

Mot tillförlitlig bedömning av livsduglighet hos motståndskraftiga livsstadier av ryggradslösa djur i barlastvatten

Elena Gorokhova, Pia Haecky,
Rehab El-Shehawy, Nick Blackburn,
Sandra Luecke-Johansson,
Elina Viinamäki



Mot tillförlitlig bedömning av livsduglighet hos motståndskraftiga livsstadier av ryggradslösa djur i barlastvatten

av Elena Gorokhova, Pia Haecky, Rehab El-Shehawy, Nick Blackburn,
Sandra Luecke-Johansson och Elina Viinamäki

Naturvårdsverket

Tel: 010-698 10 00

E-post: registrator@naturvardsverket.se

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-7185-1

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2026

Grafisk produktion: Arkitektkopia AB, Bromma 2026

Omslagsfoto: Elena Gorokhova

Förord

I denna rapport redovisas resultaten från projektet *Mot tillförlitlig bedömning av livsduglighet hos motståndskraftiga livsstadier av ryggradslösa djur i barlastvatten*.

Genom denna satsning ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten, i samverkan med Formas och Trafikverket, stärka forskningen om bekämpning och hantering av invasiva främmande arter. Syftet var att ta fram ny kunskap om hur dessa arter kan hanteras samt att utveckla nya eller förbättrade metoder för att förhindra, begränsa och kontrollera deras introduktion och spridning i den naturliga miljön. Utlysningen var särskilt inriktad mot invasiva främmande landväxter och invasiva främmande vattenlevande djur.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag och Formas.

Rapporten har författats av Elena Gorokhova, Rehab El-Shehawy, Sandra Luecke-Johansson och Elina Viinamäki vid Stockholms universitet samt av Pia Haecky och Nick Blackburn vid MicroWISE.

Rapporten har granskats av Matthias Obst, Göteborgs universitet, med avseende på vetenskaplig kvalitet, och av Fredrik Lindgren, Havs- och vattenmyndigheten, med avseende på praktisk relevans.

Författarna ansvarar för rapportens innehåll.

Stockholm, maj 2026

Marie Uhrwing

Avdelningschef, Avdelningen för samordning, regeringsuppdrag
och internationellt samarbete

Innehåll

Förord	3
Ordlista och förkortningar	9
Sammanfattning	11
Summary	12
1. Inledning	13
1.1 Barlastvatten som spridningsväg för invasiva främmande arter	14
1.2 Hamnstatskontroll	14
1.3 BallastWISE-instrumentet och dess detektionsprinciper	15
1.3.1 Instrumentets egenskaper och analysprincip	15
1.4 Nuvarande metoder för bedömning av livskraft	16
1.5 Icke-rörliga livsstadier: egenskaper och utmaningar vid bedömning av livskraft	16
1.6 Kunskapsluckor och projektets mål	17
2. Material och metoder	18
2.1 Val av arter och försöksmaterial	18
2.2 Metoder för att identifiera livskraftiga organismer	20
2.2.1 Metoder utan infärgning	20
2.2.2 Infärgningsbaserade metoder	24
2.3 Provberedning för att öka integumentets permeabilitet	28
2.3.1 Kemiska och fotokemiska behandlingar	30
2.3.2 Fysiska behandlingar	30
2.3.3 Bedömning av strukturella och kemiska förändringar i integumentet	31
2.4 Utvärdering av färgämnenas effektivitet i BallastWISE	31
2.5 Dataanalys	33
3. Resultat	34
3.1 Sammanfattning av de viktigaste resultaten	34
3.2 Ökad permeabilitet i integumentet	36
3.2.1 FTIR-analys av förändringar i integumentet	36
3.2.3 Fysiska och kombinerade behandlingar	40
3.3 Utvärdering av infärgningseffektivitet	41
3.3.1 Vitala färgämnen	41
3.3.2 Dödcells-färgämnen	46
3.4 Jämförelse med BallastWISE-systemet	49
3.4.1 Instrumentanpassningar som genomfördes inom VIABLEGG-projektet	49
3.4.2 Färgämnenas prestanda i BallastWISE-utvärderingarna	50
4. Slutsatser och rekommendationer	54
4.1 Behovet av vitala färgämnen för att uppfylla kraven i regel D-2	55
4.2 Särskilda rekommendationer	55
4.2.1 För forskning	56
4.2.2 För hamnstatskontroll av barlastvatten	56
4.2.3 För regulatoriska myndigheter	57

5.	Tack	58
6.	Källor	59
7.	Publikationer och datatillgänglighet	62
7.1	Vetenskapligt granskade publikationer	62
7.2	Masteruppsatser	62
7.3	Vetenskapliga konferensbidrag	62
7.4	Presentationer för intressenter	62
7.5	Öppet tillgängliga data	63

Tabeller

Tabell 1. Översikt över projektets metodik, målorganismer och genomförda tester	21
Tabell 2. Översikt över integumentens morfologi och sammansättning samt utmaningar vid infärgning för utvalda taxa	21
Tabell 3. Inkubationsförhållanden och inkubationstider för kläckning av rotatorien <i>Brachionus plicatilis</i> , calanoiden <i>Acartia tonsa</i> och harpacticoiden <i>Nitocra spinipes</i>	23
Tabell 4. Lista över de livskraftsindikatorer/färgämnen och färgämnestyper (vitala/dödcells-färgämnen: V resp. D) som testades i studien	27
Tabell 5. Sammanfattning av färgämnenas prestanda vid livskraftsbedömning, baserad på de experimentella resultaten. Tabellen visar typ, verkningsmekanism, taxa där metoden fungerade, styrkor och begränsningar för de färgämnen (D: dödcells-färgämnen och V: vitala färgämnen) som testades för att bedöma livskraft hos icke-rörliga livsstadier hos ryggradslösa djur, med fokus på äggsäckar, embryon och veligerlarver. Endast färgämnen med resultat som bedömdes motivera fortsatt undersökning ingår	35
Tabell 6. Sammanfattning av färgämnenas prestanda för olika äggtyper, baserad på de experimentella resultaten. Tabellen lyfter fram taxa, typ av stadium och de utmaningar som identifierades i studien. Endast färgämnen med resultat som bedömdes motivera fortsatt undersökning ingår	35
Tabell 7. Dödlighet (%) hos ägg/ephippior samt motsvarande 50-procentig letalitet (LC50, mediandödlig dos) hos olika arter efter permeabiliserande behandling av integumentet med kitinas (1 eller 5 mg/mL) och NaOH (0,1 %) 40	40
Tabell 8. Syra- och trypsinbehandlingar förbättrade endast färgämnenas penetration i begränsad utsträckning, med upptag under 15 % för dödcells-färgämnen och under 8 % för vitala färgämnen. Med tanke på den låga effektiviteten jämfört med övriga testade metoder fördes dessa behandlingar inte vidare i det experimentella arbetet	40
Tabell 9. Infärgningseffektivitet för TO-PRO-1-jodid i testprover med värme-avdödade hoppkräftor (Döda; 100 %), kontrollprover (Levande; 100 %) samt ett blandprov bestående av 50 % levande och 50 % döda individer. Utfallet av infärgningen angavs som andelen individer (%) med tydlig, starkt grön fluorescens	47

Figurer

- Figur 1.** Exempel på ägg- och embryonala stadier hos ryggradslösa djur som ofta förekommer i barlasttankar och återfinns både i storleksfraktionen 10–50 µm och i fraktionen > 50 µm 13
- Figur 2.** Bildanalys och rörelsedetektering av enskilda organismer används för att bestämma antalet rörliga organismer genom videoanalys samt antalet organismer som uppvisar aktiv fluorescens (excitation: 420 nm; högpassfilter: 590 nm) 15
- Figur 3.** Fluorescensmikroskopiska bilder som visar inkapslade *Artemia*-ägg (vänstra panelerna) och inkapslade, hydratiserade ägg efter 48 timmars hydrering (högra panelerna). De övre panelerna visar äggen utan infärgning, där äggskalets autofluorescens är tydlig. De nedre panelerna visar ägg som färgats med CFDA. Resultaten visar både äggskalets autofluorescens och den begränsade inträngningen av färgämnet i äggets inre 29
- Figur 4.** Detta allmänna arbetsflöde integrerar kläckningsförsök för att fastställa andelen livskraftiga ägg som det slutliga måttet på mortalitet, behandlingar för att öka permeabiliteten (kemiska och/eller fysikaliska), samt FTIR-analys för att visa de övergripande molekyllära förändringarna i provet efter behandling. Arbetsflödet användes för att utvärdera behandlingens effektivitet 29
- Figur 5.** Fluorescensfärgning av hela kroppen och ägg hos *Daphnia magna* (levande, färgad med CFDA) och *Nitocra spinipes* (död, färgad med TO-PRO-1-jodid) 32
- Figur 6.** FTIR-spektra som visar effekterna av kemiska behandlingar på integumentet hos diapauseägg av *Cercopagis pengoi* 37
- Figur 7.** LED-assisterad dekapsulering av *Artemia*-cystor som visar att chorion avlägsnades framgångsrikt efter behandlingen. De dekapsulerade cystorna uppvisade hög autofluorescens vid fluorescensmikroskopi, vilket försvårade en korrekt bedömning av färgupptaget 39
- Figur 8.** Dekapsulerade *Artemia*-ägg färgade med CFDA (vitalt färgämne; övre panelerna) och TO-PRO-1-jodid (dödcellsfärgämnen; nedre panelerna) 39
- Figur 9.** Hoppkräftor *Nitocra spinipes* (honor med äggsäckar), färgade med CFDA i hög respektive låg koncentration 42
- Figur 10.** Embryon av vitmärlan *Monoporeia affinis*, extraherade från marsupiet, färgades med TO-PRO-1-jodid (övre panelen) och CFDA (mellersta panelen) 43
- Figur 11.** Kläckningsgrad för *Nitocra spinipes*-ägg samt andel normala embryon hos *Monoporeia affinis* i kontrollprover och efter värmebehandling 44
- Figur 12.** ATP-nivåer i ägg och embryon från *Nitocra spinipes*, *Monoporeia affinis*, *Brachionus plicatilis* och *Cercopagis pengoi* i kontrollprover och behandlade prover 45
- Figur 13.** Neutralrött som indikator på livskraften hos veligerlarver av musslor. Levande veligerlarver (vänstra kolumnen) uppvisar tydlig infärgning med neutralrött, medan döda veligerlarver (högra kolumnen) saknar motsvarande infärgning 45

- Figur 14.** Misslyckad infärgning av ägg med intakta integument. Kontrollproverna har inte utsatts för någon behandling. Behandlade prover har avdödats med värme 46
- Figur 15.** Hoppkräftor *Nitocra spinipes* (honor med äggsäckar), färgade med TO-PRO-1-jodid i olika koncentrationer. Kontrollproverna utgjordes av levande honor från kulturen, medan de behandlade proverna bestod av värmeavdödade individer som exponerats i 3 minuter vid 90 °C i vattenbad. Den optimala testkoncentrationen var 1 µM, vilket framgår av den starka och jämna fluorescensen, medan de levande kontrollerna uppvisade endast minimal infärgning vid samtliga testade koncentrationer 48
- Figur 16.** Infärgningen med TO-PRO-1-jodid i kontrollproverna (levande honor med äggsäckar) var signifikant lägre än i de värmeavdödade honorna och skilde sig statistiskt inte från autofluorescensen hos de ofärgade individerna, oavsett deras livskraftstatus 48
- Figur 17.** Infärgning av värmeavdödade (behandlade) och levande (kontroll) *Nitocra spinipes* samt *Brachionus plicatilis* med 5 % Anilinblått 49
- Figur 18.** Relativ fluorescensintensitet (x-axeln) för de testade färgämnen (Anilinblått, CFDA och TO-PRO-1-jodid) applicerade på prover med hoppkräftor och hinnkräftor samt för ofärgade prover (det vill säga autofluorescens) 52
- Figur 19.** Hjuldjursägg färgade med TO-PRO-1 och avbildade i mikroskop med olika filter för att tydliggöra infärgningsmönstret 52
- Figur 20.** Levande och döda djurplanktonindivider (*Nitocra spinipes*, *Daphnia magna* och en blandning av dessa) färgade med CFDA, TO-PRO-1-jodid eller Anilinblått samt motsvarande ofärgade kontroller, tagna med BallastWISE-systemet 53

Ordlista och förkortningar

Term/förkortning	Förklaring
amiktiska ägg	Ägg hos rotatorier som utvecklas utan befruktning och normalt ger upphov till honor.
ATP	Adenosintrifosfat. En energibärare i levande celler. ATP används som ett indirekt mått på biologisk aktivitet.
autofluorescens	Naturlig fluorescens från organismer eller provmaterial utan tillsatt färgämne.
BWMC	Ballast Water Management Convention. Internationell konvention om hantering av fartygs barlastvatten och sediment.
CMD	Compliance Monitoring Device. Utrustning som används för att kontrollera om barlastvatten uppfyller regelverkets krav.
D-2	Den regel i barlastvattenkonventionen som anger högsta tillåtna mängd livskraftiga organismer i utsläppt barlastvatten.
diapauseägg	Vilägg som befinner sig i ett utvecklingsstopp och kan överleva länge under ogynnsamma förhållanden.
dödcellsfärgämne	Färgämne som främst tas upp av döda eller skadade celler och därför används för att påvisa icke livskraftigt material.
ephippium	Skyddande struktur hos vissa hinnkräftor som omsluter vilägg.
fluorofor	Ämne som kan avge fluorescens.
FTIR	Fouriertransformerad infraröd spektroskopi. Metod som används för att undersöka kemisk sammansättning och struktur i material.
HELCOM	Helsingforskommissionen. Internationellt samarbete för skydd av Östersjöns marina miljö.
holoplankton	Organismer som lever hela sitt liv som plankton.
högpasfilter	Optiskt filter som släpper igenom ljus över en viss gräns.
ICES	International Council for the Exploration of the Sea. Internationellt vetenskapligt samarbete kring hav och marina resurser.
IMO	Internationella sjöfartsorganisationen. FN-organ med ansvar för internationella regler för sjöfart.
integument	Yttre skyddande hölje eller skal kring ett ägg, embryo eller annan organism.
jonkanal	Protein i cellens yttre gräns som släpper igenom vissa joner.
kitin	Starkt biologiskt material som bland annat finns i skal och skyddande strukturer hos många ryggradslösa djur.
kitinas	Enzym som bryter ned kitin.

Term/förkortning	Förklaring
LC50	Den nivå av en behandling eller exponering där 50 procent av de testade organismerna dör.
LED	Lysdiod. Används som ljuskälla vid optisk analys och vissa behandlingar.
meroplankton	Organismer som bara lever en del av sitt liv som plankton, ofta under larvstadiet.
MFA	Motility and Fluorescence Assay. Metod som kombinerar registrering av rörelse och fluorescensanalys.
miktiska ägg	Ägg hos rotatorier som ingår i den sexuella delen av livscykeln. Om de befruktas kan de utvecklas till vilägg.
mikrovågsbehandling	Behandling med korta pulser av mikrovågor för att påverka strukturen i ett prov.
NRU	Neutral Red Uptake. Metod där neutralrött används för att bedöma cellers förmåga att ta upp och behålla färgämnet.
PBS	Phosphate-buffered saline. Buffrad saltlösning som används vid laboratoriearbete.
permeabilitet	Genomtränglighet. Anger hur lätt ämnen kan passera genom ett material eller hölje.
proxyvariabel	Indirekt mått som används för att uppskatta något som inte mäts direkt.
quiescent	Vilande tillstånd med låg aktivitet, men inte nödvändigtvis full diapause.
RLU	Relative Luminescence Units. Relativt mått på ljusstyrka i en bioluminiscensanalys.
ROI	Region of Interest. Utvalt område i en bild som analyseras särskilt.
sonikering	Behandling med ultraljud för att påverka material eller biologiska strukturer.
subitanägg	Ägg som utvecklas direkt utan längre viloperiod.
veligerlarv	Tidigt larvstadium hos musslor och andra blötdjur.
vitalt färgämne	Färgämne som används för att påvisa levande eller biologiskt aktiva celler.

Sammanfattning

Utsläpp av barlastvatten är en viktig spridningsväg för invasiva vattenlevande arter globalt och medför betydande ekologiska och ekonomiska risker. För att minska denna risk har den internationella barlastvattenkonventionen införts. Inom ramen för konventionen ställer regel D-2 tydliga krav på hur många livskraftiga organismer som får förekomma i barlastvatten vid utsläpp. Att kontrollera efterlevnaden av dessa krav är dock tekniskt krävande, särskilt när det gäller att bedöma livskraften hos icke-rörliga livsstadier, såsom evertebratägg, bottenlevande larver och vilstadier.

Detta högriskprojekt med stor potential syftade till att utveckla en tillförlitlig och generellt användbar metod för livskraftsanalyser av arter med olika typer av ägg och äggskal. Projektet visade emellertid, trots omfattande insatser, att det inte är realistiskt att nå en universellt tillämpbar metod med den ansats som prövades. De stora skillnaderna mellan olika äggskals uppbyggnad och den låga metaboliska aktiviteten hos många icke-rörliga livsstadier innebar grundläggande begränsningar för de tekniker som undersöktes.

Även om projektet inte resulterade i en metod som fungerar brett för alla arter och livsstadier, gav det viktiga resultat för vissa organismgrupper. Projektet visade att några av de testade metoderna kan användas för att bedöma livskraften hos specifika grupper, exempelvis hoppkräftor och mussellarver. Samtidigt tydliggjorde resultaten de metodologiska hinder som finns för att utveckla en generellt tillämpbar metod för icke-rörliga livsstadier. Att systematiskt identifiera både möjligheter och begränsningar är i sig ett viktigt bidrag, eftersom det ger bättre förutsättningar för fortsatt metodutveckling och för mer riktade lösningar anpassade till olika organismgrupper.

Rapporten sammanfattar de viktigaste erfarenheterna från projektet, belyser begränsningarna i dagens metoder för bedömning av livskraft och pekar på möjligheterna med mer riktade angreppssätt som anpassas till specifika arter eller livsstadier. På så sätt bidrar resultaten till en fördjupad förståelse av de utmaningar som är kopplade till hantering av barlastvatten och till utvecklingen av metoder för tillsyn och regeluppföljning. Även om någon generell lösning inte kunde presenteras innebär resultaten ett viktigt steg mot bättre regulatorisk praxis och minskad ekologisk risk vid utsläpp av barlastvatten.

Summary

The discharge of ballast water serves as a critical vector for the global spread of aquatic invasive species, presenting ecological and economic challenges. The International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments (BWMC) was established to mitigate this risk by regulating ballast water treatment. Regulation D-2 under the BWMC sets strict limits on the concentration of viable organisms in ballast water at discharge. While compliance with these standards is essential, it presents significant technical challenges, particularly for the viability assessment of non-motile life stages such as invertebrate eggs, benthic larvae, and dormant stages.

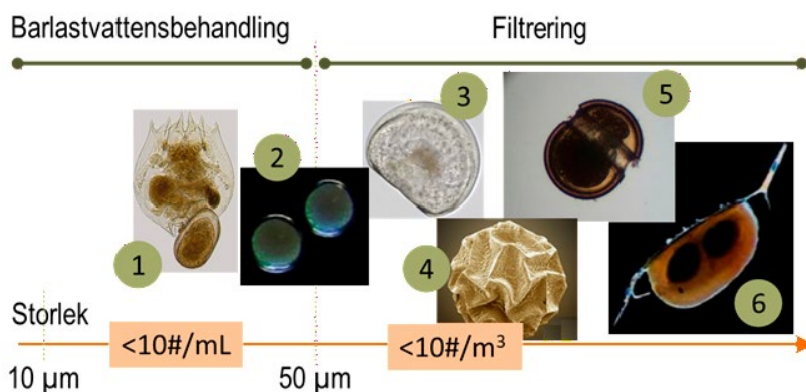
This high-risk, high-gain project aimed to develop a reliable and universally applicable method for viability analysis across diverse species and egg morphologies. However, despite extensive efforts, the project revealed that achieving such a universal method with the proposed approach is unfeasible. The complexity of the diverse integuments and low metabolic activity of non-motile life stages posed insurmountable challenges for the techniques explored.

While a universally suitable method was not achieved, the project provided valuable insights into the methodological barriers and highlighted critical areas for further exploration. Documenting these challenges is an essential contribution to the field, as it helps refine future approaches and directs efforts toward more feasible solutions.

This report captures the lessons learned, the limitations of current viability assessment methods, and the potential for targeted methodologies that focus on specific life stages or species. By doing so, it advances the understanding of ballast water management challenges and informs the development of compliance tools. These findings, while not delivering a universal solution, represent a significant step toward improving regulatory practices and mitigating the ecological risks of ballast water discharge.

1. Inledning

Introduktion av invasiva främmande arter i akvatiska miljöer till följd av mänskliga aktiviteter, särskilt genom utsläpp av barlastvatten, är en av de mest angelägna utmaningarna för akvatiska ekosystem globalt (Bailey, 2015). Dessa arter transporteras mellan världens havs- och sötvattensystem, där de kan påverka den inhemska biologiska mångfalden, förändra näringsvävar och ge upphov till betydande ekonomiska kostnader genom effekter på fiske, vattenbruk och infrastruktur (Crespo m.fl., 2017). Frågan har uppmärksammats som ett allvarligt miljöhot och har lett till internationella åtgärder inom Internationella sjöfartsorganisationen (IMO), som verkar för att minska dessa risker genom reglering av utsläpp av livskraftiga organismer i barlastvatten. Att uppfylla IMO:s nuvarande krav är dock fortfarande en stor utmaning på grund av de komplexa biologiska egenskaperna hos de organismer som förekommer i barlastvatten, särskilt icke-rörliga livsstadier hos ryggradslösa djur, vilka uppvisar en påtaglig motståndskraft mot traditionella metoder för livskraftsbedömning och behandlingsprotokoll (Bradie m.fl., 2018).



Figur 1. Exempel på ägg- och embryonala stadier hos ryggradslösa djur som ofta förekommer i barlasttankar och återfinns både i storleksfraktionen 10–50 µm och i fraktionen > 50 µm. 1: rotatorieägg (fästade vid honan), 2: hoppkräftägg, 3: mussellarv (veliger), 4: räkcysta, 5: vilägg från fiskkrokshinnkräfta och 6: ephippium från hinnkräfta. Vid typisk behandling av barlastvatten avlägsnas större partiklar i ett första filtreringssteg. Filtreringens effektivitet försämrats dock ofta vid hög turbiditet, och många organismer som är > 50 µm passerar därför genom filtren. Notera de komplexa integumentstrukturerna, som både ökar dessa livsformers motståndskraft och försvårar livskraftsbedömningen.

