Stable Isotope Analysis for Trophic Positioning of Bivalves in Contaminated Baltic Sea Sediments. *Env Sci Technol* DOI: 10.1021/acs.est.7b05782

Ek et al. The mussel archive: Can stable nitrogen isotopes help improve interpretation of long-term time series of contaminant data?

Gorokhova E 2017. Individual growth as a non-dietary determinant of the isotopic niche metrics. *Methods in Ecology and Evolution*. DOI: 10.1111/2041-210X.12887

Kahru M. & Elmgren R. 2014. Multidecadal time series of satellite-detected accumulations of cyanobacteria in the Baltic Sea, *Biogeosciences*, 11, 3619-3633

Karlson AML et al 2015. Nitrogen fixation by cyanobacteria stimulates production in Baltic food webs. *Ambio* 44. DOI 10.1007/s13280-015-0660-x

Rolff C, Broman D, Naf C, Zebuhr Y 1993. Potential Biomagnification of Pcd/Fs - New Possibilities for Quantitative Assessment Using Stable-Isotope Trophic Position. *Chemosphere* 27:461-468

Rolff C. 2000. Seasonal variations in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of size fractionated plankton at a coastal station in the northern Baltic proper. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 203, 47-65.

Rolff C & Elmgren R. 2000. Use of riverine organic matter in plankton food webs of the Baltic Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 197

Savage C & Elmgren R. 2004. Macroalgal (*Fucus vesiculosus*) $\delta^{15}\text{N}$ values trace decrease in sewage influence. Ecological Applications 14

Sokolov A. 2003. DAS 4.2: New and noteworthy. Technical Report, das42_report.pdf

Vander Zanden J & Rasmussen JB. 1999. Primary consumer $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and the trophic position of aquatic consumers. Ecology 80.

Walters et al. 2015. Nitrogen Isotope Composition of Thermally Produced NO_x from Various Fossil-Fuel Combustion Sources. Env Sci Technol