

Livskraftbedömning av tåliga livsstadier hos ryggradslösa djur i barlastvatten – metoder, utmaningar och vägar framåt



Stockholms universitet, Sweden

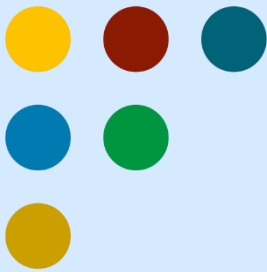
MicroWISE

MicroWISE, Denmark

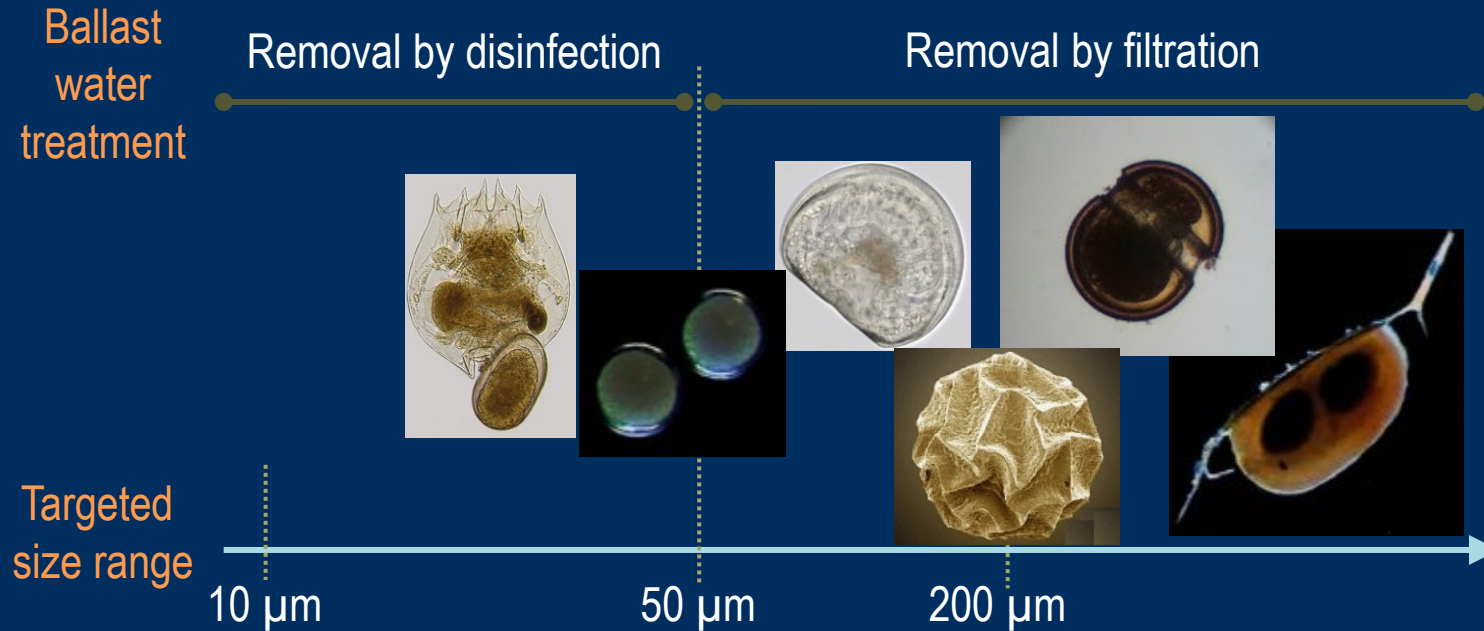
Havs
och Vatten
myndigheten

NATUR
VÅRDS
VERKET

FORMAS



Varför är frågan viktigt?



- Ballastvatten = stor spridningsväg för invasiva arter
- Svårast: ägg, vilstadier och larver
- IMO:s D-2 krav = ≤ 10 livsdugliga organismer / m^3

Inte för att ägg nånsin
räknas som levande bara
för att de inte rör på sig...