Ryggradslösa djur hör till de viktigaste organismgrupperna som transporteras via barlastvatten, vilket innehåller biologiskt material som fartyg tar in och senare släpper ut. Detta material omfattar ofta bakterier, alger och olika djur, såsom ägg, cystor och larver av ryggradslösa djur. När dessa organismer introduceras i nya miljöer kan de orsaka betydande ekologiska problem. Det är särskilt anmärkningsvärt att sex av de tio mest oönskade invasiva arter som identifierats av IMO är ryggradslösa djur. De flesta ryggradslösa djur har likartade livscyklar som vanligtvis omfattar planktoniska stadier såsom ägg, larver eller vilstadier, och hos 85 % av de bottenlevande arterna ingår ett pelagiskt larvstadium. Dessa planktoniska stadier

är tillräckligt små för att passera genom fartygens intagspumpar för barlastvatten och är samtidigt evolutionärt anpassade till att överleva under ogynnsamma förhållanden (figur 1).

1.1 Barlastvatten som spridningsväg för invasiva främmande arter

Utsläpp av barlastvatten är en central åtgärd för att stabilisera fartyg under resa. Samtidigt innebär denna process att vattenlevande organismer oavsiktligt flyttas mellan olika ekosystem, vilket underlättar introduktion av arter som kan påverka lokal biologisk mångfald, ekonomi och folkhälsa negativt. För att möta dessa risker antog IMO 2004 barlastvattenkonventionen (Ballast Water Management Convention, BWMC), som syftar till att minska de ekologiska riskerna med barlastvatten genom att ställa långtgående krav på behandling och utsläpp, särskilt genom regel D-2. Denna regel anger specifika gränsvärden för livskraftiga organismer i utsläppt barlastvatten (Drake m.fl., 2014): högst 10 livskraftiga organismer per kubikmeter för organismer med en storlek på $\geq 50 \mu\text{m}$ och högst 10 livskraftiga organismer per milliliter för organismer i storleksintervallet 10–50 μm (figur 1). Det är emellertid förenat med betydande svårigheter att tillämpa dessa krav inom hamnstatskontrollen (Port State Control, PSC), särskilt när det gäller bedömning av organismers livskraft (First m.fl., 2022).

1.2 Hamnstatskontroll

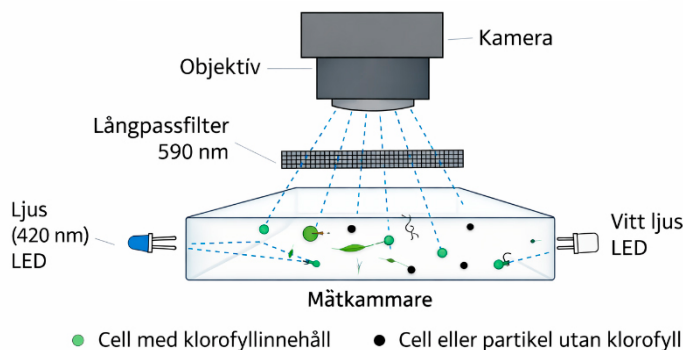
Hamnstatskontrollens förfaranden för hantering av barlastvatten syftar till att verifiera att fartyg följer internationella regelverk, särskilt regel D-2 i barlastvattenkonventionen (BWM Convention), som anger gränsvärden för koncentrationen av livskraftiga organismer i utsläppt barlastvatten. Denna verifiering bygger på snabb analys av prover, som måste kunna genomföras inom några få timmar. För detta ändamål används certifierade protokoll och utrustning för efterlevnadskontroll (Compliance Monitoring Devices, CMD), såsom BallastWISE (Microwise, Danmark), Ballast-Check 2 (Turner Designs, USA) och Bleta-QUA ATP (LuminUltra, Kanada), för att påvisa och kvantifiera livskraftiga organismer. Det kvarstår dock tekniska utmaningar när livskraft ska bedömas under fältförhållanden och för en stor variation av organismer. Utifrån utvärderingar av vanligt förekommande CMD-system framstår BallastWISE som ett av de mest lovande systemen för hamnstatskontroll av barlastvatten (Romero-Martínez m.fl. 2024). Till skillnad från metoder som bygger på biomassabaserade proxyvariabler ger systemet både bildbaserad och fluorescensbaserad information, vilket gör det särskilt väl lämpat för att bedöma infärgning av specifika objekt, såsom ägg.

1.3 BallastWISE-instrumentet och dess detektionsprinciper

BallastWISE-systemet utgör ett betydande steg framåt för kontroll av efterlevnaden av regel D-2, genom att kombinera analys av rörelse och fluorescens (Motility and Fluorescence Assay, MFA) för att uppskatta förekomsten av levande organismer i storleksfraktionerna 10–50 µm och > 50 µm med hjälp av bildanalys. Systemet registrerar rörelse för att identifiera aktiva organismer och använder fluorescensanalys för autotrofa organismer eller organismer som märkts med specifika fluorescerande prober. Systemets flexibilitet gör att det även skulle kunna användas för att identifiera livskraftiga ägg, bottenlevande larver och vilstadier, vilket gör det till ett mångsidigt verktyg för barlastvattenhantering inom de storskaliga analysmetoder som krävs vid hamnstatskontroll.

1.3.1 Instrumentets egenskaper och analysprincip

BallastWISE-systemet bygger på MFA-metoden (Motility and Fluorescence Assay) (Blackburn m.fl., 2022; Holmstrup m.fl., 2020). Det optiska systemet består av en kamera, ett objektiv, lysdioder (LED) och en optisk kammare (figur 2). Denna uppställning möjliggör detektion och avbildning av organismer genom att utnyttja autofluorescens hos klorofyllinnehållande plankton samt riktad fluorescensinfärgning.



Figur 2. Bildanalys och rörelsedetektering av enskilda organismer används för att bestämma antalet rörliga organismer genom videoanalys samt antalet organismer som uppvisar aktiv fluorescens (excitation: 420 nm; högpasfilter: 590 nm).

Storleken på varje organism mäts och bearbetas med särskilt utvecklad programvara.

Klorofyll a i enskilda celler detekteras genom att ljuskällan växlas till en våglängd på 420 nm, vilket stimulerar fluorescens. Ett högpasfilter på 590 nm är placerat framför kameran för att säkerställa att endast fluorescensemissioner registreras av sensorn, vilket gör det möjligt att avbilda fluorescensintensitet på pixelnivå. Koncentrationen av livskraftiga plankton beräknas därefter genom direkt partikelräkning, baserad på en jämförelse mellan autofluorescensintensitet och storlek (Blackburn m.fl., 2022).

1.4 Nuvarande metoder för bedömning av livskraft

I samband med analys av äggs livskraft avser livskraft ett äggs eller en cystas förmåga att utvecklas vidare till ett livsdugligt embryo, vilket innebär att det har den fysiologiska integritet och metaboliska aktivitet som krävs för normal utveckling. De metoder som i dag används för att bedöma livskraft hos organismer i barlastvatten kan i stora drag delas in i detaljerade analyser och indikativa analyser, vilka har olika användningsområden och begränsningar.

Detaljerade analyser, exempelvis mikroskopi, bygger på direkt observation av organismer för att identifiera tecken på liv, såsom rörelse eller bibehållen cellulär integritet. Några centrala metoder är:

- **Mikroskopisk observation av rörelse:** effektiv för rörliga stadier men olämplig för icke-rörliga ägg och cystor.
- **Infärgning med fluoroforer:** livskraftsindikatorer som fluoresceindiacetat (FDA) och 5-klormetylfluoresceindiacetat (CMFDA) används för att bedöma membranintegritet, men fungerar dåligt när skyddande höljen är ogenomträngliga.
- **Cellnedbrytningsanalyser:** livskraft bedöms indirekt genom analys av nedbrytningsprodukter, men metoden har låg specificitet för icke-rörliga stadier.

Dessa metoder ger hög precision men är tidskrävande och resursintensiva samt förutsätter både expertkunskap och specialiserad utrustning. Det begränsar deras användbarhet vid rutinmässig kontroll av efterlevnad inom hamnstatskontroll.

Indikativa analyser ger snabbare bedömningar av livskraft. De är utvecklade för användning i fält men innebär ofta en avvägning där snabbhet uppnås på bekostnad av noggrannhet. Vanliga metoder är:

- **Fluorometri:** används för att mäta fotosyntetisk aktivitet eller fluorescensintensitet som indirekta mått på livskraft och är framför allt användbar för växtplankton.
- **ATP-baserade analyser:** adenosintrifosfat används som proxy för cellulär energi och biomassa. Metoden är snabb men mindre tillförlitlig för vilande stadier eller stadier med låg metabolisk aktivitet.
- **Flödescytometri:** möjliggör automatiserad detektion av infärgade organismer men är kostsam och medför risk för felklassificering, särskilt för organismer som inte är sfäriska eller som förekommer i aggregat, som till exempel äggsäckar.

Trots sina fördelar fångar indikativa metoder ofta inte de särskilda utmaningar som är förknippade med icke-rörliga livsstadier. Det kan leda till falskt negativa resultat eller underskattning av förekomsten av livskraftiga populationer.

1.5 Icke-rörliga livsstadier: egenskaper och utmaningar vid bedömning av livskraft

Icke-rörliga livsstadier, såsom vilägg, cystor och vilande larver, har stor betydelse för vattenlevande ryggradslösa djurs överlevnad och spridning. Dessa stadier förekommer brett inom olika fylogenetiska grupper och geografiska områden och

är vanliga i såväl planktoniska som bottenlevande samhällen. Ur ett evolutionärt perspektiv har de, särskilt hos bottenlevande organismer, utvecklats som en strategi för att kolonisera nya miljöer och klara ogynnsamma förhållanden, såsom extrema temperaturer, variationer i salthalt och syrebrist.

Vilstadier förekommer hos i stort sett alla större grupper av planktoniska och bottenlevande ryggradslösa djur, däribland:

Rotatorier: deras miktiska (producerar haploida ägg) och amiktiska (producerar diploida ägg) ägg omges av komplexa skyddande höljen.

Hoppkräftor: många arter producerar quiescenta ägg eller diapauseägg med avancerad ytornamentering, vilket underlättar överlevnad i sediment.

Gälfotingar: vilägg, ofta inneslutna i ephippier eller cystor, uppvisar en anmärkningsvärd motståndskraft mot uttorkning och extrema temperaturer.

Musslor: larver såsom veligerlarver har skal uppbyggda av organiska och oorganiska lager som skyddar mot miljörelaterad stress.

Geografiskt återfinns dessa stadier i många olika miljöer – från polarområden, där de överlever frysning, till tropiska vatten, där de tål säsongvis uttorkning. Vilstadier kan också finnas kvar i sediment under mycket lång tid, ofta i årtionden, och bildar därmed en form av fröbank som gör det möjligt för populationer att åter-etableras när förhållandena åter blir gynnsamma. Denna allmänna förekomst och stora motståndskraft försvårar både deras bedömning och kontroll i barlastvatten, eftersom icke-rörliga stadier kan förbli oupptäckta trots att de fortfarande är livskraftiga (Holmstrup m.fl., 2020).

Vilstadiernas tålighet och låga metabola aktivitet innebär ytterligare utmaningar för livskraftsbedömning, eftersom traditionella indikatorer, såsom enzymaktivitet eller ATP-mätningar, ofta fungerar dåligt. Därtill förhindrar de skyddande integumentet att infärgningsämnen tränger igenom skal och höljen. Sammantaget innebär detta att det krävs högt specialiserade metoder för att kunna bedöma dessa stadier inom ramen för kontroll av barlastvatten.

1.6 Kunskapsluckor och projektets mål

Avsaknaden av metoder för att bedöma livskraften hos icke-rörliga livsstadier pekar på en tydlig kunskapslucka inom barlastvattenhantering. Den stora mångfalden i planktonsamhällen, inklusive både holoplankton (organismer som lever hela sitt liv som plankton) och meroplankton (bottenlevande arter som förekommer i vattenmassan under larvutvecklingen), gör att det behövs metoder som är anpassade till de särskilda egenskaperna hos icke-rörliga stadier.

Projektet VIABLEGG initierades för att möta dessa kunskapsbehov genom att:

- undersöka befintliga och utveckla nya infärgningsprotokoll som kan tränga igenom skyddande integument,
- anpassa automatiserade detektionssystem, såsom BallastWISE, så att även icke-rörliga stadier kan inkluderas, och
- genomföra validering i laboratorie- och fältstudier.

Denna rapport ger en översikt över projektets resultat och dokumenterar både de utmaningar som identifierats och de insikter som genererats. Genom att fokusera på metodologiska hinder för efterlevnads kontroll bidrar projektet till att utveckla arbetet med barlastvattenhantering.

2. Material och metoder

För att hantera de utmaningar som är förknippade med att bedöma livskraften hos icke-rörliga livsstadier genomförde vi en serie experimentella studier. Huvudfokus låg på att testa och validera infärgningsprotokoll anpassade till olika grupper av ryggradslösa djur med varierande integumentmorfologi. De mest lovande kombinationerna av kemiska, enzymatiska och fluorescensbaserade protokoll som etablerades i laboratoriet användes därefter vid fältvalidering med behandlade och naturliga planktonprov (tabell 1). Målet var att integrera dessa protokoll i högkapacitetsbaserade automatiserade arbetsflöden, med BallastWISE som test-system, för att ta fram praktiskt användbara lösningar för hamnstatskontroll.

Arbetet omfattade därför följande huvuddelar:

- urval av målorganismer,
- utveckling av infärgningsprotokoll,
- kontrollerade exponeringsexperiment för att generera ägg och embryon med olika livskraftstatus, det vill säga kontroll respektive avdödade prover, och
- fältvalidering.

Var och en av dessa delar beskrivs närmare nedan.

2.1 Val av arter och försöksmaterial

Representativa arter av ryggradslösa djur valdes ut utifrån deras relevans för transport med barlastvatten och deras integumentmorfologi (Guerrero-Jiménez m.fl., 2020), vilket innebar olika grad av svårighet vid infärgning (tabell 2). De utvalda taxa omfattar ett brett spektrum av integumenttyper, från mycket motståndskraftiga vilägg hos bladfotingar, såsom ehipprier och cystor, till mer permeabla och metaboliskt aktiva former, exempelvis embryon hos vitmärslor. Därmed speglar de den variation av icke-rörliga livsstadier som kan transporteras med barlastvatten.

Rotatorieägg uppvisar stor variation i både integumentets sammansättning och morfologi. Amiktiska ägg utvecklas partenogenetiskt, medan miktiska ägg utvecklas till hanar om de inte befruktas eller till vilägg om de befruktas (Serra m.fl., 2019). Äggen kan ha tunna eller tjocka skal, och viläggen har flerskiktade strukturer som möjliggör överlevnad under extrema förhållanden. Äggen omges av integument där de yttre lagren är rika på sklerotiserade proteiner och glykosaminoglykaner, vilket bildar en barriär som står emot enzymatisk nedbrytning och kemisk penetration. Hos vissa arter omges äggen dessutom av geléartade höljen, vilket ytterligare ökar deras motståndskraft. De inre, lipidrika lagren bidrar till låg permeabilitet, vilket gör att vanliga infärgningsämnen inte fungerar utan förbehandling. Dessa egenskaper bedömdes kräva förbehandlingsprotokoll, exempelvis enzymatisk eller kemisk mjukgöring, för att möjliggöra penetrering av färgämnen.

Hoppkräftägg har en specialiserad biokemisk sammansättning. Subitanägg omges av släta, tunna membran som huvudsakligen består av kitin och proteiner, vilket möjliggör snabb utveckling men ger begränsat skydd mot miljöstress. Vilägg

har däremot tjocka, flerskiktade integument som är rika på strukturproteiner, lipider och polysackarider, vilket ger hög motståndskraft mot temperaturvariationer, förändringar i salthalt och kemisk stress (Couch m.fl., 2001). Dessa strukturer gör viläggen motståndskraftiga mot infärgning. Vissa vilägg har dessutom taggar eller annan ornamentering som ytterligare kan försvåra upptag av färgämnen. Denna biokemiska komplexitet understryker behovet av anpassade infärgningsprotokoll.

Ägg hos hinnkräftor, inklusive onychopoder såsom *Cercopagis* och *Bythotrephes*, har också integumentanpassningar som påverkar möjligheten till infärgning. Subitanaägg har tunna höljen som är rika på glykoproteiner och lipoproteiner och därför är relativt lätt genomträngliga för färgämnen. Vilägg är däremot inneslutna i ett flerskiktat, kitinöst ephippium berikat med trehalos, vilket ger motståndskraft mot olika typer av stress (Dodson och Frey, 2001). Tillsammans med en hydrofob matris och glykoproteiner försvårar detta färgämnenas penetration.

Hos musslors veligerlarver har integumentet komplexa biokemiska egenskaper (Wanninger och Wollesen, 2019). Epiteliet består av ett enda lager epidermalceller, cilierade celler och mukocyter, som producerar en matris av proteiner och glykoproteiner som stödjer slemproduktion för partikelupptag och rörelse. Tillsammans med mikrovillikanten och beläggningar av mukopolysackarider kan detta begränsa permeabiliteten för färgämnen. Larvskalet, som huvudsakligen består av flexibla proteiner snarare än kalciumkarbonat, fungerar som en semipermeabel barriär och påverkar därmed upptaget av färgämnen. Dessa egenskaper talar för behovet av protokoll optimerade för proteinrika, slemtäckta ytor. Det bör också noteras att simmande veligerlarver exponeras mer för infärgningsmediet när infärgningen sker i flytande medium där larverna kan röra sig fritt med halvöppna skal.

Embryon hos vitmärlor som utvecklas i marsupiet skyddas av ett specialiserat integument bestående av två huvudlager med skilda biokemiska och strukturella egenskaper. Det yttre koriet (äggmembranet) utgör ett tunt, transparent och proteinrikt hölje som ger ett initialt skydd men går sönder då embryot ökar i storlek efter gastrulationen. Det inre vitellinmembranet är en flerskiktad struktur sammansatt av glykoproteiner och lipider och kvarstår under hela utvecklingen, samtidigt som det möjliggör gasutbyte och transport av näring från marsupievätskan (Browne m.fl., 2005). Dessa semipermeabla och transparenta lager möjliggör infärgning utan behov av förbehandling.

Försöksmaterialet inom projektet utgjordes i stor utsträckning av kulturer, men kompletterades vid behov med fältinsamlat material. Planktonhåvar med olika maskvidd, från 25 till 300 μm , användes för att samla in rotatorier, hoppkräftor, hinnkräftor och veligerlarver från vattenmassan i marina miljöer, såsom Himmerfjärden, Brunnsviken och Asköområdet, samt i sötvattenmiljöer, främst Mälaren. Fältlokaler valdes utifrån hög förekomst av arterna, ofta med stöd av lokala övervakningsdata. Embryon av vitmärlor erhöles vanligen genom dissektion av gravida honor som samlats in från sedimentbottnar med bottenläde.

2.2 Metoder för att identifiera livskraftiga organismer

Analys av livskraft bygger både på metoder som inte är beroende av att färgämnen tränger in i organismen och på infärgningsbaserade metoder. Båda typerna av metoder var relevanta i detta arbete, och nedan ges en kort översikt över kunskapsläget inom området.

2.2.1 Metoder utan infärgning

Metoder för livskraftsbedömning utan infärgning bygger på olika biologiska, biokemiska eller fysikaliska indikatorer. Dessa metoder kan i stora drag delas in i flera huvudtyper.

Direkt observation av rörelse. En av de enklaste metoderna för att bedöma livskraft (Holmstrup m.fl., 2020) är att utgå från förekomst eller frånvaro av rörelse, där utebliven rörelse kan tyda på att organismen inte är livskraftig. Metoden är särskilt användbar för större, rörliga organismer, såsom djurplankton och vissa larvstadier hos ryggradslösa djur, där rörelse är lätt att observera. Fördelarna är att metoden är enkel och snabb, kräver minimal utrustning och ger omedelbar kvalitativ information om organismernas tillstånd. Den är däremot inte tillämplig på icke-rörliga livsstadier, såsom ägg och vilcystor.

Användning i VIABLEGG

I BallastWISE-instrumentet används rörelse som primärt kriterium för att bedöma livskraft hos djurplankton i barlastvatten. Instrumentet registrerar rörelsemönster i realtid.

Morfologisk bedömning. Morfologiska bedömningar bygger på mikroskopisk granskning av fysiska strukturer för att dra slutsatser om livskraft. Friska ägg uppvisar vanligtvis intakta och välavgränsade strukturer, och egenskaper som membranets integritet och cellernas organisation är ofta kopplade till livskraft (Zirbel m.fl., 2007). Metoden är värdefull för att identifiera avvikelser eller deformiteter som kan tyda på nedsatt livskraft, men dess användbarhet är begränsad eftersom den är subjektiv och inte ger entydiga, kvantitativa uppgifter om huruvida en organism faktiskt är levande. Morfologiskt intakta ägg kan dessutom sakna funktionell livskraft. Morfologiska observationer kan därför fungera som komplement till andra metoder, men är inte tillräckliga som fristående indikatorer.

Tabell 1. Översikt över projektets metodik, målorganismer och genomförda tester.

Delmoment	Innehåll	Syfte/genomförande
Val av arter och försöksmaterial	Rotatorier (<i>Brachionus</i> spp.), hoppkräftor (<i>Acartia tonsa</i> , <i>Nitocra spinipes</i>), musslor (<i>Mytilus</i> spp.), vitmärlor (<i>Pontoporeia femorata</i> , <i>Hyaletta azteca</i>) samt bladfotingar (<i>Daphnia magna</i> , <i>Artemia salina</i> , <i>Cercopagis pengoi</i>)	Arterna valdes utifrån äggmorfologi, ekologisk relevans, förekomst i barlastvatten samt representativitet för holo- och meroplankton
Försöksmaterial	Stamkulturer, laboratorieodlingar samt kompletterande fältmaterial från Mälaren och Östersjön	Att få tillgång till både väldefinierat försöksmaterial och naturligt förekommande organismer
Litteraturgenomgång	Genomgång av vitala färgämnen och dödcellsfärgämnen för ryggradslösa djur, med fokus på ägg och embryon	Att identifiera lämpliga färgämnen och befintliga protokoll för livskraftsbedömning
Permeabilisering av integument	Kemiska, enzymatiska och fysiska förbehandlingar	Att förbättra färgämnenas penetration genom skyddande integument
Val av färgämnen	Sjutton färgämnen valdes ut för vidare prövning	Att utvärdera specificitet, känslighet och lämplighet för olika organismgrupper
Laborrietester	Fluorescensmikroskopi och bildanalys	Att optimera infärgningsprotokoll för olika typer av integument
Framställning av material med känd livskraftstatus	UV-behandling, UV + TiO ₂ , värmechock och osmotisk chock	Att ta fram positiva och negativa kontroller för metodutvärdering
Fältvalidering	Behandlade planktonprov och naturliga planktonsamhällen	Att pröva metodernas användbarhet under mer realistiska förhållanden
Jämförelse mellan metoder	Jämförelse mellan BallastWISE och mikroskopibaserade metoder	Att bedöma metodernas känslighet, specificitet och praktiska användbarhet

Tabell 2. Översikt över integumentens morfologi och sammansättning samt utmaningar vid infärgning för utvalda taxa.

