

Interaksjoner mellom osmoregulering og
syre/base-regulering hos *Calanus*
finmarchicus (Gunnerus)

Lars Kristian Ramstad
Schjønhaug

Lektorutdanning med master i realfag

Innlevert: November 2012

Hovedveileder: Bjørn Munro Jensen, IBI

Medveileder: Sindre Pedersen, IBI

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

Forord

Denne oppgaven ble skrevet ved institutt for biologi ved NTNU i Trondheim, hvor eksperimentene ble utført mellom 1. mars og 1. november 2012 på NTNU senter for fiskeri og havbruk. Oppgaven ble skrevet for ansvarlig veileder Bjørn Munro Jenssen og faglig veileder Sindre A. Pedersen ved NTNU. Jeg vil takke faglig veileder for ideen til denne oppgaven og for god oppfølging underveis. Jeg vil også benytte anledningen til å takke andre ansatte ved NTNU senter for fiskeri og havbruk for deres imøtekommenhet og hjelp gjennom en variert og spennende masteroppgave. Sist, men ikke minst, vil jeg takke medstudenter og en linjeforening som gjorde tiden ved SeaLab særlig trivelig.

Trondheim, 30.11.2012

Lars Kristian Ramstad Schjønhaug

Sammendrag

Calanus finmarchicus er en nøkkelart i transporten av energi mellom primærprodusentene og høyere trofiske nivåer i Nord-Atlanteren. Økende atmosfærisk CO₂ vil føre til forsuring av verdenshavene. Det er begrenset kunnskap om hvordan *C. finmarchicus* vil kunne håndtere de osmoregulatoriske og syre/base-regulatoriske utfordringene som fremtidens miljøendringer vil kunne skape. I dette arbeidet ble det gjort flere forsøk på å belyse disse aspektene. Det ble utført en full faktoriell test av dødelighet (tid ved 50% mortalitet, LT₅₀) ved varierende salinitet (både økt og redusert) og varierende nivå av pCO₂ for å belyse eventuelle synergistiske responser som følge av kombinert belastning for disse to stressfaktorene. Det ble påvist en signifikant effekt av hyperosmotisk sjøvann på dødelighet. Det ble påvist en signifikant effekt for interaksjonen mellom behandling med hyperosmotisk sjøvann og forhøyet pCO₂ på dødelighet. En sølvfargingsteknikk ble utviklet i et forsøk på å beskrive områder i organismer som bidro særskilt aktivt til osmoregulering og syre/base-regulering. Det ble forsøkt å utvikle en metode for å måle og studere osmolaliteten til hemolymfen hos *C. finmarchicus* i forhold til dens påvirkning av salinitet og havforsuring. Dette arbeidet viser at det kreves en videre utvikling av sølvfargingsteknikken og hemolymemålingene for å få metodene til å fungere tilfredsstillende.

Abstract

Calanus finmarchicus is an important species for transporting energy between primary producers and higher trophic levels in the North Atlantic. Increasing CO₂ will challenge the species with raised acidity. There is limited research regarding *C. finmarchicus* osmoregulation and acid/base regulation, and how the species will solve the future environmental challenges. Several experiments were designed to explore these aspects. A full factorial analysis was developed for lethality (time at 50% mortality, LT₅₀) over a range of osmolalities (both higher and lower) and CO₂ induced acidity, designed to explore possible synergistic relationships between combinations of the factors. The effect of hyperosmotic seawater on lethality was established as significant. An interaction between hyperosmotic seawater and higher pCO₂ was established as significant on lethality. A histological staining method was developed in an attempt to localizing areas of particular active osmoregulation and acid/base regulation in *C. finmarchicus*. An attempt was made to develop a method to measure and study the osmolality in *C. finmarchicus* in relation to exposure to changes in salinity and acidification. A further development of the silver staining and hemolymph measurement methods are needed before they are able to measure their respective parameters with a reasonable degree of precision.

Innholdsregister

Forord

Sammendrag

Abstract

Innholdsregister

1.0 - Introduksjon.....s. 6

1.1 - Potensiell effekt på marine organismer.....s. 9

1.2 - Kombinert stress ved blanding av enkeltfaktorer.....s. 13

1.3 - Livshistorien til *C. finmarchicus*.....s. 14

1.3.1 - Økologi.....s. 16

1.4 - Problemstilling og hypoteser.....s. 17

2.0 - Metoder og materialer.....s. 18

2.1 - To-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.....s. 18

2.1.1 - Statistikk.....s. 20

2.2 - Prøvetaking og osmolalitetmåling på hemolymfe fra *C. finmarchicus*.....s. 21

2.3 - Histologisk sølvfarging av potensielt ionetransporterende vev hos *C. finmarchicus*.....s. 22

3.0 - Resultater.....s. 23

3.1 - To-faktor analyse av effekt av osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.....s. 23

3.2 - Metodeutvikling - Osmolalitetmåling av hemolymfe hos *C. finmarchicus*.....s. 25

3.2.1 - Utvikling av metodikk for hemolymfepøvetaking.....s. 25

3.2.2 - Utvikling av metodikk for osmolalitetmålinger på Clifton nanoliter osmometer.....s. 26