Projektets syfte



Utveckla metoder för att avgöra om ägg & viistadier lever



Testa färgningstekniker och automatiserade system (BallastWISE)



Identifiera möjligheter & begränsningar

Organisms between 10-50 μm

<10 living cells per mL

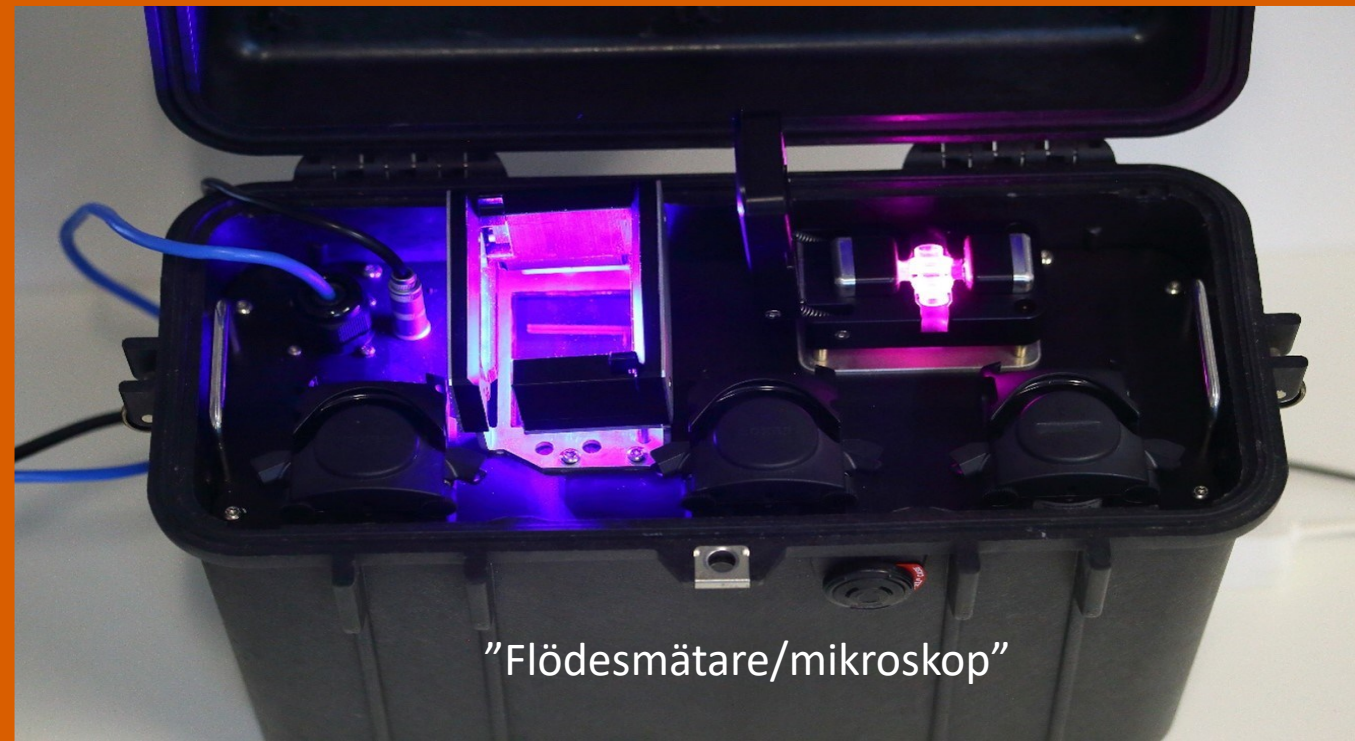


Organisms larger than 50 μm

<10 living organisms per m³



stated by the IMO ballast water convention and the US coast guard ballast water requirements



"Flödesmätare/mikroskop"

Metodöversikt

Arter



rotifer, copepod,
mussellarver,
amphipod
Daphnia

Viabilitet



kläckning ATP
embryomorfologi

Färgning (LIVE/DEAD)