Taxon	Integument: lager och sammansättning	Viktiga egenskaper och utmaningar
Rotatorier	Yttre lager av glykoproteiner, sklerotiserade proteiner och glykosaminoglykaner; mellanlager av kitinliknande polymerer	Kutikula och geléartade höljen runt äggen ger motståndskraft mot fysisk skada och enzymatisk nedbrytning. Integumentet är svår genomträngligt och ofta icke-transparent
Hoppkräftor	Kitinbaserade äggsäckar fästa vid honan; yttre skal av kitin och proteiner med ornamentering; mellanlager av proteinmatris; inre lager av lipoproteiner och polysackarider	Äggen sitter kvar på honan, vilket underlättar identifiering. Permeabiliteten kan variera beroende på äggsäckens tjocklek. Den robusta strukturen och ytmönstringen, till exempel taggar eller åsar, försvårar infärgning. Quiescenta stadier har låg metabolisk aktivitet
Bladfotingar	Yttre hölje av kiselliknande material och kitin; mellanlager av hydrofoba föreningar och proteiner; inre lipidrika membraner	Mycket hög motståndskraft mot fysisk och kemisk stress. Strukturerna är anpassade för långvarig överlevnad i sediment och kräver ofta en kombination av mekanisk och kemisk behandling för att bli permeabla
Veligerlarver (musslor)	Yttre förkalkat skal av kalciumkarbonat; organisk matris i mantellagret; ett lager epitelceller	Det yttre skalet ger ett starkt skydd mot miljöstress. Kombinationen av förkalkade och organiska lager försvårar infärgning. Slemproduktion kan ytterligare begränsa färgämnenas penetration
Embryon av vitmärlor	Yttre korion av proteiner; vitellinmembran rikt på lipider och polysackarider	Hög metabolisk aktivitet och tydlig fysiologisk respons. Inga särskilda svårigheter förväntas vid livskraftsbedömning

Användning i VIABLEGG

Morfologisk bedömning användes som en oberoende metod för att analysera livskraft hos embryon av vitmärlor. Bedömningen fokuserade på morfologiska avvikelser under embryoutvecklingen, såsom onormal segmentering, deformiteter i extremiteter eller nedsatt membranintegritet, vilka samtliga indikerar letala utfall (Sundelin och Eriksson, 1998). Embryona extraherades från marsupiet och klassificerades med stereomikroskop som antingen normala (= livskraftiga) eller missbildade (icke livskraftiga). Genom att analysera strukturella missbildningar i kombination med infärgningsmetoder kunde vi validera infärgningsprotokollens effektivitet.

Kläckningsframgång. Kläckningsförsök innebär att man under kontrollerade förhållanden följer äggs eller cystors förmåga att utvecklas och kläckas till rörliga juvenila stadier, vilket ger ett direkt mått på livskraft (Briski m.fl., 2013; Gorokhova, 2010). En direkt koppling mellan kläckningsgrad och infärgningsgrad, eller färgintensitet, ger ett mått på infärgningens träffsäkerhet. Metoden har dock begränsningar, eftersom det kan ta dagar eller veckor innan kläckning kan observeras. Dessutom kan inte alla arter eller äggtyper kläckas effektivt, eftersom de kan kräva specifika miljöförhållanden eller en nödvändig viloperiod. Metoden kan därför underskatta livskraften hos vilägg och andra vilstadier.

Användning i VIABLEGG

Kläckningsförsök användes som en oberoende metod för att bedöma livskraften hos rotatorier, *Artemia* och hoppkräftor, i syfte att utvärdera infärgningens effektivitet. Äggen inkuberades kullvis under kontrollerade förhållanden, inklusive temperatur, salthalt och ljusregim (tabell 3), och följdes dagligen med stereomikroskop för att registrera kläckning. Infärgning utfördes på en separat kull före inkubering, och kläckningsframgången jämfördes därefter med resultaten från infärgningen för att beräkna infärgningseffektiviteten. Med denna metod säkerställde vi att andelen infärgade organismer motsvarade andelen som kläcktes framgångsrikt.

Mätning av metabolisk aktivitet. Metabolisk aktivitet kan användas för att bedöma organismers tillstånd genom biokemiska indikatorer, särskilt genom mätning av metaboliter såsom adenosintrifosfat (ATP). ATP är cellernas centrala energibärare, och dess förekomst indikerar att cellerna är funktionellt aktiva. Bioluminiscensbaserade analyser med kommersiellt tillgängliga kit som innehåller luciferas kan kvantifiera även låga ATP-nivåer och ger därmed ett snabbt mått på livskraft (Van Slooten m.fl., 2015). Alla ägg har dock inte nödvändigtvis mätbara ATP-nivåer (Casas-Monroy m.fl., 2023). Andra biokemiska analyser kan bygga på mätning av specifik enzymaktivitet eller förekomst av metabola nedbrytningsprodukter, men dessa mått korrelerar inte alltid direkt med livskraft, eftersom vissa enzymer kan förbli aktiva även i stressade eller icke livskraftiga celler, vilket försvårar tolkningen (Kumar och Ghosh, 2019).

Användning i VIABLEGG

En bioluminiscensbaserad ATP-analys, där luciferaskatalyserad oxidation av luciferin används som mått på ATP-koncentration, användes tillsammans med infärgnings- och kläckningsförsök (tabell 3) för att bedöma den metaboliska aktiviteten hos ägg från rotatorier och hoppkräftor. Metoden testades även på ephippier från hinnkräftor, embryon av vitmärlor och veligerlarver av blåmussla. Proverna preparerades genom att äggen lyserades för att frigöra intracellulärt ATP (rotatorier och hoppkräftor: 10 ägg per prov; hinnkräftor: 1 ephippium eller diapaus-ägg per prov; vitmärlor och veligerlarver: 1 embryo respektive 1 veliger per prov). ATP-koncentrationerna (pg ATP/mL) bestämdes med det kommersiellt tillgängliga B-QUA-kitet (LuminUltra®, Kanada) enligt protokollet för marint växtplankton (Amyot m.fl., 1992; Peperzak m.fl., 2024).

Analysen bygger på en bioluminescent reaktion där ett reagens innehållande luciferas, luciferin och kofaktorer, såsom magnesiumjoner, tillsattes till lysatet. Detta initierade en ljusemitterande reaktion vars intensitet mättes med en luminometer. Signalen jämfördes därefter med en kalibreringskurva baserad på ATP-standarder för att beräkna ATP-koncentrationen.

RLU-värden (relative luminescence units) användes för jämförelser mellan grupper, det vill säga mellan behandlade och obehandlade prover (Romero-Martínez m.fl., 2024; Van Slooten m.fl., 2015). Genom att relatera ATP-nivåerna till kläckningsgrad eller, alternativt, till infärgningsresultat från individer i samma sats, kunde vi jämföra infärgningens effektivitet med denna metabola indikator.

Tabell 3. Inkubationsförhållanden och inkubationstider för kläckning av rotatorien *Brachionus plicatilis*, calanoiden *Acartia tonsa* och harpacticoiden *Nitocra spinipes*.

Parameter	<i>Brachionus plicatilis</i>	<i>Acartia tonsa</i>	<i>Nitocra spinipes</i>
Temperatur	29–30 °C	15–17 °C	20–22 °C
Salthalt	29–30 ppt	25 ppt	7 ppt
Ljus	kontinuerligt, 900 lux	16:8 timmar, 700 lux	kontinuerligt, 200 lux
Syresättning	svag luftning för att förhindra sedimentation	svag luftning för att hålla provet i suspension	ingen luftning
pH	7,8	8,0–8,2	7,5–8,0
Medium	artificiellt havsvatten	filtrerat och steriliserat havsvatten	filtrerat och steriliserat brackvatten
Inkubationstid	24–72 timmar	48–192 timmar	48–120 timmar

2.2.2 Infärgningsbaserade metoder

Dessa tekniker, som används i stor utsträckning för livskraftsbedömning, bygger vanligen på färgämnen som tränger in i celler på olika sätt beroende på deras livskraftstatus. De benämns därför ofta vitala respektive dödcells färgämnen. De etablerade metoderna för att bedöma cellers livskraft bygger i huvudsak på två egenskaper: membranintegritet och metabolisk aktivitet. Även om det finns många olika färgämnen och metoder för livskraftsbedömning saknas fortfarande systematiska undersökningar av hur dessa metoder fungerar för större ($\geq 50 \mu\text{m}$) mikro- och mesozooplankton (Zetsche och Meysman, 2012). Vid analys av livskraft hos hoppkräftägg har den vitala fluorescerande proben Hoechst 33342 använts för att färga cellkärnor och identifiera avvikelser i embryogenesen (Ianora m.fl., 1989; Poulet m.fl., 1995), liksom olika fluorescerande färgämnen, till exempel FDA, propidiumjodid, SYTOX, 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) och TUNEL-analys (terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling) (Buttino m.fl., 2004, 2003; Romano m.fl., 2003).

Användning i VIABLEGG

Infärgningen av samtliga färgämnen och testorganismer genomfördes enligt tillverkarnas anvisningar, där färgämneskoncentrationerna optimerades genom pilotförsök för att säkerställa tillräcklig penetration och tillförlitliga resultat. Testorganismerna, inklusive ägg, embryon och larvstadier, hämtades huvudsakligen från laboratoriekulturer för att ge jämna och kontrollerade försöksförhållanden. När laboratoriekulturer saknades användes fältinsamlat material. Exponeringstid och koncentration av infärgningslösningarna optimerades för varje färgämne och organismtyp, med anpassningar utifrån artspecifika egenskaper hos integumentet.

Vitala färgämnen är substanser som kan ta sig in i levande celler genom selektiva mekanismer som bevarar membranets integritet utan att kompromettera cellens livskraft, och som därmed synliggör aktiva cellulära komponenter. Små, opolära färgämnen kan passivt diffundera genom lipidbilagret, medan andra är beroende av specifika transportproteiner eller jonkanaler. Tillfälliga permeabiliseringsmedel kan också användas för att underlätta upptag. Väl inne i cellen binder färgämnen till intracellulära målstrukturer eller genomgår enzymatiska omvandlingar, vilket möjliggör visualisering av levande celler. De vitala färgämnen som användes i projektet (tabell 4) omfattade:

- **Fluoresceindiacetat (FDA):** ett icke-fluorescerande substrat som omvandlas till fluorescein av intracellulära esteraser. Metoden är användbar för att bedöma livskraften hos olika vattenlevande organismer, särskilt i studier av växtplankton.
- **Karboxifluoresceindiacetat (CFDA):** liknar FDA genom att vara ett icke-fluorescerande substrat som omvandlas till en fluorescerande form av intracellulära esteraser. CFDA är särskilt användbart för att bedöma cellers metaboliska aktivitet. Dess derivat, 5-karboxifluoresceindiacetat acetoximetylester (5-CFDA-AM), är en neutral förening som lätt passerar cellmembranen och hålls bättre kvar i levande celler än FDA.

- **SYTO 9:** ett cellpermeabelt nukleinsyrafärgämne som avger grön fluorescens när det binder till DNA i levande celler. SYTO 9 kan tränga in i alla celler, oavsett membranets integritet, och färgar därför både levande och döda celler när det används ensamt.
- **Hoechst 33342:** ett fluorescerande färgämne som färgar cellkärnor och har använts i studier för att identifiera tidiga avvikelser i embryogenesen hos hoppkräftor.
- **DAPI:** ett fluorescerande färgämne som binder till DNA och används för att färga cellkärnor i både fixerade och levande celler.
- **PicoGreen:** ett icke-toxiskt fluorescerande färgämne som binder till dubbelsträngat DNA och avger grön fluorescens. Det används för att kvantifiera DNA i levande celler och för att bedöma livskraft hos embryon och ägg.
- **MitoTracker:** ett cellpermeabelt färgämne som ansamlas i aktiva mitokondrier och därmed ger information om cellernas metaboliska aktivitet.
- **Neutralrött:** ett icke-fluorescerande vitalt färgämne som ofta används inom cellbiologi för att bedöma lysosomal aktivitet. Det passerar in i levande celler och ansamlas i sura organeller, såsom lysosomer, vilket ger en tydlig röd färg. Detta ligger till grund för Neutral Red Uptake-analysen (NRU), där cellernas förmåga att ta upp och behålla färgämnet används som indikator på membranintegritet och metabolisk aktivitet (Repetto m.fl., 2008).

Dödcells-färgämnen är utformade för att tränga in genom membranerna hos döda eller skadade celler som inte längre kan upprätthålla selektiv permeabilitet. I levande celler fungerar intakta membran som en barriär som hindrar färgämnet från att nå cytoplasman, men när celler dör eller skadas till följd av fysisk påverkan, kemisk exponering eller metabolisk kollaps blir membranerna genomträngliga så att färgmolekyler kan diffundera passivt in i cellen. Väl inne i cellen binder färgämnen till specifika intracellulära målstrukturer, såsom denaturerade proteiner eller nukleinsyror, och ansamlas ofta i områden med cellulär skada. De dödcells-färgämnen som användes i projektet (tabell 4) omfattade:

- **TO-PRO-1-jodid:** tränger in i celler med skadade membran och avger stark grön fluorescens när det binder till nukleinsyror. Gorokhova (2010) visade att TO-PRO-1 effektivt kunde särskilja icke livskraftiga ägg hos hoppkräftor utan förbehandling med kitinas.
- **Propidiumjodid (PI):** tränger in i celler med skadade membran, där det binder till nukleinsyror och avger röd fluorescens. PI används ofta i kombination med vitala färgämnen, såsom SYTO 9, för att ge en tydligare bedömning av cellers livskraft.
- **SYTOX Green:** ett membranimpermeabelt nukleinsyrafärgämne som endast fluorescerar när det binder till DNA i döda eller skadade celler; används ofta vid bedömning av livskraft hos alger.
- **7-aminoaktinomycin D (7-AAD):** ett membranimpermeabelt färgämne som endast tränger in i döda eller döende celler, där det avger röd fluorescens vid bindning till nukleinsyror; användbart tillsammans med andra färgämnen för att bedöma apoptos.

- **Trypanblått:** ett klassiskt färgämne för döda celler, som tar upp färgämnet och blir blå. Metoden har dock låg effektivitet för organismer med tjocka skyddande lager, såsom vissa evertebratägg.
- **Anilinblått:** ett vanligt färgämne som binder till icke livskraftiga celler genom interaktion med denaturerade proteiner och skadade cellmembraner. Dess enkelhet, användbarhet i ljustmikroskopi och tydliga kontrast i infärgade prov gör det till ett värdefullt verktyg för bedömning av livskraft, särskilt för organismer med permeabla integument.
- **TUNEL-analys (*terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling*):** denna metod märker fragmenterat DNA i apoptotiska celler med fluorescens och identifierar därmed icke livskraftiga celler genom att påvisa DNA-brott. Den används för att bedöma apoptos i olika celltyper, inklusive algceller. Metoden utvärderades dock inte i full skala på grund av de långa och tekniskt avancerade protokollen, behovet av specialiserad utrustning och den därmed låga sannolikheten för att den skulle vara tillämpbar under fältförhållanden.

I mikroskopibaserade analyser kan samtidig infärgning med mer än ett fluorescerande färgämne, till exempel SYTO 9 och PI eller TO-PRO-1, användas för att observera cellstrukturer och morfologiska förändringar. Mikroskopibaserade analyser har dock sina begränsningar. Att analysera prover i mikroskop är arbetskrävande och tidsödande, och endast ett begränsat antal individer per prov kan bedömas, vilket kan minska resultatens statistiska styrka. Tolkningen kan också bli subjektiv, eftersom den bygger på visuell bedömning av fluorescensintensitet och organismmorfologi. Automatisk eller halvautomatisk bildanalys kan därför bidra till att minska denna subjektivitet.

Användning i VIABLEGG

Efter inkubation observerades och räknades de infärgade proverna visuellt med ett inverterat epifluorescensmikroskop av typen Nikon Eclipse-Ti, utrustat med ett standardiserat långpass-blåfilter (530–600 nm), vid 20× förstoring. Bildanalysen genomfördes i programvaran ImageJ (version 1.53c, National Institutes of Health, USA) med specialutvecklade makron för studien. Bilderna förbehandlades genom konvertering till 8-bitars gråskala och genom att en algoritm för bakgrunds-subtraktion användes (rolling ball radius: 50 pixlar) för att normalisera intensiteten. Automatisk tröskelvärdehantering med Otsus metod och en watershed-algoritm användes för att skilja organismer från bakgrunden och för att avgränsa individer som låg i kontakt med varandra. Funktionen *Analyze Particles* användes för att identifiera intresseregioner (ROI) utifrån storlek (100–10 000 μm^2) och cirkularitet (0,2–1,0). För färganalysen användes den blå kanalen i den ursprungliga RGB-bilden för att tröskelvärdeskantifiera infärgningen.

För Anilinblått mättes till exempel medelintensiteten i blått för varje ROI, och organismerna klassificerades som levande eller döda utifrån ett tröskelvärde på 150 på en skala från 0 till 255. Morfologiska parametrar, såsom area, omkrets, förhållandet mellan en bilds bredd och höjd och rundhet, mättes också för varje organism. Resultaten exporterades till CSV-filer för vidare statistisk analys.

Tabell 4. Lista över de livskraftsindikatorer/färgämnen och färgämnestyper (vitala/dödcells-färgämnen: V resp. D) som testades i studien.

Färgämne/metod	Typ	Egenskaper	Användning	Fördelar	Begränsningar
FDA	V	Icke-fluorescerande substrat som omvandlas till fluorescein av esteraser	Vanligt vid bedömning av livskraft hos alger	Enkel och effektiv för encelliga organismer	Kräver intakt esteraktivitet
CFDA	V	Liknar FDA; omvandlas till fluorescerande CFD i livskraftiga celler	Bedömning av metabolisk aktivitet hos olika vattenlevande organismer	Hålls bättre kvar i celler än FDA	Infärgnings-effektiviteten varierar; känslig för störning från autofluorescens
SYTO 9	V	Cellpermeabelt nukleinsyrafärgämne med grön fluorescens vid bindning till DNA	Används tillsammans med dödcellsanalys; ger främst en allmän bild av förekomst av nukleinsyror	Har tidigare använts för djurplankton	Kan inte skilja mellan levande celler och celler med skadade membran
Hoechst 33342	V	Fluorescerande prob som färgar cellkärnor	Har använts för att identifiera tidiga avvikelser i embryogenesen hos hoppkräftor	Kan tränga in i levande celler och användas för att följa cellernas tillstånd	Begränsad användbarhet som generell indikator på livskraft
DAPI	V	Fluorescerande färgämne som binder till AT-rika regioner i DNA och avger blå fluorescens	Färgning av cellkärnor i fixerade eller levande celler, inklusive ägg och embryon	Väl etablerat för kärnfärgning	Inte strikt ett vitalfärgämne; begränsad användbarhet för direkt livskraftsbedömning
PicoGreen	V	Icke-toxiskt fluorescerande färgämne som binder till dubbelsträngat DNA	Kvantifiering av DNA i levande celler; bedömning av livskraft hos embryon och ägg	Hög känslighet för DNA	Visade låg användbarhet i ägg med utvecklade integument
MitoTracker	V	Cellpermeabelt färgämne som ansamlas i aktiva mitokondrier	Bedömning av metabolisk aktivitet i ägg och larver	Ger information om mitokondriell aktivitet	Risk för ospecifik signal och falskt positiva resultat
Neutralrött	V	Icke-fluorescerande färgämne som ansamlas i sura organeller, främst lysosomer	Neutral Red Uptake-analys (NRU); används som indikator på membranintegritet och metabolisk aktivitet	Kan användas för olika celltyper, inklusive djur- och mikrobceller	Bygger på lysosomal aktivitet, vilket kan ge missvisande resultat i metaboliskt inaktiva eller tidiga utvecklingsstadier
TO-PRO-1-jodid	D	Membranimpermeabelt nukleinsyrafärgämne som bara tar sig in i sena apoptotiska eller nekrotiska celler; grön fluorescens	Bedömning av livskraft hos olika vattenlevande organismer	Hög specificitet för icke livskraftiga celler	Upptaget kan variera mellan olika celltyper; kan behöva optimeras för olika arter
Propidiumjodid (PI)	D	Fluorescerande färgämne som bara går in i celler med skadade membran; binder till nukleinsyror och avger röd fluorescens	Används tillsammans med vitala färgämnen, t.ex. SYTO 9	Ger viss separation mellan levande och döda celler	Kan ge falskt positiva resultat i celler med tillfälligt skadade membran

Färgämne/metod	Typ	Egenskaper	Användning	Fördelar	Begränsningar
SYTOX Green	D	Membran-impermeabelt färgämne som fluorescerar först när det binder till DNA i döda eller skadade celler	Vanligt vid livskrafts-bedömning av alger	Effektivt för att påvisa icke livskraftiga celler	Passar inte alla celltyper; specificiteten kan variera
7-AAD	D	Membran-impermeabelt fluorescerande färgämne som binder till nukleinsyror i icke livskraftiga celler	Används i flödes-cytometri och fluorescens-mikroskopi	Tillförlitlig indikator på cellstatus; användbar tillsammans med andra färgämnen vid apoptos-analys	Kan ge falskt positiva resultat i vissa celltyper
Trypanblått	D	Exklusionsfärgämne där levande celler förblir ofärgade medan döda celler blir blå	Vanligt i tester av cellers livskraft	Enkel och snabb visuell skillnad mellan levande och döda celler	Fungerar sämre för organismer med tjocka skyddande lager
Anilinblått	D	Binder till denaturerade proteiner och skadade cellmembran	Riktat sig mot strukturell integritet, eftersom livskraftiga celler utesluter färgämnet	Ger snabb visuell bekräftelse av icke livskraft under mikroskop	Mindre effektivt för organismer med komplexa integument
TUNEL-analys	D	Märker fragmenterat DNA i apoptotiska celler och påvisar DNA-brott	Används för att bedöma apoptos i olika celltyper	Användbar för att analysera mekanismer bakom celledöd	Kräver mer komplexa protokoll; skiljer inte alltid tydligt mellan apoptos och nekros

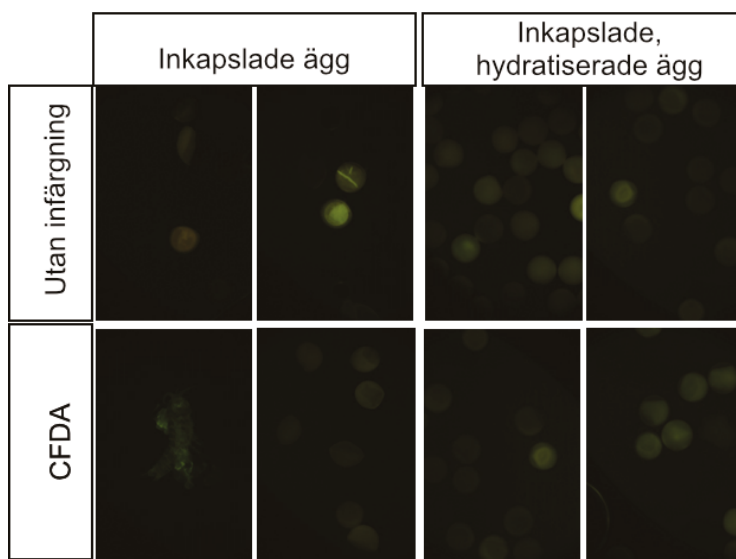
2.3 Provberedning för att öka integumentets permeabilitet

Den begränsade genomträngligheten hos kitinösa och proteinrika strukturer i integumentet utgör en betydande utmaning vid användning av infärgningsmetoder. Förutom att hindra färgämnen från att nå äggets inre strukturer uppvisar äggskalerna ofta autofluorescens, vilket försvårar både detektion och tolkning av infärgningsresultaten. Som framgår av figur 3 utgör integumentet därför ett dubbelt problem: det begränsar färgämnenas penetration samtidigt som det ger upphov till bakgrundsfluorescens. För att infärgningen ska fungera krävs alltså att både de fysiska och de optiska störningarna hanteras.

