

Jämförelser av olika kväveisotop-baserade metoder för att bestämma födovävsposition i torsk: betydelse för miljögiftsövervakning

Agnes ML Karlson

Institutionen för ekologi, miljö och botanik
Stockholms Universitet

Avtal 213-19-106

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

E-mail: agnes.karlsson@su.se
or agnes.karlson@su.se
www.su.se/english/profiles/agka0879-1.192788



NATIONELL
MILJÖÖVERVAKNING
PÅ UPPDRAG AV
NATURVÅRDSVERKET

ÄRENDENUMMER NV- 06404-19
AVTALSNUMMER 213-19-106
PROGRAMOMRÅDE Miljögifter akvatiska
DELPROGRAM Utveckling och analys

Jämförelser av olika kväveisotop-baserade metoder för att bestämma födovävsposition i torsk: betydelse för miljögiftsövervakning

Rapportförfattare Agnes Karlsson	Utgivare Institutionen för ekologi, miljö och botanik, SU Postadress Svante Arrhenius väg 21 A, 10691 Stockholm
Rapporttitel och undertitel Jämförelser av olika kväveisotop-baserade metoder för att bestämma födovävsposition i torsk: betydelse för miljögiftsövervakning	Beställare Naturvärdsverket 106 48 Stockholm Finansiering Nationell miljöövervakning
Nyckelord för plats Östersjön, egentliga Östersjön, Gotland, Kvädöfjärden	
Nyckelord för ämne Stabila isotoper av kol och kväve, $\delta^{15}\text{N}$, födovävsposition "trofisk position"	
Tidpunkt för insamling av underlagsdata 1981 - 2019	
Sammanfattning Kväveisotoper ($\delta^{15}\text{N}$) kan ge information om var i födoväven en organism befinner sig. Detta eftersom den tyngre kväveisotopen anrikas likt miljögifter upp i födoväven. Inom miljögiftsövervakningen kan information om födovävsposition hjälpa till att förklara variationer i miljögiftshalter mellan år som inte nödvändigtvis reflekterar förändringar i belastningen. Födovävsposition används även i statusbedömningar av miljögiftshalter som baseras på miljögiftshalter. Beräkningar av födovävsposition kan dock göras på flera sätt med hjälp av $\delta^{15}\text{N}$. Det vanligaste är bulk-analyser av $\delta^{15}\text{N}$ från muskelvävnad i fisk som sedan normaliseras mot samma mätningar i en baslinjeorganism, vanligtvis blåmussla. En nyare metod är att analysera $\delta^{15}\text{N}$ i enskilda aminosyror som extraheras från muskelvävnad i organismen av intresse, t.ex fisk och då behövs inte en baslinjeorganism vilket är praktiskt eftersom dessa inte alltid är tillgängliga från samma plats och tid som fisken provtagits från. Det finns slutligen olika sätt att beräkna födovävsposition enligt aminosyrametoden beroende på vilka aminosyror som används. Denna studie jämför de estimat av födovävsposition som beräknas utifrån bulk-metoden med olika beräkningsvarianter av aminosyra-metoden (olika aminosyror som ingår) och jämför trenderna över tid. Metoderna skiljer sig i både absoluta värden och trender över tid och samtliga aminosyrametoder visar på ökning över tid som inte nödvändigtvis reflekterar en reell ökning av födovävspositionen. Bulk-metoden underskattar istället födovävsposition jämfört med vad som är ekologiskt förväntat, men visar inte på ökning över tid. En av aminosyra-metoderna rekommenderas då de absoluta värdena är närmast födovävsposition 4 som är förväntat för torsk i denna storlek men anledningar till en ökning över tid behöver utredas vidare.	

Det primära syftet för det nationella programmet för miljöövergiftsövervakning är att dokumentera förändringar i miljögiftskoncentrationer över tid och om skillnader mellan områden existerar, samt att bidra med underlag för att kunna bedöma om åtgärder har haft en effekt. Miljögiftshalter i biota påverkas dock inte endast av belastningen till/i miljön utan av biologiska och ekologiska processer. Därför analyseras även biologiska variabler som t.ex. storlek, fetthalt och reproduktionsstatus från indikatorarterna inom övervakningen och sedan 2014 analyseras även muskelvävnad hos djur för stabila isotoper av kol och kväve.