- Vitala: CFDA
Neutral Red
- Mortala: TO-PRO-1
PI/SYTOX
Aniline Blue

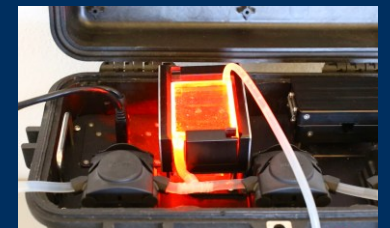
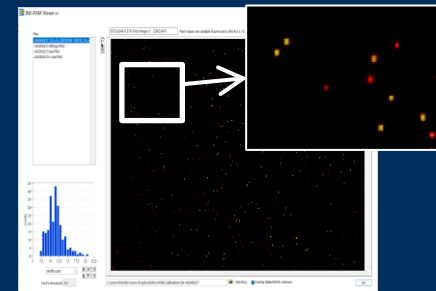


Genomtränglighet



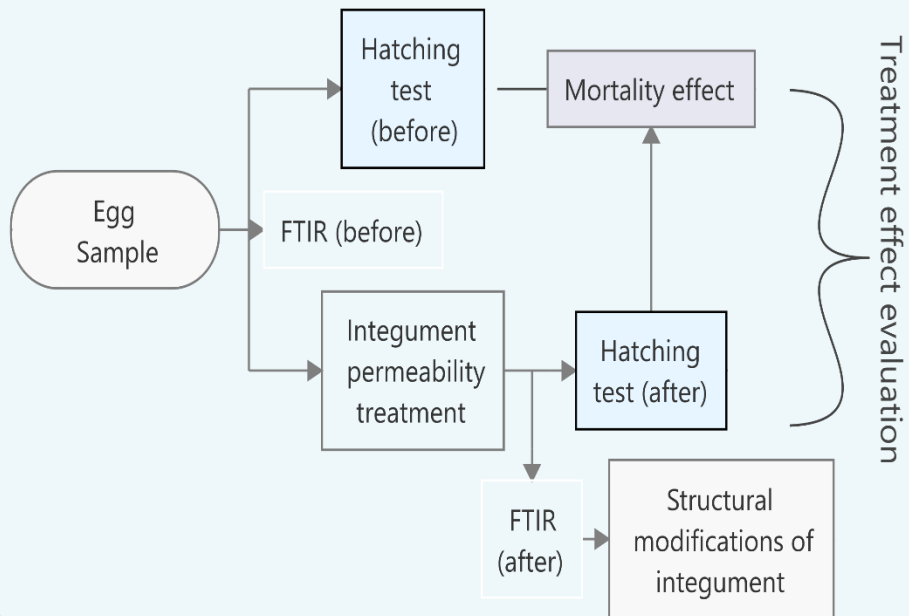
kemiska: enzymer,
syror/baser,
lösningsmedel
fysiska: sonikering,
mikrovågor,
elektroporation