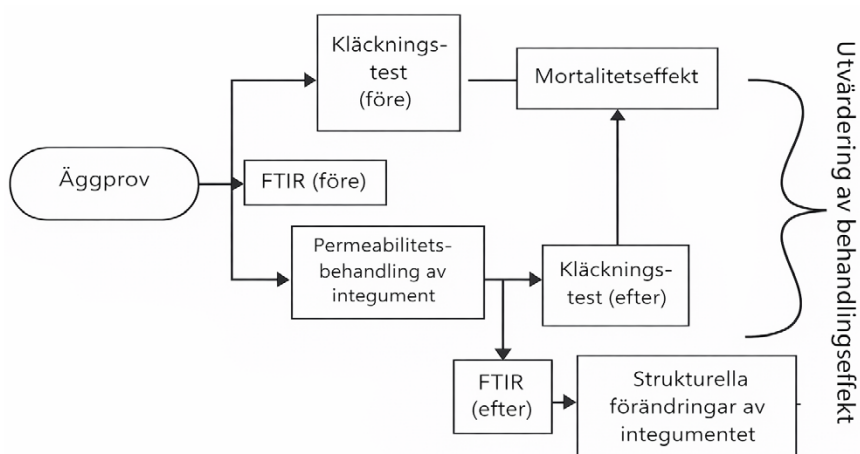
För att öka permeabiliteten i kitinösa och proteinrika strukturer krävs en provberedning som är anpassad till integumentets uppbyggnad. Den centrala utmaningen är att åstadkomma tillräcklig påverkan på kitin- eller proteinlagren för att förbättra färgämnenas inträngning, utan att samtidigt försämra provets livskraft eller skada dess struktur. Behandlingen måste därför optimeras så att den är förenlig med de färgämnen som används, samtidigt som provmaterialets strukturella integritet i möjligaste mån bevaras.

Användning i VIABLEGG

Inom VIABLEGG testades flera metoder (avsnitt 4.3.1 och 4.3.2) för att förbättra färgämnenas penetration genom kitinösa och proteinrika strukturer hos rotatorie- och hoppkräftägg, mussellarver, räkcystor och ephippier hos hinnkräftor. Behandlingarnas effektivitet utvärderades genom (1) infärgning, (2) verifierande kläckningsförsök enligt beskrivningen ovan samt (3) analys av strukturella och kemiska förändringar i integumenten med infraröd spektroskopi (FTIR) (figur 4).



Figur 3. Fluorescensmikroskopiska bilder som visar inkapslade *Artemia*-ägg (vänstra panelerna) och inkapslade, hydratiserade ägg efter 48 timmars hydrering (högra panelerna). De övre panelerna visar äggen utan infärgning, där äggskallets autofluorescens är tydlig. De nedre panelerna visar ägg som färgats med CFDA. Resultaten visar både äggskallets autofluorescens och den begränsade inträngningen av färgämnet i äggets inre.



Figur 4. Detta allmänna arbetsflöde integrerar kläckningsförsök för att fastställa andelen livskraftiga ägg som det slutliga måttet på mortalitet, behandlingar för att öka permeabiliteten (kemiska och/eller fysikaliska), samt FTIR-analys för att visa de övergripande molekylära förändringarna i provet efter behandling. Arbetsflödet användes för att utvärdera behandlingens effektivitet.

2.3.1 Kemiska och fotokemiska behandlingar

För att öka integumentets permeabilitet hos ägg, ephippier och veligerlarver prövades följande kemiska och fotokemiska behandlingar:

Enzymatisk nedbrytning innefattade användning av kitinas (1–5 mg/mL) för att bryta ned kitin i hoppkräftägg och trypsin (0,5–1 mg/mL) för att bryta ned proteinlager. Inkubationstiderna varierade mellan 30 minuter och 2 timmar vid 25 °C. Före infärgning inkuberades äggen i 24 timmar i 250 µl kitinas löst i 50 mmol/L citratbuffert, pH 6, vid 25 °C, för att öka permeabiliteten i den kitinösa väggen. Efter upprepad sköljning i PBS inkuberades embryona i 0,1 % Triton X-100 i 2 timmar vid rumstemperatur och sköljdes därefter i PBS med 1 % BSA (albumin).

LED-assisterad dekapsulering är en metod som används inom vattenbruk för att avlägsna det yttre skalet (korion) hos *Artemia*-cystor genom en kombination av LED-belysning och blekbehandling. Vi följde en metod där cystorna först hydratiserades i vatten, exponerades för blått LED-ljus och därefter behandlades med natriumhypoklorit i kombination med natriumhydroxid för att upprätthålla alkaliskt pH. Reaktionen avbröts sedan med natriumtiosulfat, som neutraliserade blekmedlet och stoppade dekapsuleringen (Delbos m.fl., 2019).

Alkalisk behandling genomfördes med natriumhydroxid (NaOH) i koncentrationer mellan 0,1 och 1 % (w/v) under 5–30 minuter för att deacetylera kitin och mjuka upp motståndskraftiga ephippielager hos *Daphnia*-ägg. Behandlingen följdes av neutralisering eller noggrann sköljning.

Syrabehandling med saltsyra (0,01–0,1 M) eller ättiksyra (0,5–2 % v/v) användes under 2–10 minuter för att lösa upp strukturer av kalciumkarbonat i skalet hos musslors veligerlarver. Efter behandlingen neutraliserades proverna eller sköljdes noggrant.

Behandling med organiska lösningsmedel genomfördes med aceton (20–50 %) under 10–30 minuter för att avlägsna lipidlager i rotatorieägg.

2.3.2 Fysiska behandlingar

För att öka integumentets permeabilitet prövades även fysiska metoder som verkar genom mekanisk eller termisk påverkan på de strukturella barriärerna.

Sonikering. Ultraljud användes för att skapa mikrokaviteter som störde de yttre integumentlagren utan att orsaka någon större skada på proverna. Behandlingen utfördes i ultraljudsbad vid låga frekvenser (10–20 kHz) under 10–15 sekunder, beroende på äggens storlek och integumentets tjocklek.

Mikrovågsbehandling. Korta pulser av mikrovågsstrålning användes för att förstärka effekten av de kemiska behandlingarna genom att mjuka upp integumentet och påskynda molekylära interaktioner. Proverna exponerades för mikrovågspulser på 5–15 sekunder vid låg effekt (10–20 % av maximal effekt), under noggrann kontroll för att undvika överhettning.

Elektroporering. Denna metod bygger på korta elektriska pulser med hög spänning som tillfälligt skapar porer i membranens lipiddubbelskikt och därmed kan öka upptaget av vitala färgämnen som annars inte skulle tränga in. Testorganismerna, det vill säga rotatorieägg, hoppkräftägg, diapauseägg och ephippier, suspenderades i en ledande saltlösning och exponerades för kontrollerade elektriska pulser i en elektroporeringskammare. Typiska parametrar var 200–600 V/cm, pulslängder på 1–10 millisekunder och 1–3 pulser. Lägre nivåer användes i allmänhet för rotatorier och hoppkräftor, och högre för bladfotingar. Efter elektroporeringen

färgades organismerna omedelbart och fick därefter återhämta sig i färskt medium så att membranintegriteten kunde återställas före analys.

Kombinationer av fysiska och kemiska behandlingar. Fysiska behandlingar, såsom sonikering och mikrovågsbehandling, kombinerades ofta med kemiska metoder, till exempel enzymatiska eller alkaliska behandlingar, för att ytterligare förbättra färgämnenas penetration. Ett exempel är kombinationen av sonikering och kitinasbehandling för hoppkräftagg, vilket tydligt förbättrade färgämnenas tillgång till de inre strukturerna.

2.3.3 Bedömning av strukturella och kemiska förändringar i integumentet

Äggens och embryonas integument analyserades med Fouriertransformerad infraröd spektroskopi (FTIR) för att bedöma vilka strukturella och kemiska förändringar som behandlingarna gav upphov till. FTIR möjliggör analys på molekylär nivå av integumentets beståndsdelar och kan därmed användas för att påvisa förändringar i kitin-, protein- och lipidstrukturer (Ishigaki m.fl., 2016). Särskilt följdes utvalda funktionella grupper, såsom topparna för amid I (~1650 cm^{-1}) och amid II (~1550 cm^{-1}) i kitin-proteinmatriser, eftersom förändringar i dessa kan tyda på deacetylering eller proteinnedbrytning efter enzymatiska eller alkaliska behandlingar. FTIR-spektra för kitosan (nedbrutet kitin) kännetecknas av att bandet vid 2532 cm^{-1} försvinner (Beil m.fl., 2012). Lipidskikten analyserades utifrån CH_2 -sträckningsband vid ~2850–2920 cm^{-1} , där en minskning i intensitet kan indikera att lipider avlägsnats, exempelvis genom organiska lösningsmedel. Protein-denaturering eller hydrolys till följd av behandlingarna avspeglades i förändringar i amidbandens intensitet och läge. Även en minskning av OH-sträckningsbandet kring 3460 cm^{-1} efter behandling, såsom den framträder i FTIR-spektra, tyder vanligen på tydliga strukturella och kemiska förändringar i materialet.

2.4 Utvärdering av färgämnenas effektivitet i BallastWISE

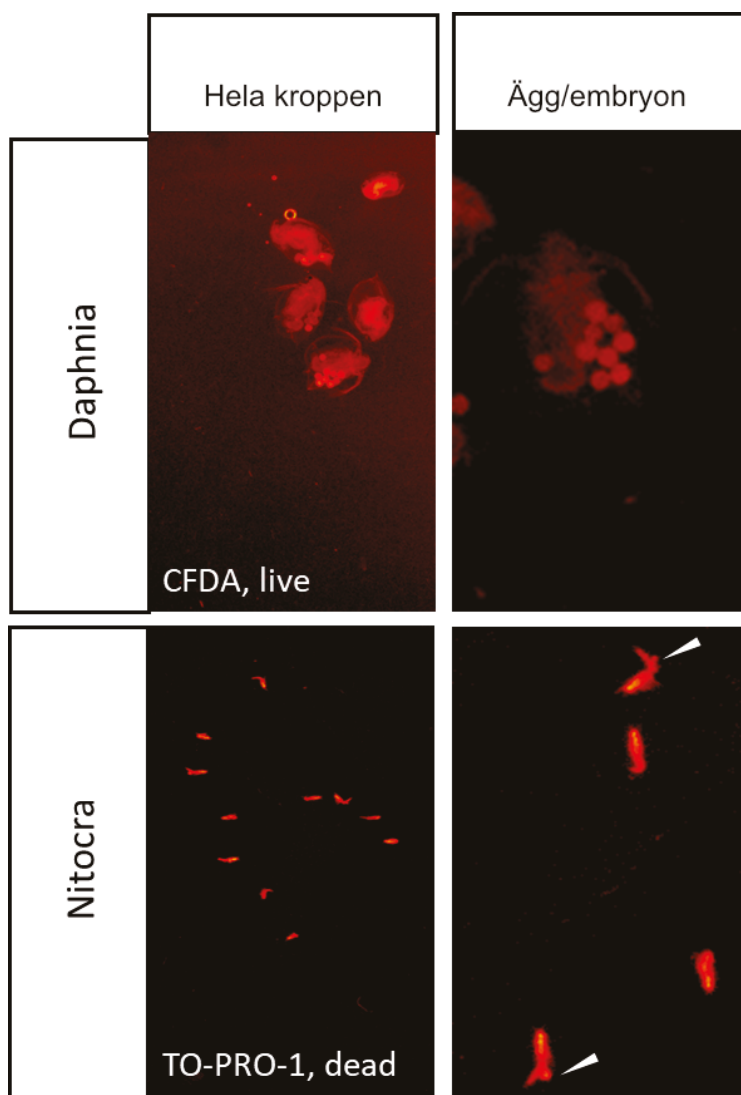
Infärgade prover av levande och döda djurplanktonarter, däribland hoppkräftor (*Nitocra spinipes*) och hinnkräftor (*Daphnia magna*), analyserades med BallastWISE-systemet. Analysen genomfördes med excitationljus vid 420 nm och 500 nm samt ett högpasfilter vid 590 nm för att utvärdera fluorescensresponsen hos olika färgämnen (figur 5). De färgämnen som visade mest konsekventa resultat i laborieförsöken med ljus- och fluorescensmikroskopi (se avsnitt 5.2) var CFDA, TO-PRO-1-jodid och Anilinblått.

Provberedning. Det biologiska materialet i dessa försök hämtades från kulturer, vilket gav tillgång till friska hoppkräftor och hinnkräftor med naturlig populationsdynamik, inklusive honor med ägg. Även blandprover med lika delar hoppkräftor och hinnkräftor (50:50) sattes samman.

De levande individer som användes i försöken valdes ut direkt från odlingskärlen. Endast honor med ägg, synlig rörelse och normal morfologi inkluderades, för att säkerställa att testmaterialet var representativt och verkligen livskraftigt. Varje individ plockades manuellt och överfördes varsamt till provbehållare för att minimera hanteringsstress.

Varje prov innehöll totalt 25–100 individer. Storleksfördelningen hölls så jämn som möjligt mellan proverna för att göra jämförelser mellan replikat och färgämnen mer tillförlitliga. På så sätt begränsades variationen mellan proverna, och materialen speglade bättre de djurplanktonsamhällen som analyserades.

Infärgningsförfarande. För att utvärdera färgämnenas funktion delades alla prover upp i två grupper: levande respektive döda individer. För gruppen med döda individer användes värmeavdödning i vattenbad vid 55 °C under 30 minuter. Denna behandling hade tidigare validerats och visat 0 % kläckningsframgång hos både *Nitocra spinipes* och *Daphnia magna*, vilket bekräftade att metoden effektivt inducerade mortalitet.



Figur 5. Fluorescensfärgning av hela kroppen och ägg hos *Daphnia magna* (levande, färgad med CFDA) och *Nitocra spinipes* (död, färgad med TO-PRO-1-jodid).

De vänstra panelerna visar fluorescens i hela kroppen, medan de högra panelerna visar närbilder av äggen i yngelkammaren hos *Daphnia magna* (övre högra panelen) och i äggsäcken hos *Nitocra spinipes* (nedre högra panelen), från samma individer som avbildas till vänster. Färgämnet som användes och organismernas viabilitetsstatus anges. Pilspetsar markerar färgade äggsäckar hos hoppkräftshonorna. Hos båda arterna är färgningen jämnt fördelad över hela kroppen och i äggmaterialet.

Efter värmebehandlingen färgades både de behandlade proverna (döda individer) och de obehandlade kontrollproverna (levande individer) parallellt enligt samma infärgningsprotokoll som användes i laboratorieutvärderingarna (se avsnitt 5.2). Dessutom inkluderades ofärgade kontroller för både levande och döda grupper. Dessa kontroller var nödvändiga för att kunna bedöma bakgrundsfluorescens och autofluorescens och därmed säkerställa att den fluorescens som registrerades i de infärgade proverna faktiskt kunde tillskrivas färgämnet. Proven skickades därefter till Danmark med bud och analyserades inom några dagar efter infärgningen.

Fokus på helkroppsfärgning. Inom ramen för BallastWISE-testningen valdes helkroppsfuorescens som analysvariabel, trots att huvudintresset låg på äggen. Skälet var praktiskt. Hos både hoppkräftor och hinnkräftor är äggen fysiskt kopplade till honan, antingen i äggsäckar hos hoppkräftor eller i yngelkammaren hos hinnkräftor. Denna nära koppling gjorde det svårt att separera äggen för fluorescensmätningar utan att samtidigt skada deras struktur. Som en mer genomförbar och effektiv lösning analyserades därför fluorescensintensiteten hos hela organismen, inklusive de ägg som bars av honan.

2.5 Dataanalys

Infärgningens träffsäkerhet, baserad på bildanalys, och den metaboliska aktiviteten, mätt som ATP-nivåer, utvärderades som indikatorer på livskraft genom jämförelse med antingen kläckningsframgång (för *Artemia*, rotatorier och hoppkräftor) eller förekomst av embryonala missbildningar (för vitmärlor). För varje replikat beräknades andelen kläckta ägg respektive andelen normala embryon, och dessa resultat jämfördes med utfallet från infärgningen. På motsvarande sätt jämfördes ATP-nivåerna mellan äggsatser som klassificerats som döda respektive levande, det vill säga kontrollgrupper och grupper som avdödats genom exponering för olika desinfektionsbehandlingar (tabell 1). Överensstämmelsen mellan kläckningsgrad eller frekvens av embryonala missbildningar och den livskraft som bestämts med infärgning eller ATP-mätning användes som mått på metodernas träffsäkerhet.

Effekterna av kemiska och fysikaliska behandlingar på integumentets permeabilitet och på testorganismernas överlevnad analyserades med generaliserade linjära modeller (GLM) eller Mann-Whitneys U-test, med en signifikansnivå på $p < 0,05$. När det behövdes transformerades data med Box-Cox-metoden för att möjliggöra analys av behandlingsspecifika effekter på infärgningseffektivitet och behandlingarnas dödlighetseffekter, med hänsyn till behandlingstyp, behandlingstid och organismtyp.

3. Resultat

3.1 Sammanfattning av de viktigaste resultaten

Projektet visade att det inte är realistiskt att utveckla en generellt tillämpbar metod för bedömning av livskraft av icke-rörliga livsstadier hos ryggradslösa djur med den ansats som prövades. De största hindren var den stora variationen i integumentens uppbyggnad mellan olika organismgrupper samt den låga metaboliska aktiviteten hos många vilstadier.

Samtidigt gav projektet flera viktiga resultat. För vissa organismgrupper fungerade specifika metoder väl och bedöms ha potential för praktisk användning. Detta gällde särskilt hoppkräftor och mussellarver, där vissa färgämnen gav tydliga och reproducerbara resultat. Däremot var det betydligt svårare att utveckla fungerande metoder för organismer med kraftigt skyddande strukturer, såsom diapauseägg och ephippier.

Försöken att öka integumentets permeabilitet genom kemiska, enzymatiska och fysikaliska behandlingar visade att det finns en tydlig målkonflikt mellan ökat upptag av färgämnen och bibehållen livskraft. Behandlingar som förbättrade färgämnenas penetration ledde ofta samtidigt till minskad kläckningsframgång eller andra negativa effekter på organismernas överlevnad. Detta begränsar metodernas praktiska användbarhet när syftet är att bedöma livskraft utan att påverka provets biologiska status.

FTIR-analyserna visade att flera behandlingar gav upphov till mätbara förändringar i integumentets kemiska och strukturella egenskaper. Dessa analyser bidrog därmed till att förklara varför vissa behandlingar ökade permeabiliteten, men också varför de i många fall försämrade provmaterialets livskraft. Kombinationen av FTIR, infärgning och kläckningsförsök gav därför en mer samlad förståelse av behandlingarnas effekter.

När det gäller själva infärgningsmetoderna fungerade vissa vitala och dödcellsfärgämnen lovande för vissa taxa, men ingen metod visade tillräcklig robusthet för att fungera brett över olika organismgrupper och olika typer av icke-rörliga stadier. Resultaten visade tydligt att metodernas användbarhet är starkt beroende av taxon och livsstadium.

Utvärderingen i BallastWISE visade att systemet har potential att användas tillsammans med utvalda färgämnen, men också att metodernas prestanda påverkas av instrumentets optiska förutsättningar, bakgrundsfluorescens och skillnader mellan olika typer av organismer. Resultaten pekar därför mot att framtida metodutveckling bör inriktas på mer riktade lösningar för specifika organismgrupper snarare än på en universell metod.

Tabell 5. Sammanfattning av färgämnenas prestanda vid livskraftsbedömning, baserad på de experimentella resultaten. Tabellen visar typ, verkningmekanism, taxa där metoden fungerade, styrkor och begränsningar för de färgämnen (D: dödcellsfärgämnen och V: vitala färgämnen) som testades för att bedöma livskraft hos icke-rörliga livsstadier hos ryggradslösa djur, med fokus på äggsäckar, embryon och veligerlarver. Endast färgämnen med resultat som bedömdes motivera fortsatt undersökning ingår.

Färgämne	Typ	Mål/ verkningsmekanism	Taxa där metoden fungerade	Styrkor	Begränsningar
Anilinblått	D	Binder till denaturerade proteiner och skadade membran	Hoppkräftägg, rotatorieägg	Snabb och enkel metod; selektiv infärgning av äggsäckar	Falskt positiva resultat i levande individer (upptag av färgämne); ojämn infärgning
TO-PRO-1-jodid	D	Tränger in genom skadade membran och binder till nukleinsyror	Hoppkräftägg, vitmärl-embryon	Stark och jämn fluorescens; hög känslighet för hoppkräftägg	Kräver optimering; störning från autofluorescens; falskt positiva resultat (15 %) i vitmärl-embryon
CFDA	D	Esterasaktivitet omvandlar färgämnet till en fluorescerande product	Räckcystor, hoppkräftägg, vitmärl-embryon	Fungerar för metaboliskt aktiva ägg	Dålig penetration i ogenomträngliga integument; viss autofluorescens
Neutralrött	V	Anrikas i lysosomer	Veligerlarver av musslor	Tillförlitligt för vissa taxa	Fungerar inte för ägg utan lysosomal aktivitet
MitoTracker	V	Anrikas i mitokondrier	Hoppkräftägg (subitanägg), sena embryostadier	Tillförlitligt endast för välutvecklade ägg	Dålig penetration i ogenomträngliga integument

Tabell 6. Sammanfattning av färgämnenas prestanda för olika äggtyper, baserad på de experimentella resultaten. Tabellen lyfter fram taxa, typ av stadium och de utmaningar som identifierades i studien. Endast färgämnen med resultat som bedömdes motivera fortsatt undersökning ingår.