Kol och kväveisotoper (anges i promilleavvikelser från referensvärden, s.k. delta-enheter; $\delta^{13}\text{C}$ och $\delta^{15}\text{N}$) kan ge information om vad organismer har ätit och/eller var de befunnit sig innan insamling. Den tyngre kväveisotopen anrikas likt miljögifter upp i födoväven, generellt med 3,4‰ från diet till konsument, och brukar därför av ekologer användas för att bestämma födovävsposition hos en organism, eftersom exakt diet-data (t.ex. maganalyser) sällan är tillgängligt (särskilt inte från olika säsonger över ett år). Inom miljögiftsövervakningen kan data om födovävsstruktur hjälpa till att förklara variationer i miljögiftshalter mellan år som inte nödvändigtvis reflekterar förändringar i belastningen och således möjliggöra att statistiskt justera tidstrender med variation orsakat av ekologiska skillnader mellan individer. Information om födovävsposition (på engelska trophic position, TP) kan också användas i statusbedömningar av miljögiftshalter som baseras på miljö kvalitetsnormer (s.k. Environmental Quality standards, EQS) som används inom EUs Marina Direktiv (deskriptor 8, farliga ämnen). I den marina miljön anses medelvärdet för toppkonsumenters födovävsposition, härefter TP, vara ungefär 4. Rekommendationen är att justera data till denna TP (för att skydda toppkonsumenter om de är den känsligaste arten) med hjälp av kväveisotop-data, innan en jämförelse med de EQS värden som finns för prioriterade ämnena kan göras (EC 2014).

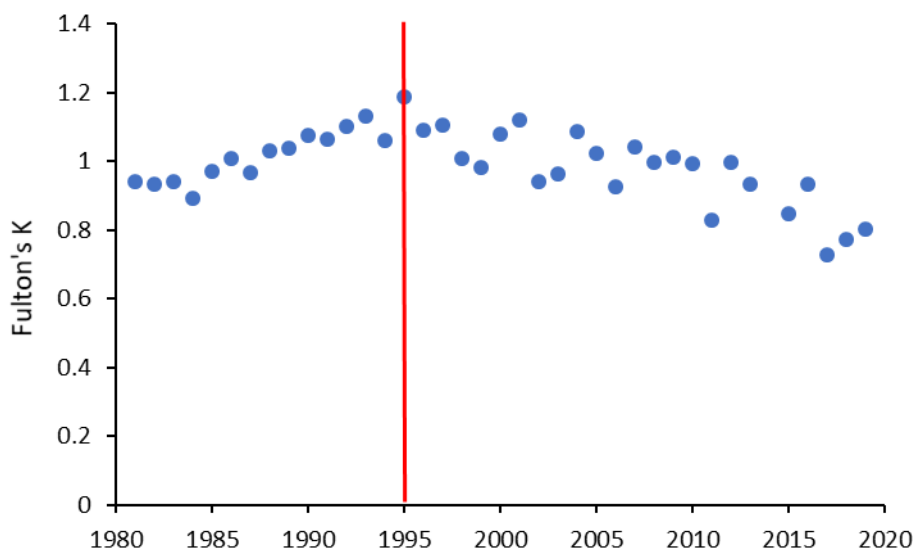
Beräkningar av födovävsposition kan göras på flera sätt med hjälp av stabila kväveisotoper ($\delta^{15}\text{N}$). Det vanligaste är bulk-analyser av $\delta^{15}\text{N}$ från muskelvävnad i fisk som sedan normaliseras mot samma mätningar i en baslinjeorganism, lämpligtvis blåmussla eller andra långlivade, stationära och filtrerande organismer (Vander Zanden & Rasmussen 1999). Det sistnämnda är dock ofta problematiskt eftersom det är viktigt att denna baslinje-organism kommer från samma område, vilket inte alltid är fallet inom olika övervakningsprogram (se NV-rapporten Karlson 2019; endast vid en lokal i Östersjön samlas baslinje-organismer in). En nyare metod är ämnesspecifika isotopanalyser där $\delta^{15}\text{N}$ analyseras i enskilda aminosyror som extraheras från muskelvävnad i organismen av intresse, t.ex. fisk. Eftersom vissa aminosyror inte förändras vad gäller $\delta^{15}\text{N}$ från den ursprungliga kvävekällan medan andra förändras i ett, likt bulkmetoden, förutsägbart sätt (men med större isotop-fraktionering om ca 7‰ gentemot dieten), kan födovävsposition i fisk därmed beräknas utan en fristående baslinje i mussla. Beroende på hur många aminosyror som beräkningen baseras på kan resultaten dock komma att skilja sig, ofta baseras metoden på de aminosyror som är lättast att analysera, fr.a. glutaminsyra (s.k. trofisk aminosyra) och fenylalanin (s.k. ”source”-aminosyra), men nyare studier har visat att ju fler aminosyror som inkluderas desto mer robust blir beräkningen av TP (Nielsen et al 2015). Gemensamt för bulk och aminosyra metoden är att litteraturvärden på den s.k. isotopfraktioneringen mellan diet och konsument (TEF eller trophic enrichment factor) behöver användas i ekvationerna (dvs ca 3,4 som nämnts ovan för bulk-metoden (t.ex. Post 2002) och c.a 7 ‰ för aminosyrametoden (Chikaraishi et al 2009, Nielsen et al. 2015).