Validering labb + fält, test
i BallastWISE

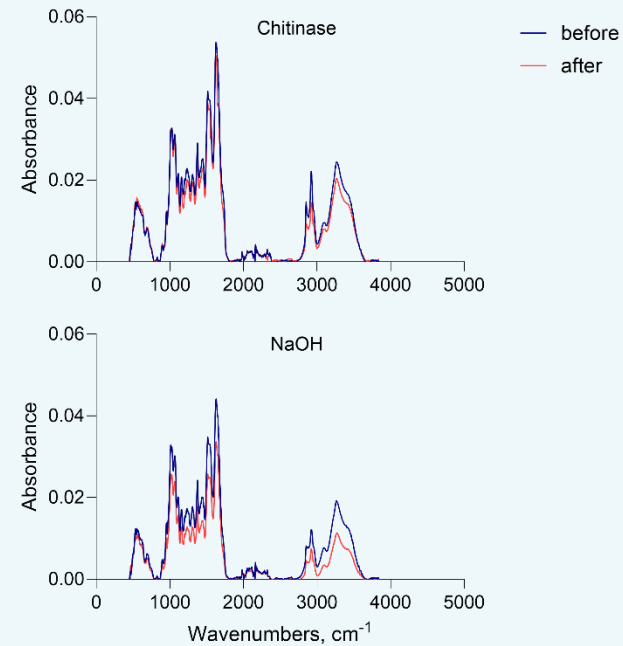


Ett exempel på arbetsflödet

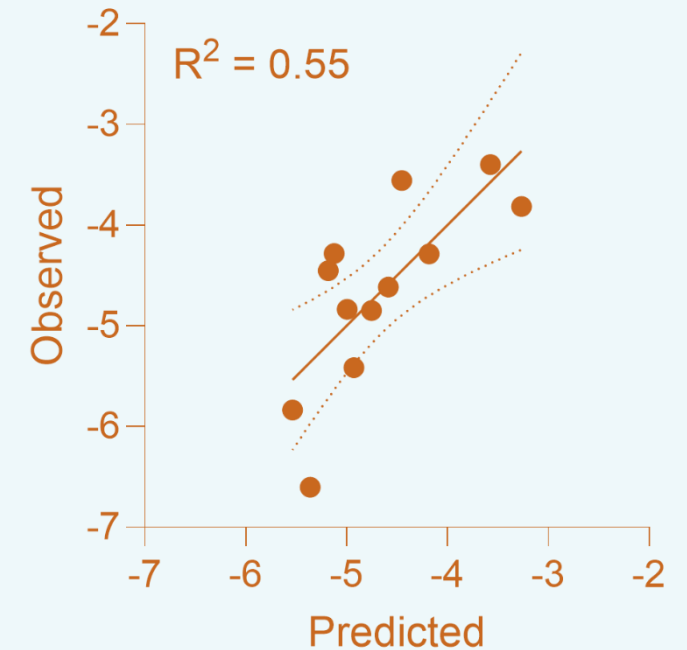
Äggbehandling



Genomtränglighet



Infärgningseffektivitet



Experiment



Analys

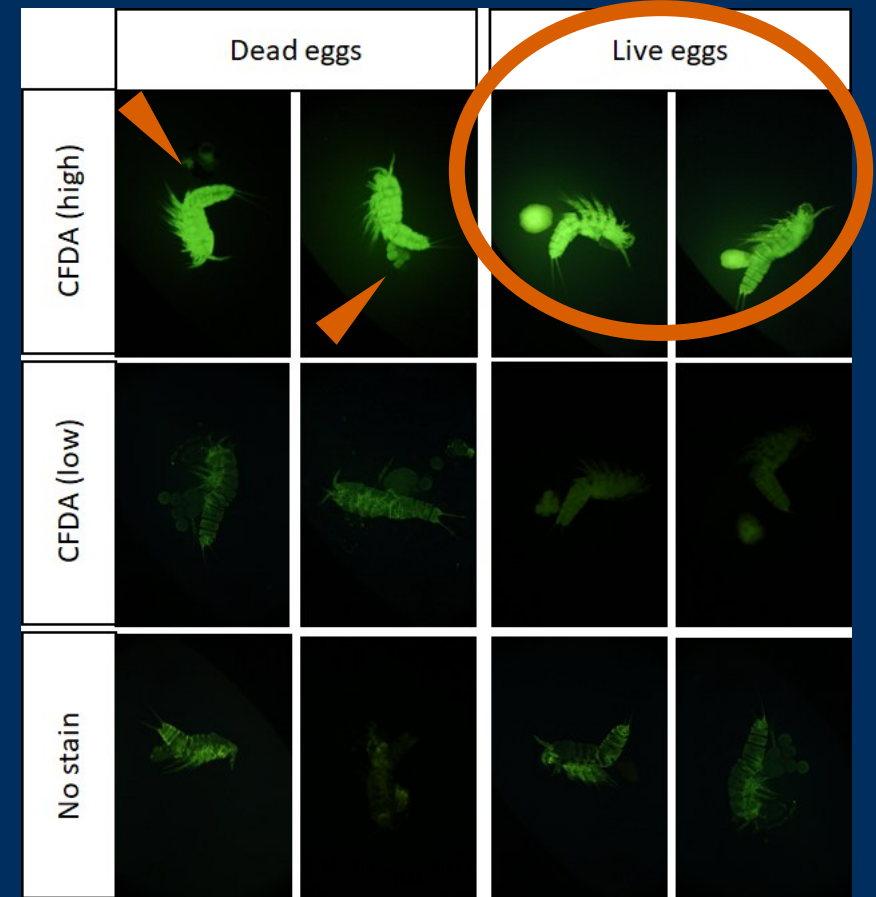


Resultat

CFDA och TO-PRO-1 fungerar (90% effektivitet) för vissa arter

CFDA (vital färg): markerar levande celler via enzymaktivitet