Artgrupp	Äggtyp/stadium	Färgämne	Utfall	Utmaningar
Rotatorier	Miktiska ägg	CFDA	Svagt	Ogenomträngligt integument; hög dödlighet vid behandling med kitinas och NaOH
Rotatorier	Amiktiska ägg	–	Ingen	Ogenomträngligt integument; hög dödlighet vid behandling med kitinas och NaOH
Rotatorier	Amiktiska ägg	MitoTracker	Bra	Fungerade inte för andra äggtyper med låg mitokondriell aktivitet
Hoppkräftor	Subitanägg	CFDA	Bra	Falskt positiva signaler i värmeavdödade embryon; viss autofluorescens
Hoppkräftor	Subitanägg	TO-PRO-1-jodid	Bra	Autofluorescens från kitinöst exoskelett
Hoppkräftor	Diapauseägg	CFDA	Ingen	Ogenomträngligt integument; hög dödlighet vid behandling med kitinas och NaOH
Vitmärlor	Embryon	CFDA	Ja	Falskt positiva signaler i värmeavdödade embryon
Vitmärlor	Embryon	TO-PRO-1-jodid	Ja	Inga tydliga begränsningar identifierades
Musslor	Veligerlarver	Neutralrött	Ja	Fungerade inte för andra äggtyper som saknar utvecklat lysosomalt system
Artemia	Dekapsulerade cystor	CFDA	Begränsat	Hög autofluorescens från dekapulerade cystor störde detektion av färgämnets fluorescens

3.2 Ökad permeabilitet i integumentet

Den begränsade genomträngligheten hos äggens integument, särskilt hos vilägg och andra vilstadier, var ett av de största hindren för en fungerande infärgning. För att förbättra färgämnenas penetration testades därför ett brett spektrum av kemiska, enzymatiska och fysikaliska behandlingar, med målet att öka permeabiliteten utan att samtidigt försämra organismens livskraft. Behandlingarnas effekt utvärderades utifrån infärgningseffektivitet, kläckningsframgång och strukturella förändringar i integumentet analyserade med FTIR-spektroskopi.

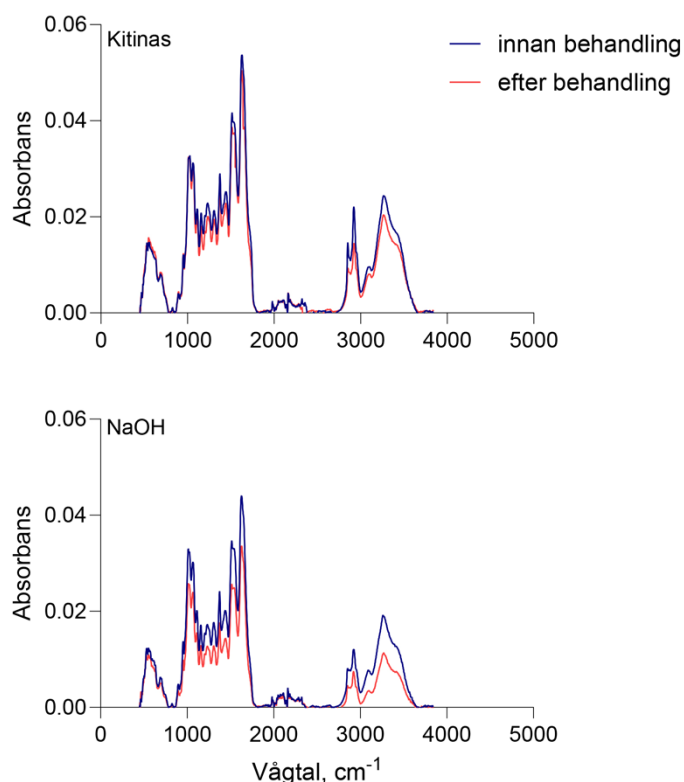
Resultaten visade en tydlig målkonflikt: de behandlingar som mest effektivt ökade permeabiliteten ledde ofta också till minskad kläckningsframgång och därmed försämrad livskraft. Elektroporering ökade till exempel färgupptaget hos rotatorier men minskade samtidigt kläckningsframgången med 25 procent, och FTIR-analyserna bekräftade att behandlingarna gav upphov till förändringar i integumentets kitinösa och proteinrika lager. För särskilt motståndskraftiga strukturer, såsom ephippier och diapauseägg, sågs däremot inga tydliga förbättringar i permeabilitet, och FTIR visade endast begränsade strukturella förändringar, vilket speglar dessa stadiernas höga motståndskraft.

Sammantaget visade kombinationen av FTIR-analys och kläckningsförsök att det är avgörande att förstå hur olika behandlingar påverkar integumentets struktur, för att kunna väga ökad permeabilitet mot bevarad livskraft och därmed bedöma metodernas praktiska användbarhet vid livskraftsbedömning.

3.2.1 FTIR-analys av förändringar i integumentet

FTIR-spektroskopi visade sig vara ett värdefullt verktyg för att tolka de strukturella och biokemiska förändringar som provberedningen gav upphov till i integumenten. Som exempel visas här hur FTIR-spektra för ägg av *Cercopagis pengoi* påverkades av behandling med kitinas (1 mg/ml) respektive NaOH (0,3 %) före och efter behandling. Spektra gjorde det möjligt att identifiera specifika förändringar i funktionella grupper som är kopplade till äggskalens kitinösa och proteinrika komponenter (figur 6).

I den övre panelen visas effekten av kitinasbehandling. En minskning i intensiteten hos topparna för amid I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) och amid II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) tyder på en partiell nedbrytning av kitin-proteinmatrisen. De mer subtila förändringarna i området för OH-sträckning ($\sim 3460\text{ cm}^{-1}$) kan dessutom tyda på mindre störningar i vätebindningsnätverket, vilket speglar lokala förändringar i kitinstrukturen.



Figur 6. FTIR-spektra som visar effekterna av kemiska behandlingar på integumentet hos diapauseägg av *Cercopagis pengoi*.

I den övre panelen visas effekten av behandling med kitinas, med minskad intensitet i topparna för amid I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) och amid II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), vilket tyder på en partiell nedbrytning av kitin-proteinmatrisen. I den nedre panelen visas effekten av behandling med NaOH, där minskningen i amidtopparna är mer uttalad och där OH-sträckningsbandet ($\sim 3460\text{ cm}^{-1}$) avtar kraftigt, vilket speglar en betydande deacetylering och förlust av hydroxylgrupper.

Den nedre panelen visar effekten av NaOH-behandling. De tydliga minskningarna i topparna för amid I och amid II tyder på omfattande proteinnedbrytning och deacetylering av kitin. Den kraftiga minskningen i OH-sträckningsbandet ($\sim 3460\text{ cm}^{-1}$) pekar dessutom på en betydande förlust av hydroxylgrupper, sannolikt till följd av deacetylering och dehydrering. Dessa förändringar var mer uttalade än efter kitinasbehandling, vilket stämmer överens med att alkaliska behandlingar hade en starkare inverkan på integumentets integritet. Sammantaget visar FTIR-spektra att olika behandlingar påverkar integumentet på olika sätt och ger därmed viktig information om de mekanismer som ligger bakom de strukturella förändringarna.

3.2.2 Kemiska behandlingar

För att förbättra färgämnenas penetration genom kitinösa och proteinrika integument testades flera kemiska och enzymatiska behandlingar, däribland enzymatisk nedbrytning, alkaliska lösningar, syrabehandling, organiska lösningsmedel och LED-assisterad dekapulering. Av dessa gav kitinas och NaOH de tydligaste effekterna. Båda behandlingarna förändrade äggskalen strukturellt, vilket bekräftades både av FTIR-analyser och kläckningsförsök (tabell 7).

Behandling med kitinas (1–5 mg/mL) ökade upptaget av färgämnen i rotatorieägg och hoppkraftägg, men var ofta samtidigt dödlig, särskilt i kombination med detergenter. FTIR-spektra visade minskad intensitet i topparna för amid I och amid II, vilket tyder på nedbrytning av kitin-proteinmatrisen.

NaOH (0,1–1 %) var effektivt för att mjuka upp motståndskraftiga lager, till exempel ephippier hos *Daphnia*, men gav också upphov till förhöjd dödlighet. Behandlingen ledde till tydliga minskningar i signaler kopplade till hydroxylgrupper och proteiner, vilket bekräftar att integumentet förändrades strukturellt.

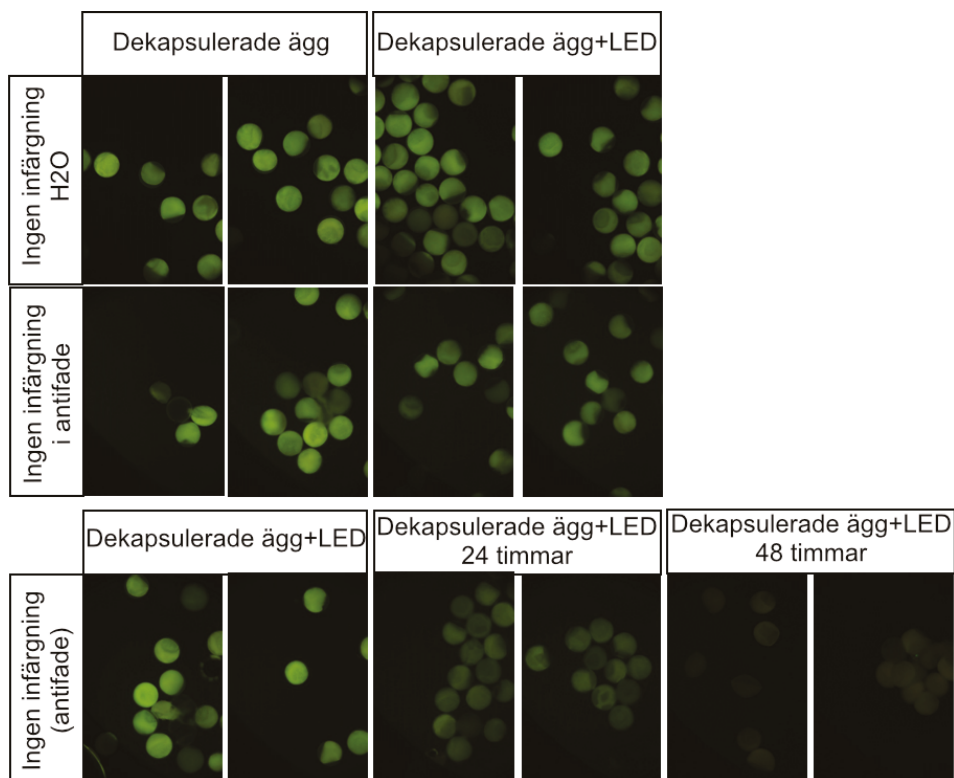
Syra- och trypsinbehandlingar förbättrade däremot permeabiliteten endast marginellt. Upptaget låg under 15 % för dödcells-färgämnen och under 8 % för vitala färgämnen. Med tanke på den begränsade effekten och den ökade risken för strukturell skada fördes dessa behandlingar inte vidare i det fortsatta försöksarbetet.

LED-assisterad dekapulering av *Artemia*-cystor avlägsnade chorion effektivt, men gav samtidigt upphov till hög autofluorescens (figur 7). Denna autofluorescens, som sannolikt uppkom till följd av kvarvarande kemiska reaktioner eller strukturella förändringar under blekbehandlingen, försvårade tolkningen av infärgningsresultaten. Infärgning med CFDA och TO-PRO-1 gav visserligen till synes positiva signaler, men kläckningsförsöken visade en livskraft på mindre än 3 %, vilket starkt talar för att signalen huvudsakligen härrörde från autofluorescens och inte från faktisk infärgning av livskraftiga strukturer (figur 8).

En generaliserad linjär modell (GLM) med binomial felstruktur användes för att analysera hur behandlingstyp, art och exponeringstid påverkade dödligheten, bestämd genom kläckningsförsök. Analysen visade signifikanta huvudeffekter av både behandlingstyp ($p < 0,001$) och exponeringstid ($p < 0,001$), liksom en signifikant interaktion mellan art och behandlingstyp ($p = 0,015$). Dödligheten var särskilt hög hos subitanägg jämfört med diapauseägg hos *Acartia tonsa* ($p < 0,001$), vilket visar att subitanäggen var mer känsliga. NaOH gav också genomgående högre dödlighet än övriga behandlingar (GLM, $p < 0,001$; tabell 7).

Syrabehandlingar, främst HCl i koncentrationer mellan 0,01 och 0,1 M, riktades mot kalciumkarbonat i veligerskal men hade ingen tydlig effekt på integument hos rotatorier, som saknar förkalkade strukturer. På motsvarande sätt hade trypsin (0,5–1 mg/mL) begränsad effekt på de kitinösa och proteinrika barriärerna i rotatorieägg, eftersom enzymet inte förmådde tränga igenom de motståndskraftiga yttre lagren i någon större utsträckning (tabell 8).

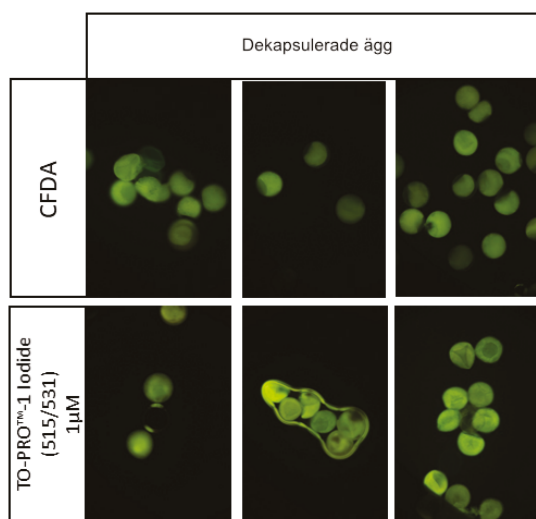
Sammantaget var det kitinas och NaOH som gav störst effekt på integumentets permeabilitet, men deras toxiska effekter var ofta så stora att nyttan begränsades. De övriga kemiska behandlingarna gav antingen alltför svag förbättring av färgupptaget eller orsakade oacceptabel skada på provmaterialet. Resultaten visar därför att kemiska behandlingar visserligen kan öka integumentets genomtränglighet, men att detta ofta sker till priset av minskad livskraft.



Figur 7. LED-assisterad dekapulering av *Artemia*-cystor som visar att chorion avlägsnades framgångsrikt efter behandlingen. De dekapuleringade cystorna uppvisade hög autofluorescens vid fluorescensmikroskopi, vilket försvårade en korrekt bedömning av färgupptaget.

Övre och mellersta raden: dekapuleringade cystor utan respektive med LED-exponering i vatten (övre raden) och i antifade-reagens (mellersta raden); antifade-reagenset tillsattes som en del av standardproceduren vid fluorescensavbildning.

Nedre raden: successivt minskande autofluorescens under 24 timmars LED-exponering. I inget av fallen användes något färgämne.



Figur 8. Dekapsulerade *Artemia*-ägg färgade med CFDA (vitalt färgämne; övre panelerna) och TO-PRO™-1-jodid (dödcellsfärgämnen; nedre panelerna).

Båda färgämnena gav skenbart positiva resultat, trots att livskraften hos dessa ägg var mindre än 3 % i kläckningsförsöken. Fluorescenssignalen härrörde huvudsakligen från äggskalens autofluorescens.

Tabell 7. Dödlighet (%) hos ägg/ephippior samt motsvarande 50-procentig letalitet (LC50, mediandödlig dos) hos olika arter efter permeabiliserande behandling av integumentet med kitinas (1 eller 5 mg/mL) och NaOH (0,1 %).

Art/äggmorfologi	Behandling	LC50 (min)	10 min	20 min	30 min	60 min
<i>Daphnia magna</i> (ephippium)*	Kitinas (5 mg/mL)	27,6	10	35	67	95
<i>Daphnia magna</i> (ephippium)	Kitinas (5 mg/mL)	34,3	0	15	27	44
<i>Acartia tonsa</i> (subitanägg)	Kitinas (1 mg/mL)	30,4	5	16	24	31
<i>Acartia tonsa</i> (diapauseägg)	Kitinas (1 mg/mL)	131,6	4	21	44	68
<i>Nitocra spinipes</i> (äggsäck)	Kitinas (1 mg/mL)	134,9/NC	5	8	13	27
<i>Brachionus plicatilis</i> (miktiskt ägg)	Kitinas (1 mg/mL)	NC	2	4	3	5
<i>Daphnia magna</i> (ephippium)*	NaOH	23,0	13	35	73	92
<i>Acartia tonsa</i> (subitanägg)	NaOH	29,3	12	23	57	81
<i>Nitocra spinipes</i> (äggsäck)	NaOH	20,0	20	45	75	98
<i>Brachionus plicatilis</i> (miktiskt ägg)	NaOH	100,9/NC	10	7	25	33
<i>Artemia salina</i> (cystor)	NaOH	NC	5	0	13	19

*: tillämpad efter sonikering; NC: ofullständig dos-responssamband, LC50 kunde inte beräknas

Tabell 8. Syra- och trypsinbehandlingar förbättrade endast färgämnenas penetration i begränsad utsträckning, med upptag under 15 % för dödcellsämnen och under 8 % för vitala färgämnen. Med tanke på den låga effektiviteten jämfört med övriga testade metoder fördes dessa behandlingar inte vidare i det experimentella arbetet.

Art/stadium	Behandling	Upptag av Anilinblått (%)	Upptag av CFDA (%)
miktiskt ägg	HCl (0,1 M)	10	5
amiktiskt ägg	HCl (0,1 M)	15	8
veligerlarver	HCl (0,2 M)	12	6
miktiskt ägg	Trypsin (2 mg/mL)	8	3
amiktiskt ägg	Trypsin (2 mg/mL)	10	5
veligerlarver	Trypsin (1 mg/mL)	9	4

3.2.3 Fysiska och kombinerade behandlingar

För att minska de skador som de kemiska behandlingarna orsakade, men ändå förbättra integumentets genomtränglighet, prövades flera fysiska metoder, mikrovågsbehandling, sonikering och elektroporering, både var för sig och i kombination med kemiska behandlingar. Resultaten varierade tydligt mellan olika organismgrupper, både när det gäller effekt på permeabilitet och påverkan på livskraft.

Elektroporering gav de mest lovande resultaten. Hos rotatorieägg ökade upptaget av CFDA tydligt, upp till 55 %, samtidigt som dödligheten ökade måttligt, till cirka 25 %. För *Nitocra spinipes* var effekten däremot liten; permeabiliteten ökade bara med 5 %, och för ephippior av *Daphnia magna* kunde ingen mätbar förbättring ses. Dödligheten var också lägre för dessa taxa, 20 % för ägg av *Nitocra spinipes* och 10 % för ephippior av *Daphnia magna*, vilket tyder på att de tålde behandlingen bättre och återhämtade sig väl efteråt.

Mikrovågsbehandling fungerade dåligt. Förbättringen av permeabiliteten var liten, medan dödligheten genomgående var hög. Hos rotatorier gav behandlingen endast 20 % permeabilitet, mätt som CFDA-upptag, men orsakade samtidigt omkring 70 % dödlighet. För både äggsäckar av *Nitocra spinipes* och ephippior av *Daphnia magna* förbättrades permeabiliteten inte alls, medan dödligheten uppgick till 85 % respektive 10 %. Mot bakgrund av dessa tydligt negativa effekter togs mikrovågsbehandling inte vidare i den fortsatta utvärderingen.

Sonikering gav ojämna resultat. Hos rotatorier varierade förbättringen i permeabilitet kraftigt, med ett genomsnitt på 34 % ± 20 %, och detta var samtidigt kopplat till hög dödlighet. För äggsäckar av *Nitocra spinipes* och ephippier av *Daphnia magna* ökade permeabiliteten inte alls, medan dödligheten steg till 56 % respektive 10 %. När sonikering kombinerades med kitinasbehandling (tabell 5) förstärktes dessutom den dödliga effekten av enzymbehandlingen signifikant (GLM: $p < 0,05$).

Sammantaget var det endast elektroporering som visade viss potential som metod för att öka permeabiliteten utan alltför stora negativa effekter på livskraften, och då framför allt för rotatorieägg. Mikrovågsbehandling och sonikering gav däremot antingen alltför svag effekt eller oacceptabelt hög dödlighet. Resultaten visar därmed att även de fysiska behandlingarna innebär en tydlig avvägning mellan förbättrat färgupptag och bevarad livskraft, och att denna avvägning skiljer sig mellan olika taxa.

3.3 Utvärdering av infärgningseffektivitet

För att bedöma färgämnenas prestanda genomfördes mikroskopibaserade analyser av kontrollprover (livskraftiga), behandlade prover (icke livskraftiga) och blandprover för ett urval av evertebratägg och embryon. Eftersom vi inte identifierade någon förbehandling som samtidigt ökade integumentets genomtränglighet och bevarade organismens livskraft användes ingen sådan behandling i denna del av arbetet. I stället inriktades utvärderingen på representativa arter, med tyngdpunkt på organismer med tunnskaliga ägg för att minska betydelsen av integumentet.

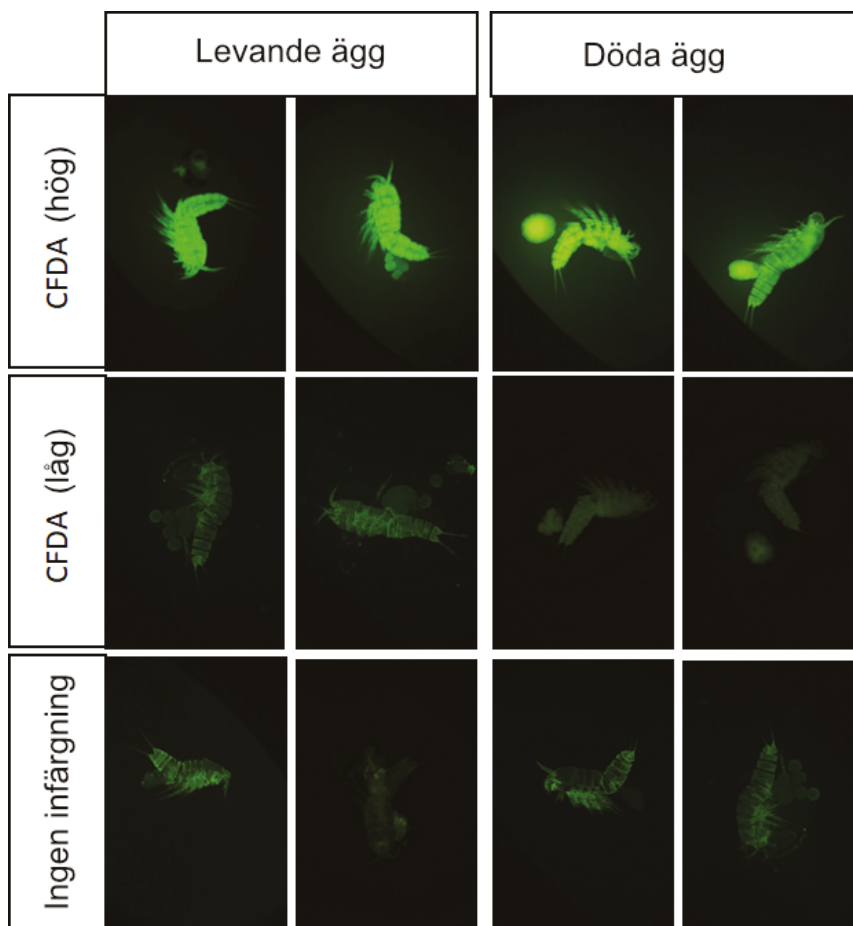
Färgämnenas prestanda bedömdes utifrån fluorescensintensitet, infärgningsspecificitet och diagnostisk träffsäkerhet. Som referensmetoder användes kläckningsförsök och ATP-mätningar. Totalt testades 17 färgämnen, varav 8 vitala och 9 dödcells-färgämnen (tabell 4). Flera av dessa visade potential för vissa arter eller livsstadier, men inget färgämne fungerade genomgående för alla testade organismer. Nedan sammanfattas resultaten för de mest informativa färgämnen..