Syftet med denna studie var att jämföra de tre $\delta^{15}\text{N}$ -baserade metoderna för att räkna ut födovävsposition, TP, i torsk från Östersjön:

- 1) bulkmetoden med blåmussla som baslinje (Post 2002, Vander Zanden & Rasmussen 1999)
- 2) aminosyrametoden med enbart två aminosyror (Chikaraishi et al 2009), samt med uppdaterade TEF för Glu-Phe (6,7 istället för 7,6; enligt Nielsen et al. 2015).
- 3) aminosyrametoden med nästan alla aminosyror (enligt Nielsen et al. 2015, d.v.s med följande source aminosyror exkluderade; Treonin, Glycin, Seronin och Metionin)

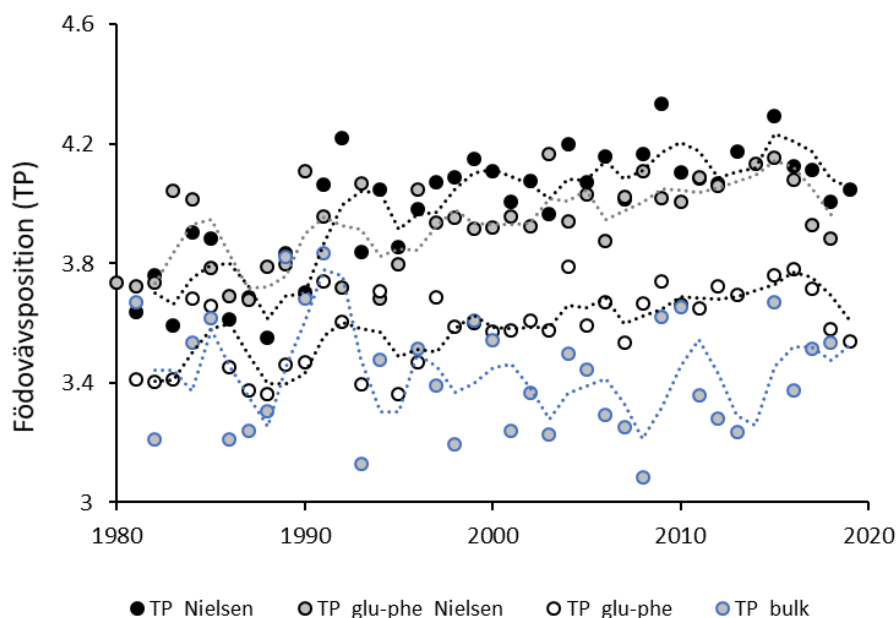
Metod:

Retrospektiva analyser med beräkningar av TP enligt ovan i den 40 åriga tidsserie i torsk insamlad från sydöstra Gotland (poolade prover av muskelvävnad baserat på 10 jämnstora individer om 35 cm för varje år, alltid insamlade i november) används här. Frystorkat material om 3 mg från dessa pooler har skickats till UC Davis Stable Isotope Facility för extraktion av aminosyror följt av $\delta^{15}\text{N}$ -mätningar i de enskilda aminosyrorna. Ekvationerna i Chikaraishi et al. (2009) och Nielsen et al. (2015) har sedan beräknats. Eftersom torsk vid denna storlek framför allt livnar sig på strömning och skarpsill (Neuenfeldt et al 2020) förväntas födovävspositionen att ligga runt 4 för alla metoder. Korrelationer (Kendall-tau) med de tre metoderna utfördes på hela tidsserien, samt en indelning av tidsserien i dålig och god tillväxtperiod för torsk (de första ca 15 resp. de senaste 25 åren) för att jämföra hur robusta TP-estimaterna är mot förändringar i fysiologi/miljöfaktorer under dessa tidsperioder (Fig 1). För torsk saknas år 2014 från miljöövervakningen. Blåmussla (baslinjen) saknas från fem år (1983, 1992, 1995, 2018 och 2019; de senaste två åren är insamlade men av annan storlek än musslorna i denna studie och därför exkluderade i denna analys).



Figur 1. Förändring över tid i konditionsfaktor (Fulton's K) för de torskar som använts i denna studie. Varje datapunkt representerar medelvärdet av 10 individer. Den röda vertikala linjen representerar statistisk brytpunkt vid år 1995 varefter konditionsstatus försämrats för torsken.

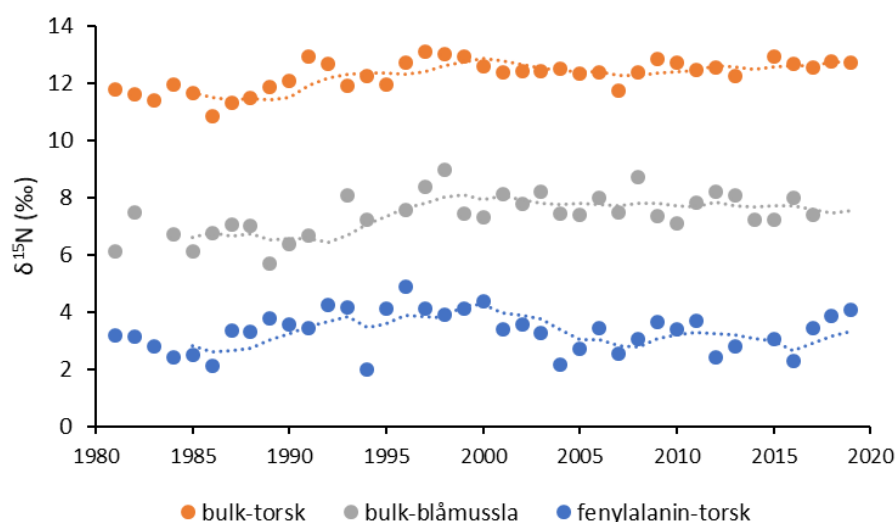
Resultat och diskussion: De olika metoderna resulterade i olika estimat för TP, med högst värden för TP (nära eller högre än 4) för den aminosyrametod som inkluderade nästan alla aminosyror (Nielsen) och lägre än förväntat TP (under 4) för bulk-metoden och för den aminosyrametod som endast använde två aminosyror. Vi testade att också inkludera de fyra source aminosyror som inte användes i Nielsens ekvation med resultatet att TP-värdena blev ännu högre (närmade sig TP 5, dock samma ökning över tid, visas ej i figur). Om TEF (trophic enrichment factor) sätts till 6,7 istället för 7,6 i Glu-Phe metoden (uppdatering enligt Nielsen et al. 2015) så blir värdena mer lika Nielsen-metoden. Att bulkmetoden underskattar TP estimaten kan bero på att baslinjen, blåmusslan, inte fullt ut representerar kväve-baslinjen i utsjön eller att blåmusslan har högre $\delta^{15}\text{N}$ än förväntat för en baslinje. Blåmusslan växer långsamt i Östersjöns bräckta vatten vilket påverkar dess kväveomsättning och kan leda till förhöjda $\delta^{15}\text{N}$ värden (signifikanta samband med $\delta^{15}\text{N}$ och salthalt hos blåmussla, se Karlson 2019).