- Effektiv i copepodägg och amphipodembyron
- Begränsning: kan ge falska positiva i nyligen döda prover



CFDA och TO-PRO-1 fungerar för vissa arter

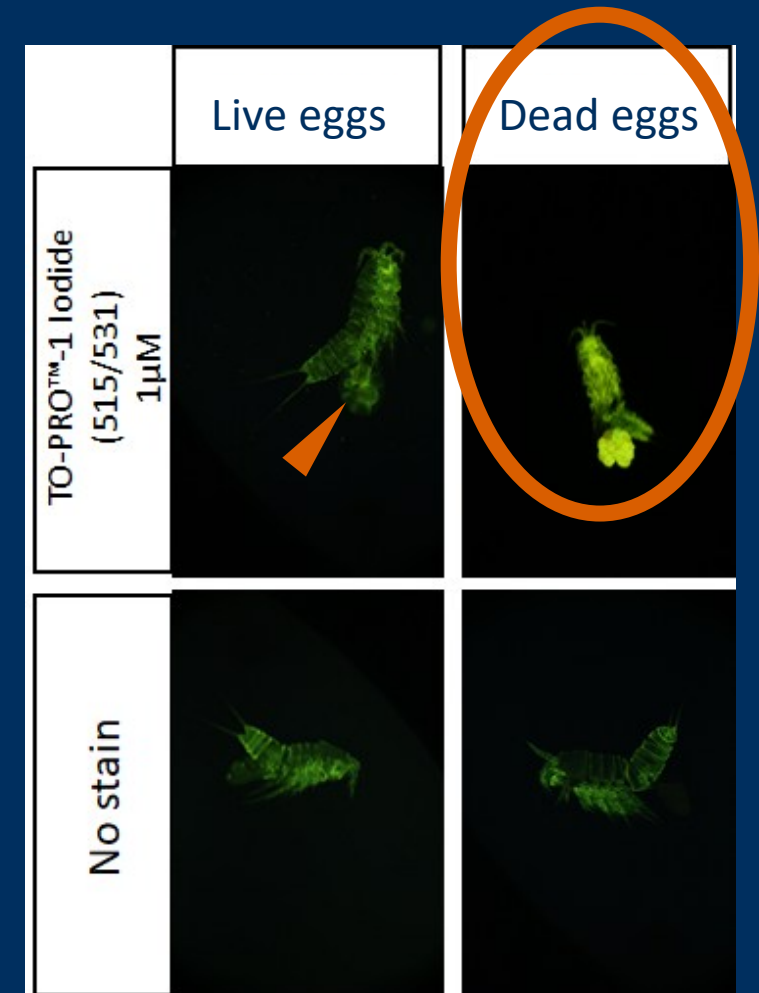
CFDA (vital färg): markerar levande celler via enzymaktivitet

- Effektiv i copepodägg och amphipodembryon
- Begränsning: kan ge falska positiva i nyligen döda prover