3.3.1 Vitala färgämnen

CFDA gav stark fluorescens i livskraftiga subitanägg hos hoppkräftor (figur 9) och i embryon av vitmärlor (figur 10), och resultaten stämde väl överens med både kläckningsgrad och ATP-nivåer (figur 11, figur 12). Hos *Nitocra spinipes* gav en hög koncentration CFDA (10 μM) tydlig infärgning av livskraftiga äggsäckar, medan låg koncentration inte gav användbara resultat. Infärgningen var också tydligt starkare hos levande honor än hos döda kontroller (figur 9), vilket visar att färgämnet under dessa förhållanden kunde skilja mellan levande och dött material på ett tillförlitligt sätt. Samtidigt sågs en svag signal (< 15 %) även i döda äggsäckar, sannolikt till följd av kvarstående esterasaktivitet efter död eller viss autofluorescens. Ingen återhämtning observerades hos de döda kontrollerna inom 24 timmar efter behandlingen, och deras ägg klassificerades som helt icke livskraftiga i kläckningsförsöken (figur 11). Svag autofluorescens förekom hos ofärgade honor, men inte i äggsäckarna (figur 9).

Hos vitmärlan *Monoporeia affinis* trängde färgämnet lätt in, vilket sannolikt hänger samman med det mycket tunna yttre membranet (tabell 2). Däremot gav metoden mer än 50 % falskt positiva resultat, eftersom döda embryon fortfarande hade tillräcklig metabolisk aktivitet för att aktivera fluorescensen (figur 10). De värmeavdödade embryona uppvisade kvarvarande esterasaktivitet i flera timmar

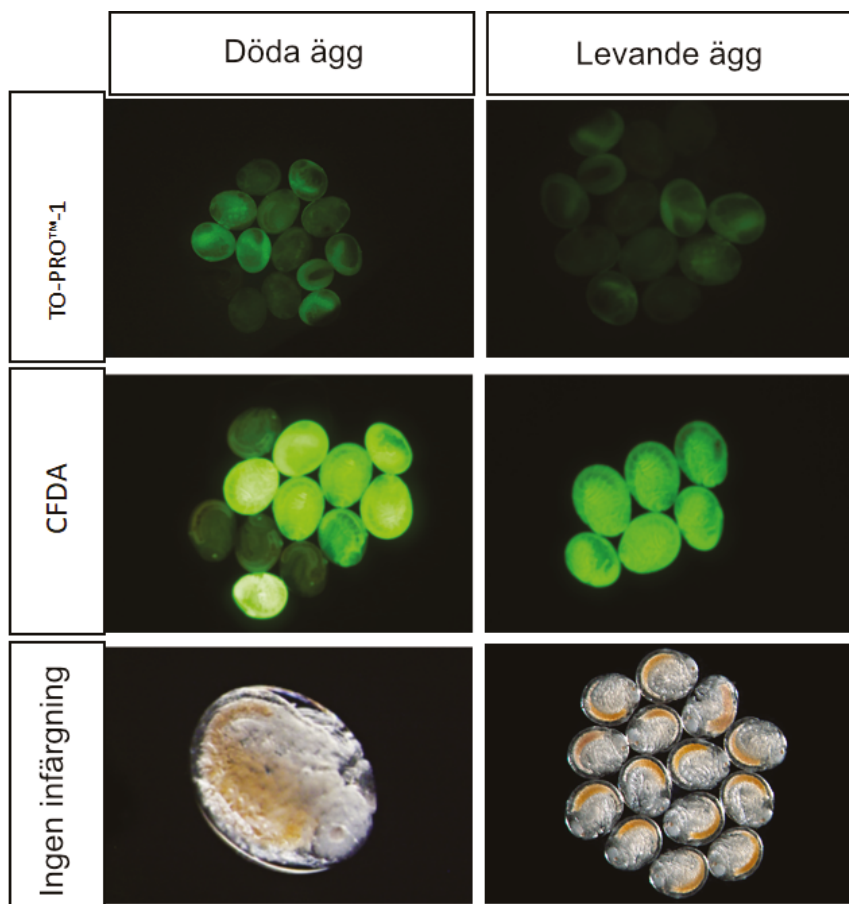
efter behandlingen, vilket gav positiv infärgning trots att inga embryon överlevde och att nekrotiska förändringar kunde ses redan nästa dag. Några falskt negativa resultat observerades däremot inte för de livskraftiga embryona, och ingen autofluorescens noterades (figur 10). CFDA gav alltså en konsekvent signal i livskraftiga embryon men ett mer svårtolkat utfall i icke livskraftiga prover.



Figur 9. Hoppkräftor *Nitocra spinipes* (honor med äggsäckar), färgade med CFDA i hög respektive låg koncentration.

Infärgningen var tydligast vid hög koncentration, medan låg koncentration gav svag eller utebliven signal. Figuren visar också skillnaden mellan levande kontrollindivider från kulturen och värmeavdödade individer. Resultaten visar att CFDA kan ge tydlig infärgning av livskraftiga äggsäckar, men att signalstyrkan är starkt beroende av färgämneskoncentrationen.

Sammantaget fungerade CFDA väl för infärgning av livskraftiga subitanägg hos hoppkräftor och embryon av vitmärlor, men metoden gav också falskt positiva signaler i nyss avdödat material, särskilt hos vitmärlömbryon och i viss mån hos hoppkräftägg. CFDA är därför användbart som screeningmetod, men mindre lämpligt när målet är att med hög säkerhet skilja mellan levande och dött material direkt efter en desinfektionsbehandling. Resultaten ger därmed visst stöd för att använda CFDA för hoppkräftägg, men inte som generell metod för andra stadier. Att även vuxna individer kunde färgas tydligt trots att de inte var livskraftiga är en viktig observation för livskraftsbedömning av djurplankton, även om den inte stod i fokus för denna studie.



Figur 10. Embryon av vitmärlan *Monoporeia affinis*, extraherade från marsupiet, färgades med TO-PRO-1-jodid (övre panelen) och CFDA (mellersta panelen).

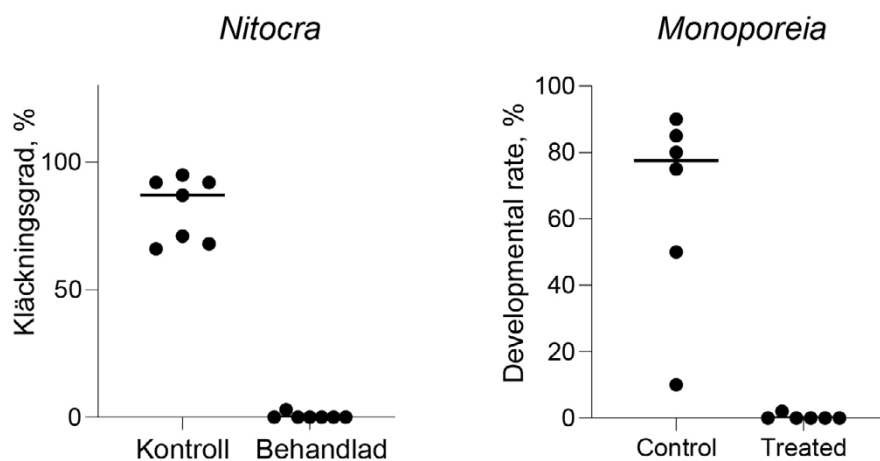
Den nedre panelen visar ofärgade embryon i genomfallande ljus, med ett värmeavdödat nekrotiskt embryo till vänster och friska, livskraftiga embryon till höger.

Neutralrött fungerade mycket väl för veligerlarver av *Mytilus* spp. och *Macoma balthica* insamlade i Östersjön. Mer än 96 % av de livskraftiga individerna färgades efter tre timmars exponering (figur 13). Den tydliga rosa färgen hos levande, aktivt simmande veligerlarver kunde lätt observeras i ljusmikroskop, medan ingen infärgning sågs hos döda individer. För ägg från andra taxa fungerade färgämnet däremot dåligt, sannolikt eftersom dessa saknar utvecklade lysosomer och dessutom skyddas av ett ogenomträngligt chorion. Den långa infärgningstiden begränsar också användbarheten i fält. Exempelvis var infärgningen av hoppkräftägg inkonsekvent; endast omkring 10 % visade svag färgretention och någon tydlig koppling till kläckningsgrad kunde inte ses.

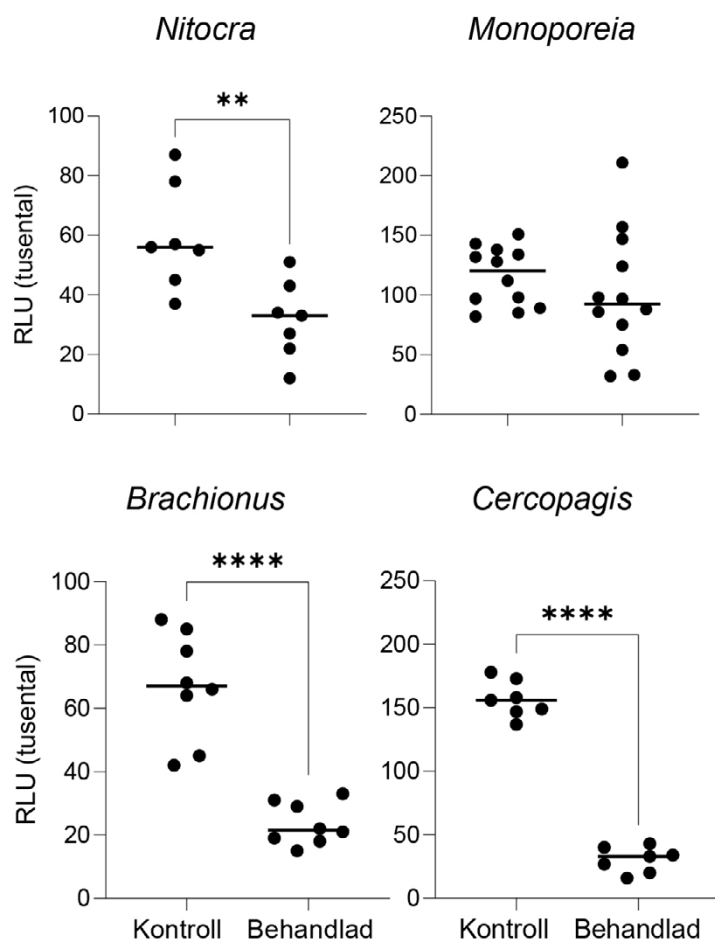
Den positiva funktionen hos neutralrött i veligerlarver kan förklaras av aktiv lysosomal funktion (Repetto m.fl., 2008), som gör att färgämnet ansamlas i sura organeller. Hos ägg saknas däremot ett sådant system, vilket sannolikt förhindrar motsvarande ansamling. Dessutom kan äggskal eller chorion ha fungerat som en fysisk barriär mot färgämnet, även om detta inte kunde verifieras säkert eftersom lysosomal aktivitet var svag eller saknades. Resultaten visar därför att neutralrött är lämpligt för bedömning av livskraften hos veligerlarver och möjligen även andra födosökande och simmande bentiska larver som uppträder som plankton, men inte för icke-rörliga och metaboliskt vilande stadier som ägg.

Övriga vitala färgämnen, såsom SYTO 9, MitoTracker, PicoGreen och DAPI, visade låg eller obefintlig funktion i ägg med utvecklade integument. SYTO 9 kunde inte skilja mellan livskraftiga och icke livskraftiga hoppkraftägg eller vitmärlebryon, medan MitoTracker ibland gav falskt positiva signaler men överlag inte fungerade som indikator på livskraft (figur 14). Den MitoTracker-signal som sågs i värmeavdödade ägg berodde sannolikt inte på biologisk aktivitet utan på ospecifik bindning till skadat eller förändrat äggskal, vilket gav upphov till fluorescensartefakter. För Hoechst 33342, DAPI och PicoGreen sågs ingen penetration alls, inte ens i permeabiliserade ägg.

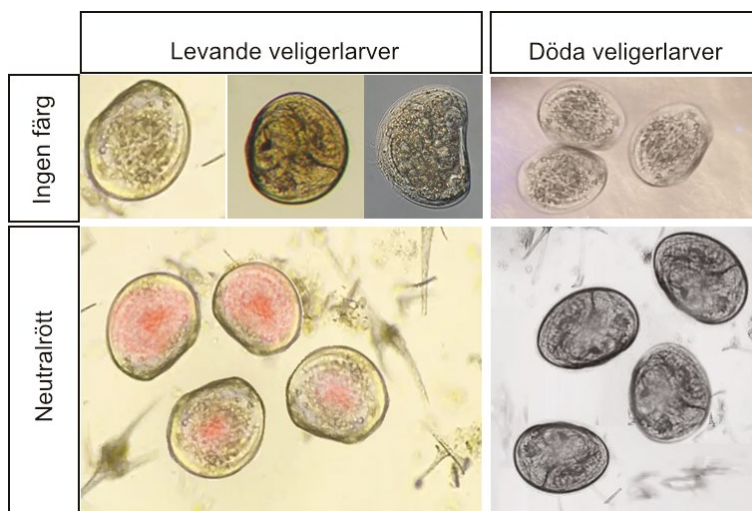
Sammanfattningsvis var CFDA och neutralrött de mest lovande vitala färgämnen, men deras användbarhet var tydligt begränsad till vissa taxa och utvecklingsstadier. CFDA riskerar att ge falskt positiva resultat i nyligen avdödat material, medan neutralrött inte fungerar för icke-rörliga stadier.



Figur 11. Kläckningsgrad för *Nitocra spinipes*-ägg samt andel normala embryon hos *Monoporeia affinis* i kontrollprover och efter värmebehandling.

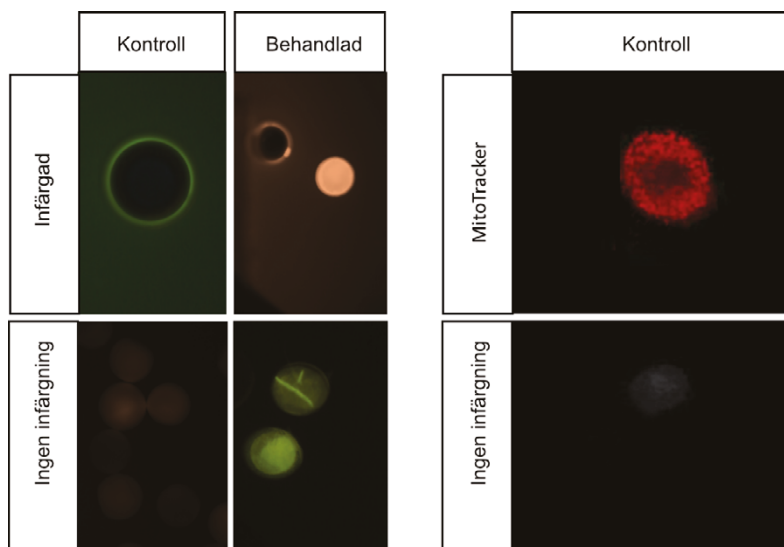


Figur 12. ATP-nivåer i ägg och embryon från *Nitocra spinipes*, *Monoporeia affinis*, *Brachionus plicatilis* och *Cercopagis pengoi* i kontrollprover och behandlade prover.



Figur 13. Neutralrött som indikator på livskraften hos veligerlarver av musslor. Levande veligerlarver (vänstra kolumnen) uppvisar tydlig infärgning med neutralrött, medan döda veligerlarver (högra kolumnen) saknar motsvarande infärgning.

Övre raden visar prover utan infärgning, och nedre raden visar prover efter behandling med neutralrött. Resultaten visar att färgämnet effektivt skiljer mellan levande och döda veligerlarver.



Figur 14. Misslyckad infärgning av ägg med intakta integument. Kontrollproverna har inte utsatts för någon behandling. Behandlade prover har avdödats med värme.

Den aura-liknande infärgningen beror på att ett fluorescerande färgämne (t. ex. PicoGreen, Hoechst 33342 eller SYTO 9) inte kunnat tränga in tillräckligt. Den rödaktiga färgen i det behandlade provet som färgats med MitoTracker (ett vitalt färgämne) är ett falskt positivt resultat. Korrekt infärgning med MitoTracker sågs endast hos cirka 30 % av de snabbt utvecklade hoppkräftäggen (övre vänstra panelen).

3.3.2 Dödcells-färgämnen

TO-PRO-1-jodid gav stark fluorescens i värmeavdödade hoppkräftägg och embryon av vitmärlor, med tydligt högre signal än i levande ägg (medelvärde $120,5 \pm 5,2$ jämfört med $15,3 \pm 2,1$; $p < 0,001$; figur 15). Mer än 60 % av de döda äggen färgades, medan signalen i levande kontroller var låg, vilket visar god specificitet. Däremot fungerade färgämnet inte för vilstadiet med kraftigt skyddande strukturer, såsom ephippier och vilägg hos hoppkräftor.

Hos *Nitocra spinipes* färgades både de döda honorna och deras äggsäckar (figur 15), men signalen var starkast i de icke livskraftiga äggen. Färgningen av honans kropp var svagare, och signalen i levande kontroller var minimal. TO-PRO-1:s förmåga att tränga in i äggskal hos döda ägg speglar sannolikt att membranintegriteten bryts ned vid celledöd, vilket gör att färgämnet kan binda till nukleinsyror. Fluorescenssignalen i döda ägg var dessutom stabil mellan olika behandlingar, utan några signifikanta skillnader mellan kemiskt avdödade och UV-avdödade ägg ($p = 0,45$, ANOVA; data visas ej).

Resultaten visar att TO-PRO-1 är en tillförlitlig markör för att identifiera icke livskraftiga ägg (tabell 9). Samtidigt begränsas användbarheten av att färgämnet inte kan tränga in i ägg med välutvecklade integument, såsom ephippier och vilägg hos hoppkräftor. Dessutom gav excitation vid cirka 500 nm viss autofluorescens från hoppkräftornas kitinösa exoskelett (figur 16), även om detta inte utgjorde något större problem vid mikroskopibaserad analys eftersom signalnivån låg i nivå med den hos levande kontroller.

Anilinblått, analyserat i genomfallande ljus, färgade döda rotatorieägg och hoppkräftors äggsäckar med stark kontrast och mycket få falskt positiva resultat ($< 10\%$) (figur 17). Färgämnet visade viss selektiv affinitet till äggsäckarna, men för

att få tydlig och jämn infärgning av själva äggen krävdes längre exponeringstid. Hos värmeavdödade hoppkräftor var färgningen av kroppen heterogen, vilket sannolikt speglar skillnader i vävnadernas genomtränglighet. Hos levande individer sågs viss färgning i mun- och tarmregionen till följd av att kristaller av anilinblått tagits upp under infärgningen, men detta påverkade inte bedömningen av äggens livskraft.

Bildanalysen visade att färgintensiteten i äggsäckarna hos *Nitocra spinipes* var signifikant högre i värmeavdödade prover än i levande kontroller (medelvärde \pm SD: 150 ± 20 AU jämfört med 30 ± 10 AU; $p < 0,001$, t-test). Detta visar att anilinblått har stark affinitet till äggsäcksstrukturer hos icke livskraftiga ägg, sannolikt därför att värmebehandlingen ökat genomträngligheten eller förändrat den strukturella integriteten. Hos levande individer var färgintensiteten låg, även om viss variation förekom beroende på ljusförhållanden i synfältet och färgning i tarmregionen nära äggsäckarna.

För rotatorieägg var färgintensiteten också signifikant högre i värmeavdödade prover än i levande kontroller (45 ± 13 AU jämfört med 21 ± 8 AU; $p < 0,05$, t-test). Skillnaden var dock mindre än för *Nitocra*, vilket tyder på att anilinblått har svagare affinitet till denna äggtyp, möjligen på grund av lägre permeabilitet eller lägre proteininnehåll.

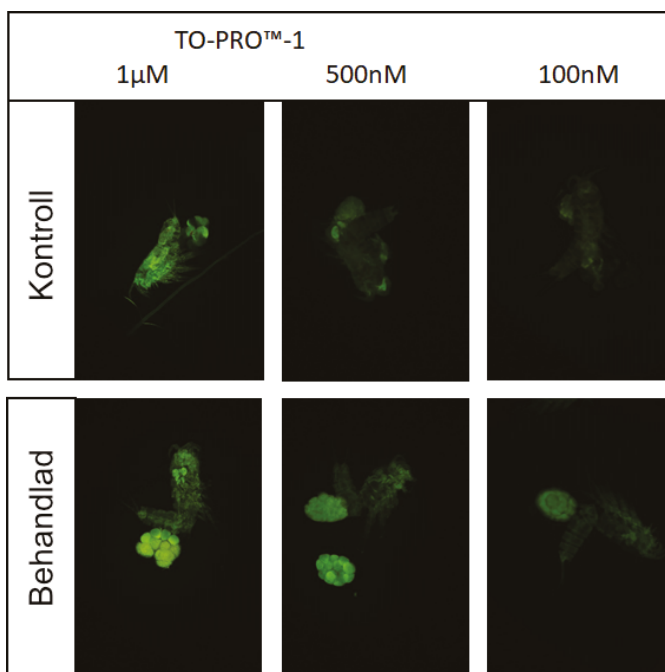
Resultaten visar både möjligheter och begränsningar för anilinblått vid bedömning av äggens livskraft. Under fluorescensmikroskopi var signalnivåerna likartade i behandlade och obehandlade prover, vilket visar att fluorescensbaserad detektion inte är lämplig för detta färgämne. En fortsatt optimering av protokollet kan möjligen förbättra färgningens homogenitet och träffsäkerhet.