Figur 2. TP förändring i torsk från Gotland över tid för de olika metoderna. TP med de två aminosyrorerna glutaminsyra och fenylalanin (Glu-Phe) visas både som i originalekvationen (Chikarishi et al. 2009, ofyllda symboler) och med uppdaterad TEF (enligt Nielsen et al. 2015, mörkgrå). Metoden med samtliga (se metod) aminosyror refereras här som TP_Nielsen. Varje datapunkt representerar medelvärdet av 10 jämnstora fullvuxna individer. Trendlinjer visar rullande medelvärde (5 år). Ökningar över tid är signifikanta för aminosyra-ekvationernas estimat (men inte för bulk-ekvationens värden (blågrå symboler), se text för detaljer.

Under hela tidsperioden (1981-2019) så visade de olika aminosyra-metoderna i torsk (Fig 2) signifikanta ökning över tid; TP_glu-phe hade ett tau-värde på 0.39, $p < 0.05$ (samma trend oavsett TEF-värde 7.6 eller 6.7) och TP_Nielsen; tau=0.49, $p < 0.05$. Bulk-TP uträknat från blåmussla som baslinje visade dock ingen ökning (Fig 2, tau= -0.03) trots att rådata för bulk $\delta^{15}\text{N}$ i torsk ökade över tid, eftersom mussel-baslinjen också visade på en ökning över tid (Fig 3; bulk torsk tau=0.41, $p < 0.05$ och blåmussla tau= 0.31, $p < 0.05$). Enligt maganalyser på torsk i denna storleksklass (ca 35 cm) har det inte skett några

betydande förändringar i bytessammansättningen vad gäller bottenfauna och fisk under denna tidsperiod (Neuenfeldt et al 2020). Andelen skarpsill i dieten hos torsk ökade under 90-talet (medan strömmingsbiomassan var relativt konstant) men borde inte resulterat i högre TP eftersom skarpsill är en utpräglad planktivor fisk (TP=3) medan strömming är mer omnivor med aningen högre TP än skarpsill. Kannibalism är mycket ovanlig i torsk och bör inte heller förklara de ökningarna som ses i aminosyrametodernas TP samt i rådatat för bulk $\delta^{15}\text{N}$ (Fig 3, trenden i bulk TP blir oförändrad över tid eftersom även baslinjen ökar, Fig 2). Det ska dock tilläggas att maganalyser inte nödvändigtvis kan utgöra facit på årsbasis eftersom maganalyser representerar dieten endast vid insamlingstillfället (som görs en gång per år, Neuenfeldt et al 2020) medan isotopsammansättningen representerar en längre tidsperiod (sensommar-höst i miljöövervakningen).



Figur 3. Rådata $\delta^{15}\text{N}$ under tidsperioden 1981-2019 för "source" aminosyran fenylalanin samt i bulk $\delta^{15}\text{N}$ för både torsk och blåmussla (se Karlson 2019 för mer information om blåmussla). Trendlinjer är rullande medelvärden (5 år). Baserat på icke-parametrisk Mann-Kendall test ökar $\delta^{15}\text{N}$ över hela tidsperioden i bulk-blåmussla och bulk-torsk men inte i source-aminosyran fenylalanin i torsk (se text). Varje datapunkt representerar medelvärdet av 10 individer för torsk eller 5 för mussla.