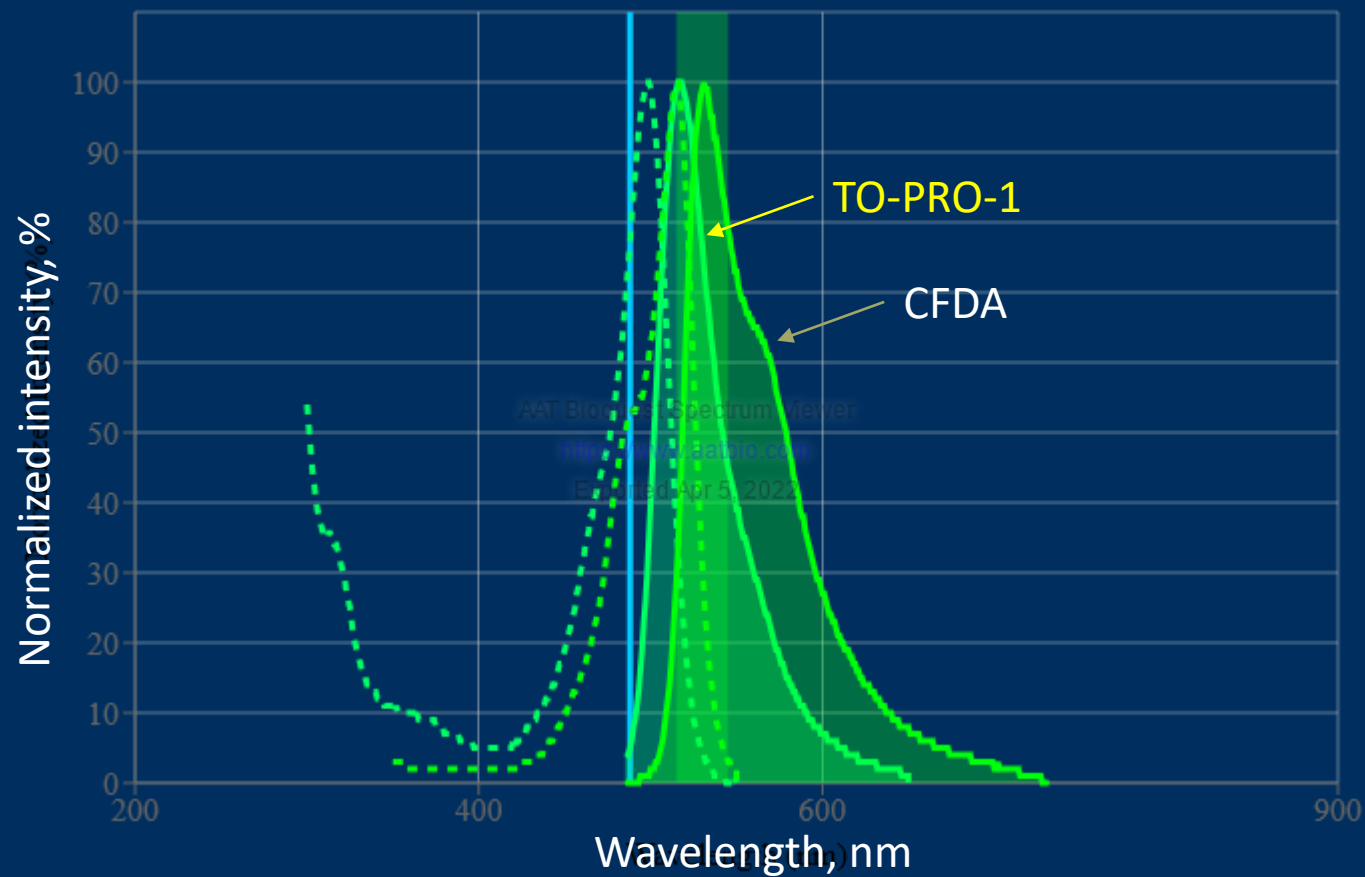
TO-PRO-1 (mortal färg): markerar döda celler genom DNA-bindning

- Tydlig kontrast mellan levande och döda embryon
- Begränsning: fungerar inte i hårdskaliga, vilande ägg