Övriga dödcellsfärgämnen som testades – propidiumjodid, SYTOX Green, Trypanblått och 7-AAD – kunde inte tränga igenom äggens integument, inte ens i värmeavdödat material. Deras molekylära egenskaper, såsom storlek, laddning och hydrofilicitet, har sannolikt förhindrat diffusion genom täta, tvärbundna strukturer som ephippier och viläggsskal. TUNEL-analysen, som annars är användbar för att påvisa apoptotiska celler, bedömdes inte vara tillämpbar för ägg på grund av stora reagensmolekyler och ett tekniskt komplicerat protokoll. Ingen signal kunde detekteras i de få försök som genomfördes, och metoden togs därför inte vidare.

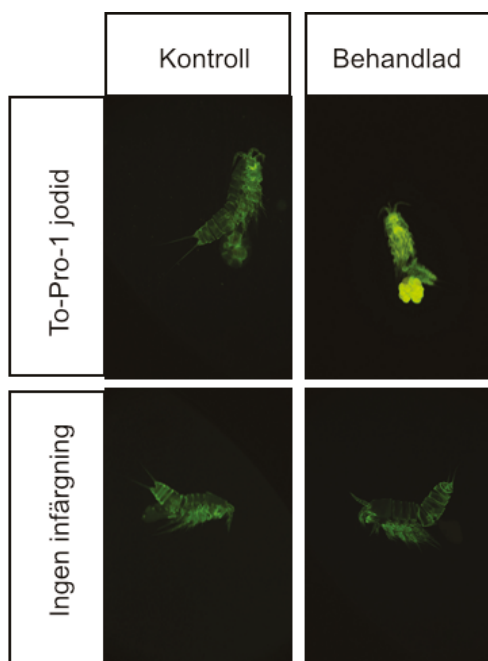
Sammanfattningsvis var TO-PRO-1 och anilinblått de mest användbara dödcellsfärgämnen. De fungerade för att identifiera dött material hos taxa med mer genomträngliga integument, men var inte användbara för stadier med kraftigt utvecklade skyddsstrukturer.

Tabell 9. Infärgningseffektivitet för TO-PRO-1-jodid i testprover med värmeavdödade hoppkräftor (Döda; 100 %), kontrollprover (Levande; 100 %) samt ett blandprov bestående av 50 % levande och 50 % döda individer. Utfallet av infärgningen angavs som andelen individer (%) med tydlig, starkt grön fluorescens.

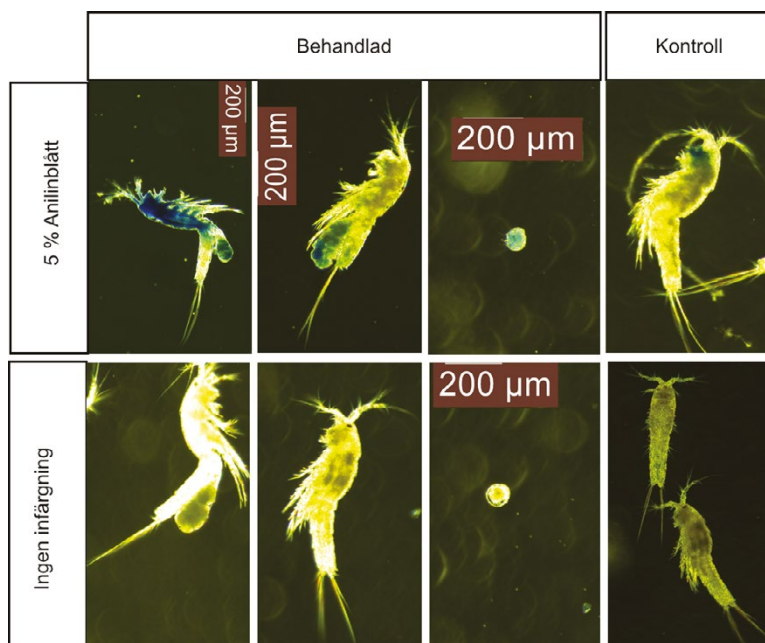
Provtyp	Andel i provet (%)	Infärgade (%)	Ej infärgade (%)
Döda	100	94	5,9
Blandprov 50/50	50	55	45
Levande	100	25	75



Figur 15. Hoppkräftor *Nitocra spinipes* (honor med äggsäckar), färgade med TO-PRO-1-jodid i olika koncentrationer. Kontrollproverna utgjordes av levande honor från kulturen, medan de behandlade proverna bestod av värmeavdödade individer som exponerats i 3 minuter vid 90 °C i vattenbad. Den optimala testkoncentrationen var 1 µM, vilket framgår av den starka och jämna fluorescensen, medan de levande kontrollerna uppvisade endast minimal infärgning vid samtliga testade koncentrationer.



Figur 16. Infärgningen med TO-PRO-1-jodid i kontrollproverna (levande honor med äggsäckar) var signifikant lägre än i de värmeavdödade honorna och skilde sig statistiskt inte från autofluorescensen hos de ofärgade individerna, oavsett deras livskraftstatus. Autofluorescensen i äggsäckarna var genomgående lägre än fluorescensen från honans kropp.



Figur 17. Infärgning av värmeavdödade (behandlade) och levande (kontroll) *Nitocra spinipes* samt *Brachionus plicatilis* med 5 % Anilinblått.

Äggsäckarna hos de värmeavdödade individerna färgades tydligt blå, vilket visar att Anilinblått har selektiv affinitet till äggsäcksstrukturer. Kontrollproverna och de ofärgade individerna uppvisade däremot ingen synlig infärgning, med undantag för munregionen (övre högra panelen), vilket tyder på att kristaller av Anilinblått kan ha tagits upp under infärgningsproceduren. Även enskilda ägg (hjuldjur; högra panelen i gruppen Behandlade) uppvisade tydlig infärgning.

3.4 Jämförelse med BallastWISE-systemet

För att bedöma om fluorescensbaserad livskraftsanalys kan användas under de förhållanden som råder vid hamnstatskontroll utvärderades de färgämnen som fungerat bäst i laboratorieförsöken (CFDA, TO-PRO-1-jodid och Anilinblått) i BallastWISE-systemet. För CFDA och TO-PRO-1-jodid återgav BallastWISE i stort sett de fluorescensmönster som observerats vid mikroskopering, men metodens diagnostiska säkerhet begränsades av instrumentets nuvarande filterinställningar och av bakgrundsfluorescens. Resultaten visar därmed att systemet har tydlig potential för denna typ av analys, men också att tekniska anpassningar krävs för att metoden ska fungera tillförlitligt i praktisk tillämpning.

3.4.1 Instrumentanpassningar som genomfördes inom VIABLEGG-projektet

För att BallastWISE-systemet skulle kunna användas för livskraftsbedömning av icke-rörliga stadier hos ryggradslösa djur genomfördes flera instrumentanpassningar. Systemet var ursprungligen utvecklat för att detektera autofluorescerande plankton och använder därför en excitationsskälla vid 420 nm samt ett emissionsfilter med högpass vid 590 nm (figur 2). Denna konfiguration var mindre lämplig för CFDA och TO-PRO-1-jodid, eftersom dessa färgämnen emitterar i det gröna området av spektrumet (510–540 nm) och därmed till stor del ligger utanför standardfiltrets detektionsområde. Instrumentets gråskalkamera begränsade dessutom möjlig-

heten att tolka färgspecifika signaler som under vanlig mikroskopering hade kunnat underlätta detektion av infärgning med Anilinblått.

För att förbättra anpassningen till dessa färgämnen infördes inom projektet en andra excitationsskanal vid 500 nm. Därigenom uppnåddes bättre överensstämmelse med excitationsspektra för CFDA och TO-PRO-1. Det befintliga emissionsfiltret (≥ 590 nm) kunde däremot inte bytas ut inom den aktuella testuppställningen, vilket innebar att grön fluorescens – där dessa färgämnen har sitt starkaste emissionsmaximum endast fångades upp delvis. En del av signalen kunde fortfarande registreras genom spektral överlapp, men en stor del dämpades eller försköts, vilket minskade både kontrast och diagnostisk tydlighet.

Trots denna begränsning kunde systemet registrera övergripande skillnader i fluorescensintensitet mellan levande prover infärgade med CFDA och döda prover infärgade med TO-PRO-1. Det visar att de grundläggande principerna för infärgningsbaserad livskraftsbedömning är förenliga med automatiserad bildanalys. Att dessa skillnader kunde urskiljas trots icke optimala filterinställningar är lovande och visar att instrumentet har potential att anpassas för detta ändamål.

Vid hamnstatskontroll, där provvolymerna ofta överstiger 50 mL och resultaten måste kunna tas fram snabbt, har BallastWISE tydliga fördelar genom sin möjlighet till Realtidsanalys. För att systemets potential ska kunna utnyttjas fullt ut rekommenderas ytterligare två anpassningar: dels att alternativa eller utbytbara emissionsfilter införs, särskilt i intervallet 480–550 nm, för att möjliggöra analys av färgämnen med grön fluorescens, dels att provgenomströmning och flödesvägar optimeras så att större volymer kan hanteras effektivt utan att upplösning och objekt-detektion försämras. Det går inte att ändra eller ta bort 590 nm-filtret under pågående analys, men ytterligare högpåpassfilter skulle kunna installeras och användas. Med sådana förbättringar bör BallastWISE kunna anpassas för högkapacitetsbaserad livskraftsbedömning inom hamnstatskontroll.

3.4.2 Färgämnenas prestanda i BallastWISE-utvärderingarna

Färgämnenas prestanda, CFDA (vitalfärgämne) och TO-PRO-1-jodid (dödcells-färgämnen), skilde sig tydligt mellan laboratoriebaserad mikroskopi och analyser med BallastWISE. Resultaten visar både möjligheterna och de nuvarande begränsningarna med att använda automatiserade system för livskraftsbedömning av icke-rörliga stadier. Båda färgämnen bedömdes ha potential för användning inom hamnstatskontroll, men BallastWISE-systemets optiska konfiguration, provens egenskaper och bakgrundsfluorescens påverkade både signalstyrkan och möjligheten att skilja mellan levande och döda individer.

För CFDA var skillnaden mellan levande och döda individer tydlig vid mikroskopibaserad analys, där infärgningseffektiviteten översteg 90 % och fluorescenssignalen var ungefär tolv gånger högre i levande organismer, i enlighet med färgämnets enzymatiska aktivering. I BallastWISE minskade denna kontrast däremot till omkring 1,6 gånger, med stor variation mellan proverna. Variationen kan kopplas till provens kondition, barriäreffekter från integumentet och att detektionsförhållandena inte var optimala.

Ett liknande mönster sågs för TO-PRO-1-jodid. Vid mikroskopering var fluorescenssignalen ungefär tio gånger högre i döda än i levande prover, medan skillnaden i BallastWISE endast uppgick till cirka tre gånger. Även här överlappade

signalnivåerna delvis mellan grupperna. För Anilinblått, som fungerade väl i ljusmikroskopi, gick det däremot inte att göra någon meningsfull utvärdering i BallastWISE, eftersom färgämnets spektrala egenskaper inte passade instrumentets optiska inställningar. Bakgrundsfluorescens, särskilt i behandlade prover och i ägg med komplex struktur, försvårade dessutom den automatiserade detektionen ytterligare. Resultaten visar sammantaget att säkrare livskraftsbedömningar i regulatoriska sammanhang kräver bättre filteranpassning, protokoll som är optimerade för respektive färgämne och möjligen kombinationer av olika analysmetoder.

Fluorescensresponsen hos de infärgade prover som analyserades med BallastWISE uppvisade överlag stor variation (figur 19). Denna variation gjorde det svårt att på ett tillförlitligt sätt skilja mellan levande och döda organismer (figur 20), vilket begränsar möjligheten att dra säkra slutsatser om färgämnenas faktiska prestanda. Nedan följer en bedömning av resultaten för respektive färgämne.

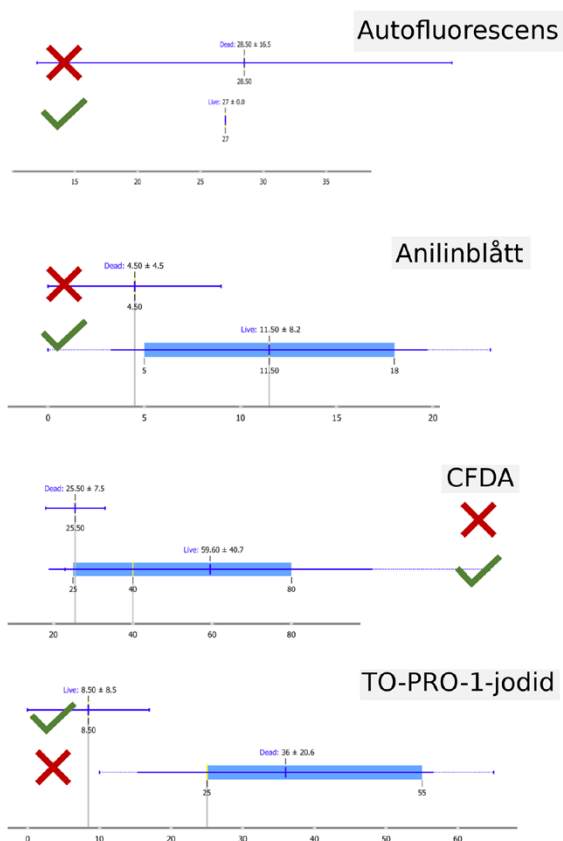
Ofärgade kontroller. Fluorescensintensiteten i de ofärgade kontrollerna var likartad i levande ($27 \pm 0,2$) och döda prover ($28,5 \pm 16,5$), vilket visar att autofluorescens är ett betydande problem. Att testorganismerna uppvisade en tydlig bakgrundsfluorescens, särskilt med stor variation i de döda proverna, försvårar tolkningen av vilken del av signalen som faktiskt härrör från färgämnet. Autofluorescens behöver därför alltid beaktas för att färgspecifika signaler ska kunna tolkas korrekt.

CFDA. Infärgning med CFDA resulterade i högre medelfluorescens i levande prover ($53 \pm 4,6$) än i döda ($32,6 \pm 6,4$), vilket överensstämmer med att färgämnet aktiveras i metaboliskt aktiva celler. Samtidigt var variationen stor och signalintervallen överlappade delvis, vilket begränsar möjligheten att använda färgämnet för säker klassificering av enskilda individer. Resultaten tyder ändå på att CFDA kan ha värde som indikator på relativ livskraft på gruppnivå, även om den diagnostiska säkerheten på individnivå är otillräcklig i systemets nuvarande form.

TO-PRO-1-jodid. För detta färgämne registrerades högre fluorescens i döda prover ($66,8 \pm 17,4$) än i levande ($22,8 \pm 3,9$), vilket stämmer med att färgämnet bara ska kunna ta sig in i celler med skadade membran. Skillnaden mellan grupperna var tydligare än för CFDA, men överlappning och variation förekom även här. TO-PRO-1-jodid framstår därför som mer lovande för automatiserad detektion av döda organismer, men resultaten visar samtidigt att ytterligare optimering krävs innan metoden kan användas robust.

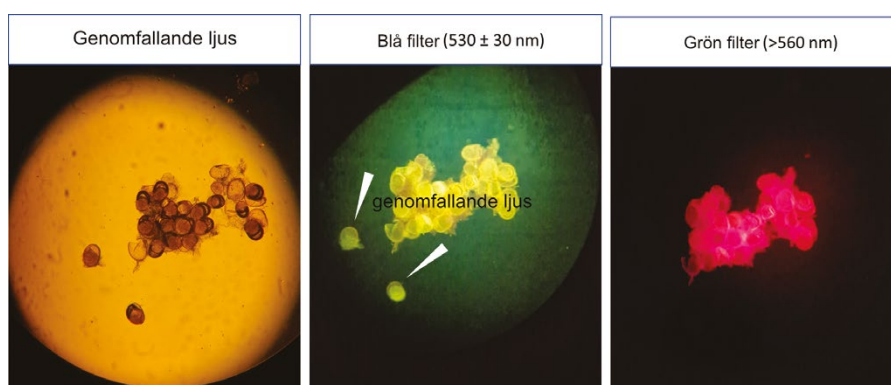
Anilinblått. För Anilinblått gick det inte att urskilja någon tydlig skillnad mellan levande och döda prover i BallastWISE. Detta stämmer med de optiska begränsningar som identifierades i systemet. Färgämnet fungerade under ljusmikroskopi, men eftersom BallastWISE är utvecklat för fluorescensbaserad detektion och använder en gråskalekamera kunde signalen inte återges på ett användbart sätt. Metoden bedöms därför inte vara tillämpbar i systemets nuvarande konfiguration.

Sammantaget visar resultaten att BallastWISE kan registrera övergripande skillnader mellan levande och döda prover när CFDA och TO-PRO-1-jodid används, men att variationen i signalstyrka och den höga bakgrundsfluorescensen fortfarande begränsar metodens tillförlitlighet. TO-PRO-1-jodid gav den tydligaste separationen mellan grupperna och framstår därför som det mest lovande alternativet för fortsatt utveckling inom automatiserad livskraftsbedömning.



Figur 18. Relativ fluorescensintensitet (x-axeln) för de testade färgämnen (Anilinblått, CFDA och TO-PRO-1-jodid) applicerade på prover med hoppkräftor och hinnkräftor samt för ofärgade prover (det vill säga autofluorescens).

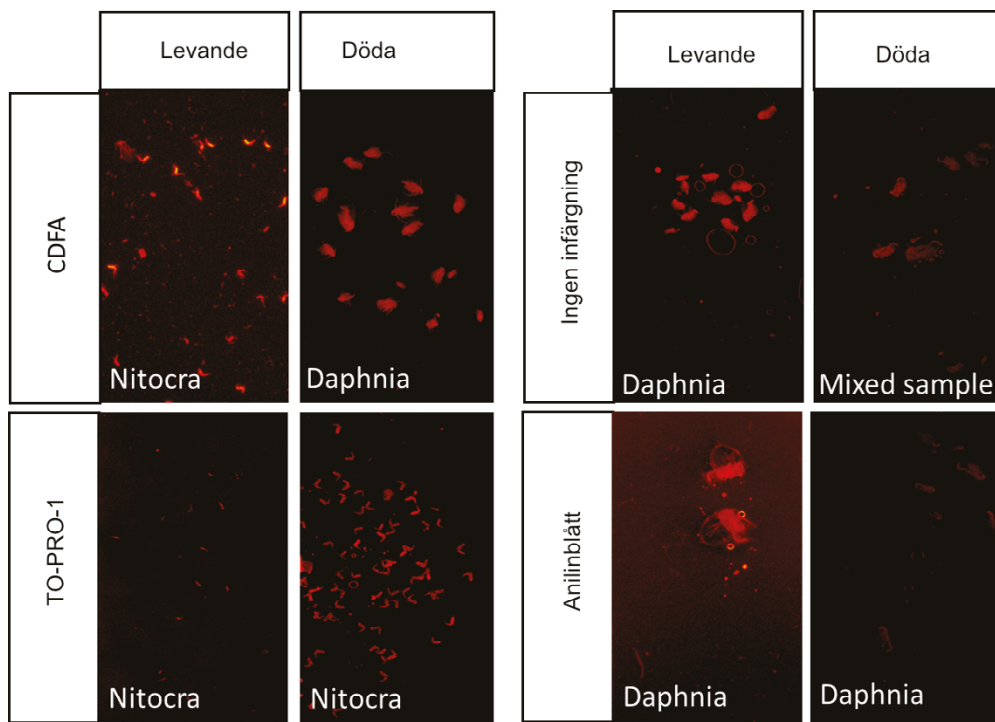
I diagrammen markerar det röda krysset (X) datapunkter för döda individer, medan den gröna bocken (✓) markerar levande individer. Boxarna anger 25:e och 75:e percentilen, medel- och medianvärden markeras med vertikala linjer och minimi- respektive maximivärden med horisontella linjer.



Figur 19. Hjuldjursägg färgade med TO-PRO-1 och avbildade i mikroskop med olika filter för att tydliggöra infärgningsmönstret.

Den vänstra panelen visar äggen i genomfallande ljus, där deras övergripande struktur och inbördes placering framgår. Den mellersta panelen visar äggen med blåfilter (530 ± 30 nm), vilket framhäver den fluorescens från TO-PRO-1 (emissionstopp 533 nm) som avges i permeabiliserade celler. Den högra panelen visar äggen med grönt filter (> 560 nm), vilket registrerar den dominerande röda fluorescenssignal som TO-PRO-1 avger i den röda delen av spektrumet. Bilderna visar att visualiseringen av TO-PRO-1-infärgningen är starkt beroende av vilket filter som används.

Pilspetsarna i den mellersta panelen markerar två ägg som huvudsakligen syns som gröna men inte framträder med grönt filter, eftersom den röda delen av det emitterade ljusspektrumet är för svag för att kunna observeras i den högra panelen.



Figur 20. Levande och döda djurplanktonindivider (*Nitocra spinipes*, *Daphnia magna* och en blandning av dessa) färgade med CFDA, TO-PRO-1-jodid eller Anilinblått samt motsvarande ofärgade kontroller, tagna med BallastWISE-systemet.

Varje par med levande och döda individer avbildades vid samma excitationsvåglängd (420 eller 500 nm). CFDA och TO-PRO-1-jodid gav fluorescensmönster som gjorde det möjligt att skilja mellan levande och döda individer, medan signalerna från Anilinblått och de ofärgade kontrollerna överlappade, vilket speglar problem med bakgrundsautofluorescens och bristande filteranpassning. För denna figur valdes de bildpar som gav tydligast kontrast mellan levande och döda individer. Den faktiska variationen i infärgningsintensitet visas i figur 19.

4. Slutsatser och rekommendationer

VIABLEGG-projektet har bidragit med viktig ny kunskap om en komplex och angelägen fråga inom barlastvattenhantering: hur livskraft hos icke-rörliga livsstadier hos ryggradslösa djur kan bedömas. Genom en bred utvärdering av infärgningsmetoder, provberedning och analytiska verktyg har projektet byggt upp ett unikt underlag och en praktisk erfarenhetsbas som utgör en stabil grund för fortsatt metodutveckling och vidareutveckling av regelverk.

Projektet etablerade en robust experimentell plattform, prövade ett stort antal infärgningsmetoder och gav viktiga insikter om de biologiska och tekniska begränsningar som försvårar utvecklingen av generella metoder för livskraftsbedömning. Den systematiska utvärderingen av färgämnen och provberedningsprotokoll, liksom kombinationen av mikroskopi, metabola indikatorer och högkapacitetssystem såsom BallastWISE, innebär viktiga metodologiska framsteg.