Oavsett tidsperiod undersökt (hela, den första eller den senaste när torsken hälsa försämrades, se Figur 1) så korrelerade de olika aminosyrametoderna (baserat på två eller alla aminosyror) signifikant med varandra ($\tau=0,51-0,58$, $p<0,05$). Rådata bulk $\delta^{15}\text{N}$ korrelerade med aminosyra-metodernas TP värden under hela eller första tidsperioden ($\tau=0,40-0,58$, $p<0,05$), men inte under den senaste tidsperioden ($\tau<0,16$). Bulk-metodens TP estimat korrelerade aldrig med aminosyrornas estimat ($\tau<0,17$), oavsett tidsperiod (däremot negativt med sin baslinje och positivt med bulkrådatat). Det är välkänt att fysiologisk status påverkar TEF-värden (Martinez del Rio & Wolf 2005) och det är inte omöjligt att dessa TEF inte varit konstanta över tid för vare sig torsk eller dess bytesdjur (tex strömming har också haft en längre period med försämringar i konditionsstatus, ex Casini et al. 2010) vilket direkt påverkar TP-estimatet. Metoden som använder sig av alla aminosyror (Nielsen et al. 2015) visar på starkast ökning över tid, vilket kan tänkas bero på att en del aminosyror reagerar tydligare mot ex. svält eller stress och att sådana aminosyror behöver exkluderas från ekvationen. Mer studier behövs som identifierar sådana aminosyror (Karlson et al 2021).

Slutsatser: Baserat på resultaten i denna studie rekommenderas att Chikaraishi-metoden med två aminosyror, Glu och Phe, men med uppdaterad TEF (Nielsen et al. 2015) används för EQS korrigeringar snarare än bulk metoden eller metoden som inkluderar alla aminosyror, men att resultaten måste tolkas med försiktighet; en ökning över tid kunde ses för Glu-Phe men ökningen var mer markant över tid när alla aminosyror användes i Nielsen-ekvationen (högre tau-värde). Kostnaden för ämnesspecifika isotopanalyser är ungefär 10 gånger högre än bulk-metoden; analyser av bulk isotoper av $\delta^{13}\text{C}$ och $\delta^{15}\text{N}$ (analyseras tillsammans) kostar drygt 70 kr per prov vid UC Davis Stable Isotope Facility men det behövs utöver fiskprov också prov av baslinjen (ex blåmussla från samma region och provtagningsstillfälle) vilket dubblar antalet prover för analys inklusive arbetskostnad för provberedning och insamling. Ett prov för $\delta^{15}\text{N}$ -aminosyror kostar drygt 1500 kr (valuta 1 USD = 9 SEK) men utförs i dagsläget kommersiellt endast vid UC Davis Stable Isotope Facility.

Erkännanden:

Per-Arvid Berglund (förste assistent vid Naturhistoriska riksmuseet) och Victoria Engström (examensarbetare vid Stockholms Universitet) förberedde alla torskprover för analys (dissektion, frystorkning och invägning).

Referenser:

Casini, M., V. Bartolino, J. C. Moliniero, and G. Kornilovs. 2010. Linking fisheries, trophic interactions and climate: Threshold dynamics drive herring *Clupea harengus* growth in the central Baltic Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 413: 241–252.

Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. and N. Ohkouchi. 2009. Determination of aquatic food-web structure based on compound specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr: Methods* 7: 740–750.

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

Karlson AML 2019. Temporala och spatiala trender i föreslagna baslinjeorganismer för implementering av stabila isotoper i miljögiftsövervakningen. Sakrapport NV avtal 213-18-025

Karlson AML, EK C, Jones D. Trophic position derived from amino-acid nitrogen isotopes reflect physiological status of both predator and prey over four decades. bioRxiv doi:

Martínez del Río, C. and B. O. Wolf. 2005. Mass-balance models for animal isotopic ecology. In *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (Starck, M. J., Wang, T., Eds.). Science Publishers: Enfield, New Hampshire, chap. 6, 141-174 pp.

Neuenfeldt, S., Bartolino, V., Orio, A., Andersen, K. H., Andersen, N. G., Niiranen, S., Bergström, U., Ustups, D., Kulatska, N., and Casini, M. 2020. Feeding and growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in the eastern Baltic Sea under environmental change. *ICES J Mar Sci.* 77: 624–632. doi:10.1093/icesjms/fsz224

Nielsen, J. M., Popp, B. N. and M. Winder 2015. Meta-analysis of amino acid stable nitrogen isotope ratios for estimating trophic position in marine organisms. *Oecologia* 178: 631–642.

Post, D. M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology* 83 (3), 703–718.

Vander Zanden, M. J. and J. B. Rasmussen 1999. Primary consumer delta C-13 and delta N-15 and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80 (4), 1395–1404.