Sammanfattning: båda färgerna fungerar bra i vissa taxa men ingen är universell



TO-PRO-1 + CFDA: Inte en optimal kombination



- Måste appliceras på separata delprov



- Kan användas med samma sensor och algoritm



Neutral Red fungerar i mussellarver – inte i ägg

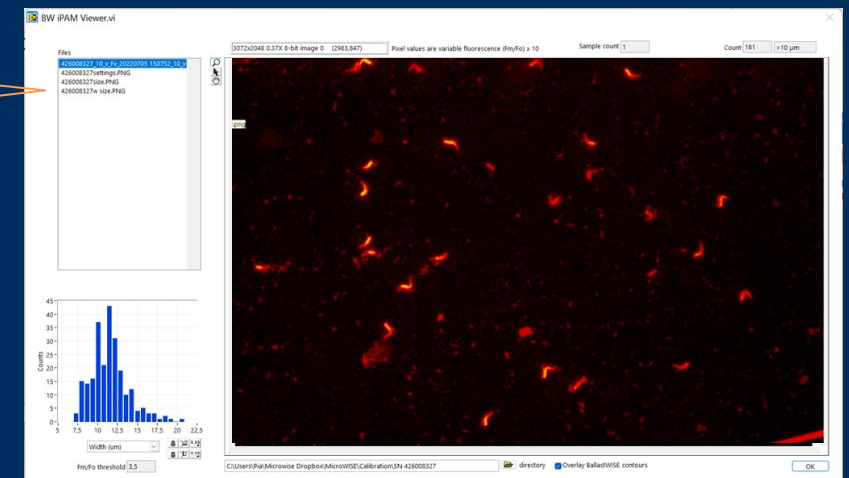
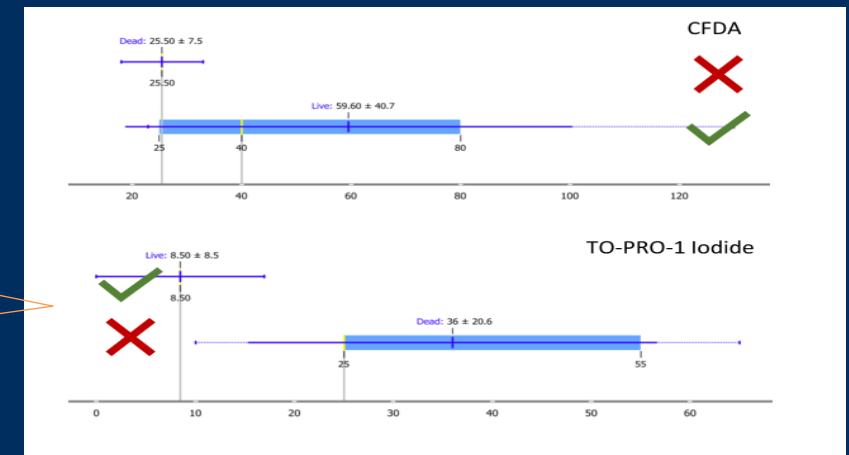
Neutral Red (vital färg): tas upp av lysosomer

- Tydlig röd färg i levande mussellarver (veligerstadium), ingen färgning i döda individer
- Begränsning: helt ineffektiv i ägg och vilande stadier (saknar aktiva lysosomer)
- **Sammanfattning:** välfungerande metod för larver som filtrerar, men inte användbar för icke-rörliga stadier