Samtidigt visade projektet tydligt att det för närvarande inte är realistiskt att ta fram en generellt tillämplig och tillförlitlig metod för livskraftsbedömning av hårdskaliga, icke-rörliga stadier. Även om CFDA och TO-PRO-1-jodid fungerade väl för vissa taxa gav inget färgämne tillräckligt tillförlitliga resultat för alla testade livsstadier. Den stora variationen i integumentens uppbyggnad och genomtränglighet, tillsammans med den låga metaboliska aktiviteten hos många vilstadier, utgör stora hinder både för infärgning och för detektion. Till och med de mest lovande färgämnen, såsom CFDA och TO-PRO-1-jodid, gav ojämna resultat mellan olika taxa och fungerade inte för inkapslade eller diapauserande stadier. Behovet av omfattande förbehandling för att förbättra färgämnenas penetration ledde dessutom ofta till minskad livskraft eller till artefakter.

Resultaten visar alltså både problemets komplexitet och begränsningarna i dagens metoder, men de ger också en tydligare riktning för det fortsatta arbetet. En central slutsats är att effektiva vitala färgämnen behövs för att livskraftiga, icke-rörliga stadier ska kunna identifieras på ett tillförlitligt sätt dvs något som morfologiska eller ATP-baserade proxyvariabler inte kan åstadkomma. I stället för att eftersträva en universell lösning bör fortsatt forskning och framtida regleringsarbete inriktas på art- eller grupp-specifika metoder för livskraftsbedömning, baserade på vitala färgämnen och utvecklade med realistiska förväntningar på hur de kan användas inom hamnstatskontroll och i regulatoriska sammanhang.

4.1 Behovet av vitala färgämnen för att uppfylla kraven i regel D-2

Regel D-2 i BWMC kräver att koncentrationen av livskraftiga organismer i barlastvatten kan bestämmas på ett korrekt sätt för att efterlevnad ska kunna verifieras och biologiska invasioner förebyggas. Dödcells-färgämnen, som används för att identifiera icke livskraftiga organismer, kan visserligen vara användbara för att till exempel bedöma behandlingseffektivitet, men de ger inte tillräckligt underlag för att uppfylla regelverkets krav på att fastställa koncentrationen av livskraftiga organismer. I teorin skulle skillnaden mellan det totala antalet organismer före infärgning och antalet icke livskraftiga organismer efter infärgning kunna användas som ett indirekt mått på antalet livskraftiga organismer. I praktiken är detta dock förenat med flera problem och regulatoriska svårigheter (Outinen m.fl., 2024), vilket gör att metoder som enbart bygger på dödcells-färgämnen inte är tillräckliga för efterlevnadskontroll.

- För det första ger de inte ett tillräckligt tydligt underlag för att visa efterlevnad. Regel D-2 är uttryckligen inriktad på kvantifiering av livskraftiga organismer, och identifiering av icke livskraftiga individer ger inte direkt information om den livskraftiga delen av populationen.
- För det andra skapar denna typ av indirekt tolkning osäkerhet i tillsynsarbetet. Tillsynsmyndigheter behöver tydliga och försvarbara underlag för att kunna fatta konsekventa beslut.
- För det tredje är sådana arbetssätt operativt komplicerade, eftersom de kräver noggrann totalräkning, efterföljande infärgning och en metodik som är tillräckligt robust för att fungera under fältförhållanden. Den typen av komplexitet är svår att förena med de krav på snabbhet, enkelhet och robusthet som gäller vid praktisk hamnstatskontroll.

Mot denna bakgrund är det nödvändigt att utveckla direkta metoder som kvantifierar just livskraftiga organismer.

4.2 Särskilda rekommendationer

VIABLEGG-projektet har tydliggjort problemets omfattning och samtidigt visat att det finns praktiskt användbara angreppssätt för vissa utvalda taxa, även om en generell metod fortfarande ligger utom räckhåll. Resultaten bör därför användas både för att förbättra befintliga protokoll och för att utforma framtida lösningar inom barlastvattenhantering. Lovande metoder bör dessutom testas mellan olika laboratorier och under olika miljöförhållanden för att säkerställa reproducerbarhet och robusthet.

4.2.1 För forskning

Utvecklingen bör i första hand inriktas på taxonspecifika metoder. Den stora strukturella och biokemiska variationen mellan olika icke-rörliga livsstadier, särskilt vilägg och inkapslade former, gör att arbetet bör lämna ambitionen att hitta en universell metod. I stället bör verktyg för livskraftsbedömning tas fram för specifika taxa eller funktionella grupper som är särskilt relevanta för övervakning och hantering av barlastvatten. Metoder som bygger på osmotisk obalans (Zirbel m.fl., 2007) visar också att cellkärnor i formalinfixerade hoppkraftäggar kan färgas med semipermeabla färgämnen som DAPI och PicoGreen utan att chorion förstörs. Detta kan ge en användbar utgångspunkt i sökandet efter bärare för färgämnen och andra angreppssätt som underlättar passage genom äggskalet.

Infärgningsprotokollen behöver samtidigt förbättras och breddas.

Forskningen bör fokusera på kombinationer av förbehandling och infärgning som möjliggör tillförlitlig livskraftsbedömning utan att provets integritet försämras. Det innebär bland annat att enzymatiska och kemiska behandlingar behöver förfinas så att genomträngligheten ökar på ett kontrollerat och reproducerbart sätt, samtidigt som bakgrundsautofluorescens minskas. Kombinationer av flera färgämnen och nya sätt att leverera färgämnen, till exempel med hjälp av nanopartiklar (Shin m.fl., 2022), kan också ge en mer komplett bild av variationen i livskraft inom ett prov. En kombination av TO-PRO-1 och CFDA kan till exempel ge kompletterande information om membranintegritet respektive metabol aktivitet (Gorokhova, 2010; Gorokhova m.fl., 2012).

Det finns också skäl att **undersöka andra indikatorer på livskraft än färgning**. Biomarkörer som metabol enzymaktivitet eller induktion av stressproteiner skulle kunna ge mer känsliga och stadienanpassade mått på livskraft, förutsatt att snabba analyser kan utvecklas för användning inom hamnstatskontroll.

Slutligen **bör automatiserad och halvautomatiserad analys vidareutvecklas**. Bildanalysverktyg med hög kapacitet, såsom de som används i Ballast-WISE, bör anpassas för objektiv kvantifiering av infärgningsrespons. Algoritmer som känner igen specifika taxa och fluorescensmönster kopplade till livskraft kan minska operatörsberoende och bidra till ökad standardisering.

4.2.2 För hamnstatskontroll av barlastvatten

Där det är möjligt bör livskraftsindikatorer baserade på färgämnen integreras i efterlevnadskontrollen. Även om färgämnen som CFDA och TO-PRO-1-jodid inte ger tillförlitliga resultat för alla taxa och alla äggtyper, särskilt inte för diapauserande eller inkapslade stadier, utgör de ett värdefullt komplement till de indikativa analysmetoder som redan används inom hamnstatskontroll. När de används för taxa där prestandan har validerats kan de bidra till snabba och praktiskt genomförbara bedömningar av livskraft och hjälpa till att identifiera prover med förhöjd risk som bör undersökas vidare. Deras användning bör därför uppmuntras som en praktisk avvägning mellan snabbhet, tillgänglighet och diagnostiskt värde, men med tydlig vägledning om tolkning och begränsningar.

Det finns också behov av att utveckla praktiska arbetsflöden där färgning kombineras med mikroskopi eller annan bildanalys och med verktyg för klassificering. Halvautomatiserade arbetssätt av detta slag kan utgöra en rimlig kompromiss mellan genomförbarhet och noggrannhet. Pilotförsök vid utvalda hamnar kan bidra till att definiera vilka operativa protokoll och logistiska lösningar som krävs.

För att sådana metoder ska fungera i praktiken behöver inspektörer dessutom utbildas i att känna igen relevanta taxa och tolka signaler från livskraftsbedömningen. Effekten av varje infärgningsmetod är beroende av att rätt livsstadier identifieras och att resultaten tolkas på ett konsekvent sätt. Det bör därför tas fram utbildningsmaterial och vägledningar som stärker enhetlighet och tillförlitlighet i tillsynen.

4.2.3 För regulatoriska myndigheter

Vägledningar och protokoll bör uppdateras så att de bättre återspeglar de begränsningar som finns vid bedömning av icke-rörliga stadier och så att rekommendationer om kompletterande metoder, exempelvis vital infärgning, inkluderas. Regel D-2 bör ta hänsyn till begränsningarna i dagens metoder för livskraftsbedömning, särskilt för icke-rörliga livsstadier. Nuvarande regelverk inom BWMC bygger i hög grad på storleksbaserade gränsvärden för livskraftiga organismer. VIABLEGG-projektet visar dock att ägg som ser likadana ut och tillhör samma storleksklass ändå kan skilja sig kraftigt åt i faktisk livskraft.

Med tanke på dessa metodologiska begränsningar kan det också vara motiverat att införa interimistiska bedömningskriterier eller beslutstöd för icke-rörliga stadier. Ett sådant arbetssätt skulle kunna bygga på en samlad bevisvärdering där infärgning, morfologiska bedömningar och metabola indikatorer vägs samman.

Det finns dessutom ett tydligt behov av internationell harmonisering. För att säkerställa enhetlig efterlevnadskontroll och jämförbara data mellan hamnar och regioner krävs samordning mellan länder och organisationer. Organ som HEL-COM, IMO och ICES bör därför involveras i arbetet med att etablera gemensamma protokoll och en central databas över validerade metoder för användning av vitala färgämnen och förbehandling, anpassade till prioriterade taxa. Det behövs också interkalibreringar och gemensamma utbildningsinsatser mellan nationella tillsynsmyndigheter för att stärka reproducerbarhet och harmonisering.

5. Tack

Vi vill rikta ett varmt tack till våra kollegor vid Institutionen för miljövetenskap (ACES), Stockholms universitet, för stöd i laboratoriearbetet och vid uppbyggnaden av experimentella system under hela projektet. Vi tackar också våra samarbetspartner vid Institutionen för ekologi, miljö och botanik (DEEP), Stockholms universitet, för hjälp med insamling av plankton och bottenlevande ryggradslösa djur från olika fåltlokaler.

Ett särskilt tack riktas till FoU-teamet vid Alfa Laval för värdefulla bidrag under metodutvecklingen, bland annat praktiska synpunkter på provtagningsflöden och systemintegration. Vi vill också uppmärksamma HELCOM:s expertgrupp för främmande arter, vars återkoppling bidrog till att knyta vårt arbete till pågående policyutveckling.

Vi tackar vidare granskarna av denna rapport för konstruktiva synpunkter som har bidragit till att förtydliga och stärka framställningen av våra resultat.

Slutligen vill vi uttrycka vår uppskattning för det ekonomiska och administrativa stöd som Naturvårdsverket och Formas har gett och som gjorde projektet möjligt.

6. Källor

- Amyot, M., Pinel-Alloul, B., Bastien, C., Méthot, G., Blaise, C., van Coillie, R., Thellen, C., 1992. Firefly assay of ATP from freshwater zooplankton: Comparison of extraction methods. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 7, 295–311. <https://doi.org/10.1002/tox.2530070308>
- Bailey, S.A., 2015. An overview of thirty years of research on ballast water as a vector for aquatic invasive species to freshwater and marine environments. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 18, 261–268. <https://doi.org/10.1080/14634988.2015.1027129>
- Beil, S., Schamberger, A., Naumann, W., Machill, S., van Pée, K.-H., 2012. Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* 87, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.025>
- Blackburn, N., Haecky, P., Jurgensone, I., Griniene, E., Brugel, S., Andersson, A., Carstensen, J., 2022. The use of an automated organism tracking microscope in mesocosm experiments. *Limnol. Oceanogr. Methods* 20, 768–780. <https://doi.org/10.1002/lom3.10521>
- Bradie, J., Gianoli, C., Linley, R.D., Schillak, L., Schneider, G., Stehouwer, P., Bailey, S., 2018. Catch me if you can: Comparing ballast water sampling skids to traditional net sampling. *J. Sea Res., Recent Advances in Ballast Water Research* 133, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.03.009>
- Briski, E., Bailey, S., MacIsaac, H., 2013. Separation strategies for invertebrate dormant stages contained in sediment. *Aquat. Biol.* 18, 209–215. <https://doi.org/10.3354/ab00509>
- Browne, W.E., Price, A.L., Gerberding, M., Patel, N.H., 2005. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *genesis* 42, 124–149. <https://doi.org/10.1002/gene.20145>
- Buttino, I., do Espírito Santo, M., Ianora, A., Miralto, A., 2004. Rapid assessment of copepod (*Calanus helgolandicus*) embryo viability using fluorescent probes. *Mar. Biol.* 145, 393–399. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1317-7>
- Buttino, I., Ianora, A., Carotenuto, Y., Zupo, V., Miralto, A., 2003. Use of the confocal laser scanning microscope in studies on the developmental biology of marine crustaceans. *Microsc. Res. Tech.* 60, 458–464. <https://doi.org/10.1002/jemt.10284>
- Casas-Monroy, O., Brydges, T., Kydd, J., Ogilvie, D., Rozon, R.M., Bailey, S.A., 2023. Examining the performance of three ballast water compliance monitoring devices for quantifying live organisms in both regulated size classes ($\geq 50 \mu\text{m}$ and $\geq 10 - < 50 \mu\text{m}$). *J. Plankton Res.* 45, 540–553. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbad014>
- Couch, K.M., Downes, M., Burns, C.W., 2001. Morphological differences between subitaneous and diapause eggs of *Boeckella triarticulata* (Copepoda: Calanoida). *Freshw. Biol.* 46, 925–933. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00727.x>

- Crespo, D., Solan, M., Leston, S., Pardal, M.A., Dolbeth, M., 2017. Ecological consequences of invasion across the freshwater–marine transition in a warming world. *Ecol. Evol.* 8, 1807–1817. <https://doi.org/10.1002/ece3.3652>
- Delbos, B., Schwarz, M., Ovissipour, R., 2019. *Artemia Culture for Intensive Finfish and Crustacean Larviculture*. Virginia Cooperative Extension, Blacksburg, VA. https://doi.org/10.21061/600-106_CNRE-60P
- Dodson, S.I., Frey, D.G., 2001. Chapter 21. Cladocera and other Branchiopoda, in: Thorp, J.H., Covich, A.P. (Eds.), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 849–913. <https://doi.org/10.1016/B978-012690647-9/50022-3>
- Drake, L.A., Tamburri, M.N., First, M.R., Smith, G.J., Johengen, T.H., 2014. How many organisms are in ballast water discharge? A framework for validating and selecting compliance monitoring tools. *Mar. Pollut. Bull.* 86, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.034>
- First, M.R., Robbins-Wamsley, S.H., Riley, S.C., Grant, J.F., Molina, V., Wier, T.P., 2022. None detected: What “zero” indicates in direct counts of aquatic microorganisms in treated ballast water. *Front. Mar. Sci.* 9, 1034386. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1034386>
- Gorokhova, E., 2010. A single-step staining method to evaluate egg viability in zooplankton: Nonvital staining of zooplankton eggs. *Limnol. Oceanogr. Methods* 8, 414–423. <https://doi.org/10.4319/lom.2010.8.414>
- Gorokhova, E., Mattsson, L., Sundström, A.M., 2012. A comparison of TO-PRO-1 iodide and 5-CFDA-AM staining methods for assessing viability of planktonic algae with epifluorescence microscopy. *J. Microbiol. Methods* 89, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.005>
- Guerrero-Jiménez, G., Ramos-Rodríguez, E., Silva-Briano, M., Adabache-Ortiz, A., Conde-Porcuna, J.M., 2020. Analysis of the morphological structure of diapausing propagules as a potential tool for the identification of rotifer and cladoceran species. *Hydrobiologia* 847, 243–266. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04085-0>
- Holmstrup, M.E., Haecky, P., Blackburn, N., 2020. Preliminary verification studies of the motility and fluorescence assay (MFA) for ballast water quality monitoring. *J. Sea Res.* 159, 101889. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2020.101889>
- Ianora, A., Scotto di Carlo, B., Mascellaro, P., 1989. Reproductive biology of the planktonic copepod *Temora stylifera*. *Mar. Biol.* 101, 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF00391457>
- Ishigaki, M., Kawasaki, S., Ishikawa, D., Ozaki, Y., 2016. Near-Infrared Spectroscopy and Imaging Studies of Fertilized Fish Eggs: In Vivo Monitoring of Egg Growth at the Molecular Level. *Sci. Rep.* 6, 20066. <https://doi.org/10.1038/srep20066>
- Kumar, S.S., Ghosh, A.R., 2019. Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges. *Microbiol. Read. Engl.* 165, 593–610. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000786>
- Lewandowska, K., 2012. Surface studies of microcrystalline chitosan/poly(vinyl alcohol) mixtures. *Appl. Surf. Sci.* 263, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.09.011>

- Outinen, O., Bailey, S.A., Casas-Monroy, O., Delacroix, S., Gorgula, S., Griniene, E., Kakkonen, J.E., Srebaliene, G., 2024. Biological testing of ships' ballast water indicates challenges for the implementation of the Ballast Water Management Convention. *Front. Mar. Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1334286>
- Peperzak, L., Casas-Monroy, O., Bailey, S.A., 2024. Validation of an adenosine triphosphate (ATP) model for 10–50 µm plankton. *Mar. Pollut. Bull.* 200, 116066. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116066>
- Poulet, S.A., Laabir, M., Ianora, A., Miralto, A., 1995. Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. I. Abnormal embryonic and naupliar development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 129, 85–95. <https://doi.org/10.3354/meps129085>
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Romano, G., Russo, G.L., Buttino, I., Ianora, A., Miralto, A., 2003. A marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos. *J. Exp. Biol.* 206, 3487–3494. <https://doi.org/10.1242/jeb.00580>
- Romero-Martínez, L., Van Slooten, C., Van Harten, M., Nebot, E., Peperzak, L., 2024. Comparative assessment of four ballast water compliance monitoring devices with natural UV-treated water using IMO's monitoring approaches. *Mar. Pollut. Bull.* 209, 117193. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.117193>
- Serra, M., García-Roger, E.M., Ortells, R., Carmona, M.J., 2019. Cyclically parthenogenetic rotifers and the theories of population and evolutionary ecology. *Limnetica* 38, 67–93. <https://doi.org/10.23818/limn.38.13>
- Shin, H.J., Kwak, M., Joo, S., Lee, J.Y., 2022. Quantifying fluorescent nanoparticle uptake in mammalian cells using a plate reader. *Sci. Rep.* 12, 20146. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24480-3>
- Sundelin, B., Eriksson, A.-K., 1998. Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 171, 165–180.
- Van Slooten, C., Wijers, T., Buma, A.G.J., Peperzak, L., 2015. Development and testing of a rapid, sensitive ATP assay to detect living organisms in ballast water. *J. Appl. Phycol.* 27, 2299–2312. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0518-9>
- Wanninger, A., Wollesen, T., 2019. The evolution of molluscs. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 94, 102–115. <https://doi.org/10.1111/brv.12439>
- Zetsche, E.-M., Meysman, F.J.R., 2012. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *J. Plankton Res.* 34, 493–509. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs018>
- Zirbel, M.J., Miller, C.B., Batchelder, H.P., 2007. Staging egg development of marine copepods with DAPI and PicoGreen®. *Limnol. Oceanogr. Methods* 5, 106–110. <https://doi.org/10.4319/lom.2007.5.106>

7. Publikationer och datatillgänglighet

7.1 Vetenskapligt granskade publikationer

Blackburn, N., Haecky, P., Jurgensone, I., Griniene, E., Brugel, S., Andersson, A., Carstensen, J., 2022. The use of an automated organism tracking microscope in mesocosm experiments. *Limnol. Oceanogr. Methods* 20.

Gorokhova E., El-Shehawy, R., Luecke-Johansson, S., Viinamäki, E. (2024) Viability assessment of pelagic eggs stained with fluorescent dyes: toward improved analysis of live organisms in ballast water. Preprint.

7.2 Masteruppsatser

Sara Sundin, 2023. Inventering av infärgningsmetoder för LIVE/DEAD-analys av ägg och larver hos ryggradslösa djur: Hur kan vi upptäcka livsdugliga organismer i barlastvatten? MSc Thesis, Stockholms universitet, 55 pp.

7.3 Vetenskapliga konferensbidrag

Haecky P., Blackburn N. (2024) Compliance monitoring of ballast water treatment systems. IMAREST Marine Biosecurity Symposium 2024. <https://www.imarest.org/resource/mp-ballast-water-and-biofouling-at-the-2024-biosecurity-symposium.html>

Haecky P. (2024) Ballast Water Management Convention Implementation. European Maritime Safety Agency (EMSA), SEA EUROPE Workshop, Lisbon, March 2024.

Blackburn N. (2020) The use of an automated organism tracking microscope in a mesocosm experiment. EcoChange Conference 2020, Umeå University.

Gorokhova E., Sundin S. (2022) Assessing invertebrate egg viability in ballast water: Challenges and more challenges, 24th Ballast Water Management Conference, 16th March 2022 – 17th March 2022, Rotterdam – The Netherlands. Poster presentation.

7.4 Presentationer för intressenter

Gorokhova E. Informal Consultation Session of the Expert Group, Finnish Transport and Communications agency. Online meeting – February 7–8, 2023. Presentation of VIABLEGG and discussion on viability testing.

Gorokhova E. Assessing invertebrate egg viability in ballast water (presentation); JEG: OSPAR/HELCOM Joint Expert Group on Non-Indigenous Species, February 2022.

Gorokhova E. Consultations to Transportstyrelse, Sjö- och luftfart, Sektionen för internationell samordning. IMO/MEPC 82 & ISWG-GHG 17 (2024-09-11), Typgodkännande BWTS vid MEPC 82 och Baltic SIREN (2024-08-11).

7.5 Öppet tillgängliga data

Alla data som genererades inom projektet har deponerats i Zenodo.

Webb: zenodo.org, DOI: [10.5281/zenodo.15762932](https://doi.org/10.5281/zenodo.15762932)

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

Mot tillförlitlig bedömning av livsduglighet hos motståndskraftiga livsstadier av ryggradslösa djur i barlastvatten

Denna rapport redovisar resultaten från VIABLEGG-projektet, som har bidragit med viktiga framsteg i arbetet med att identifiera livskraftiga ägg och vilstadier hos ryggradslösa djur i barlastvatten.

Resultaten visar att vissa metoder fungerar väl för särskilda artgrupper och därmed kan ha praktisk betydelse vid inspektioner i hamnar. Samtidigt ger projektet ny kunskap om varför vissa livsstadier är svåra att bedöma och vilka biologiska och tekniska utmaningar som behöver hanteras. Rapporten innehåller konkreta förslag för fortsatt forskning, praktisk tillämpning och behovet av internationell samordning. Sammantaget utgör resultaten en värdefull grund för det fortsatta arbetet med att förebygga spridning av invasiva arter via den globala sjöfarten.



Havs
och Vatten
myndigheten