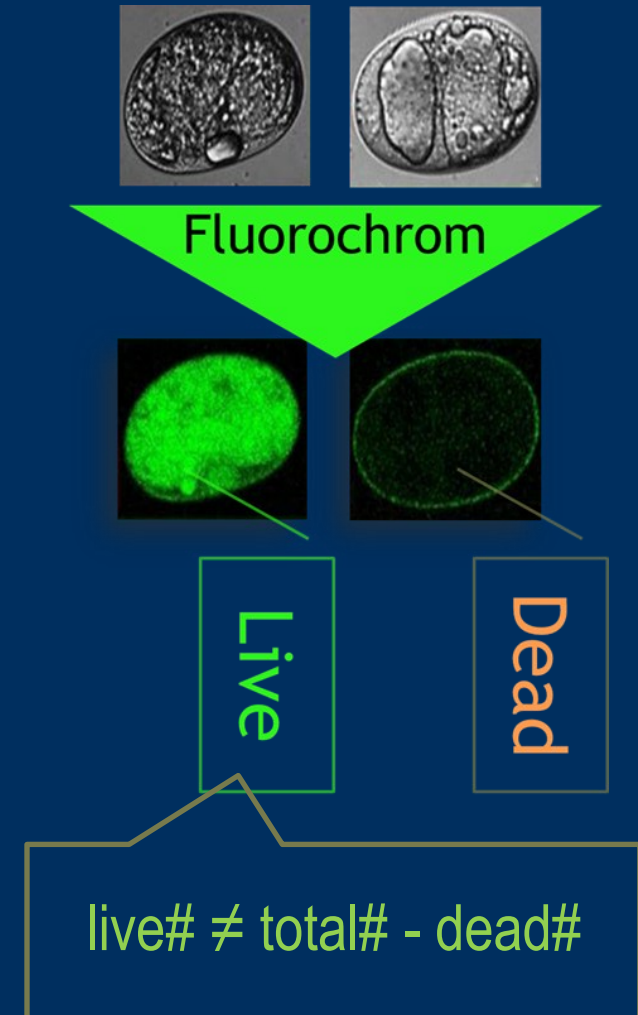
BallastWISE visar potential – men autofluorescens stör

- Automatiserad analys: BallastWISE kan registrera rörelser och fluorescens → **snabbare kontroller i hamn.**
- **Fungerar delvis:** CFDA (levande) och TO-PRO-1 (döda) gav skillnader mellan levande/döda organismer.
- Problem: Systemets filter blockerar grönt ljus → svaga signaler från de viktigaste våglängd.
- **Autofluorescens** från äggskal förväxlas med färgämnen.
- Resultaten **mer osäkra** än i mikroskop.
- **Slutsats:** potential för PSC (Port State Control), men kräver tekniska förbättringar (filter, signalanalys).



Varför universell metod inte är möjlig

- **Stora artskillnader:** samma färg fungerar olika på närbesläktade arter
- **Stadiespecifika effekter:** en färg kan fungera i bara nyproducerade ägg → kräver metodkombinationer
- **Falska positiva/negativa:** vissa färger markerar nyligen döda som levande, eller missar svaga signaler från levande med låg metabolism
- **Förbehandlingar** (kemiska/fysiska): öppnar skal men skadar embryon
- **Tekniska begränsningar:** autofluorescens, filtrar i utrustning, svaga signaler → laboratorieresultat går inte rakt av att översätta till fältet
- **Slutsats:** en "one-size-fits-all"-lösning är orealistisk → framtiden ligger i taxa-specifika protokoll + riskbaserade ramverk.



Slutsatser & rekommendationer

För hamnkontroll

- Använd färgning som kompletterande metod där den fungerar
- Kombinera snabb screening med fördjupad analys vid osäkerhet
- WoE approach bör utvecklas

För forskning & industri

- Utveckla bättre färgprotokoll & tekniska förbättringar av semiautomatiska system som BallastWISE

För myndigheter och regeverk

- Stöd utveckling av artspecifika metoder för hög-risk taxa
- **Uppdatera riktlinjer** så de speglar metodernas begränsningar
- Förbättra internationell samordning (IMO, HELCOM, OSPAR).

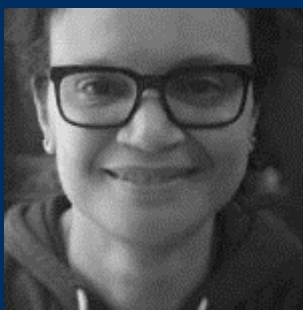
TACK!!!



Inst. för miljövetenskap, Effect & Exposure Unit



**Elina
Viinamäki**
Marin biologi



**Rehab
El-Shehawy**
Mikrobiologi



**Birgitta
Liewenborg**
Biokemi



**Sandra Lücke-
Johansson**
Molekylär
biologi

MicroWISE



Pia Haecky
Analys av
barlastvatten



Nick Blackburn
Instrumentutvecklare

+ Granskare och NV-stödgruppen

TACK!