3.3 - Metodeutvikling - Sølvfarging hos *C. finmarchicus*.....s. 29

4.0 - Diskusjon.....	s. 33
4.1 - To-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO ₂ på overlevelse hos <i>C. finmarchicus</i>	s. 33
4.2 - Metodeutvikling - Osmolalitetmåling av hemolymfe hos <i>C. finmarchicus</i>	s. 35
4.3 - Metodeutvikling - Sølvfarging hos <i>C. finmarchicus</i>	s. 36
5.0 - Konklusjon.....	s. 37
5.1 - To-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO ₂ på overlevelse hos <i>C. finmarchicus</i>	s. 37
5.2 - Metodeutvikling - Osmolalitetmåling av hemolymfe hos <i>C. finmarchicus</i>	s. 37
5.3 - Metodeutvikling - Sølvfarging hos <i>C. finmarchicus</i>	s. 38
6.0 - Referanseliste.....	s. 39
7.0 - Vedlegg.....	s. 43
Vedlegg 1 - Pilotundersøkelse, osmolaliteter benyttet i tofaktoranalyse.....	s. 43
Vedlegg 2 - Pilotundersøkelse, saliniteter benyttet i tofaktoranalyse.....	s. 44
Vedlegg 3 - Sjøvannsstandard, University of California, San Diego.....	s. 45
Vedlegg 4 - Eksempelberegning av LT50-verdi ved logistisk regresjon i R.....	s. 46
Vedlegg 5 - Rådata, karbonatkjemi (Hyperosmotiske behandlinger).....	s. 47
Vedlegg 6 - Rådata, karbonatkjemi (Hyposmotiske behandlinger).....	s. 51
Vedlegg 7 - Eksempelberegning av pCO ₂ ved hjelp av "CO ₂ calc".....	s. 55
Vedlegg 8 - Statistikk, hyperosmotiske og hyposmotiske behandlinger.....	s. 56
Vedlegg 9 - Rådata, tofaktoranalyse av hyperosmotiske behandlinger.....	s. 58
Vedlegg 10 - Rådata, tofaktoranalyse av hyposmotiske behandlinger.....	s. 59
Vedlegg 11 - Rådata, metodeutvikling i osmolalitetmålinger av hemolymfe.....	s. 61
Vedlegg 12 - Eksempelberegning, diameterendring ved fordamping i prøve.....	s. 62

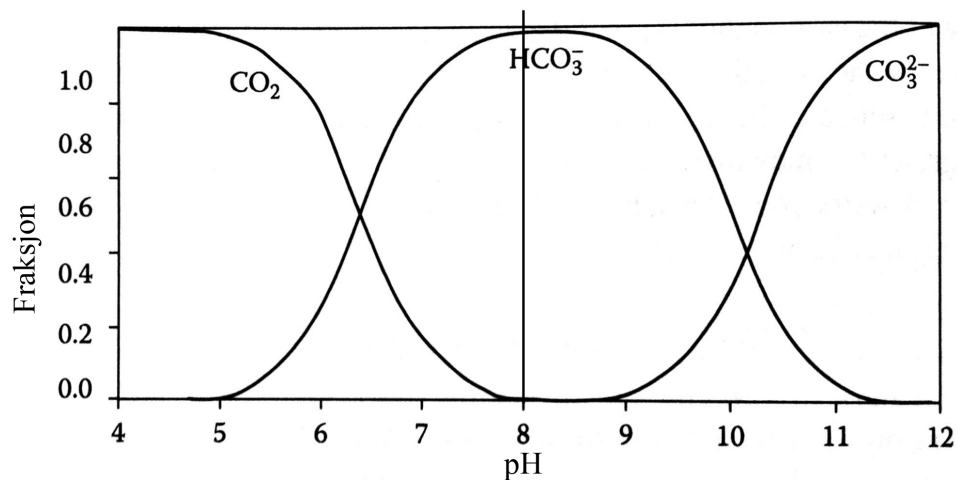
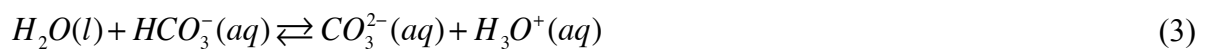
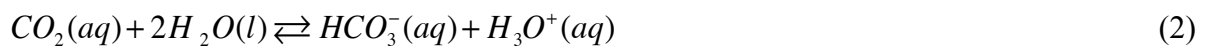
1.0 - Introduksjon.

Menneskelige aktiviteter har siden den industrielle revolusjonen ført til et betydelig utslipp av drivhusgassen karbondioksid (CO₂) til atmosfæren. Forbrenning av fossilt brennstoff og avskoging er de viktigste kildene til utslipp (Sabine et al., 2004 ; IPCC, 2007). Pre-industrielt hadde atmosfæren en CO₂-konsentrasjonen på omtrent 280 ppm (parts per million). Denne konsentrasjonen har gjennomsnittlig steget med 1.4 ppm per år siden den gang. Dagens nivåer ligger på omtrent 390 ppm og i de siste ti årene har det vært en gjennomsnittlig økning på 1.9 ppm per år (IPCC, 2007).

Globalt bidrar CO₂ med et globalt gjennomsnittlig strålingspådrag på 1.66 W/m² og økende atmosfæriske konsentrasjoner av CO₂ vil føre til endringer i jordens energibalanse (IPCC, 2007). Følgelig observeres en trend av økende temperaturer både i havet og i atmosfæren. Temperaturmålinger i atmosfæren de siste 50 årene har vist dobbelt så høy temperaturstigning i forhold til de 100 siste årene. Somrene 1995-2006 rangerte med 11. av de 12. varmeste årene siden 1850. Det har blitt observert en gjennomsnittlig temperaturøkning på 0.76°C i løpet av det siste 100 årene, og det forventes en stigning på 0.4°C bare i løpet av de neste 20 årene. Det regnes som svært sannsynlig at den globale temperaturøkningen er en konsekvens av antropogene klimagassutslipp (IPCC, 2007). Temperaturøkning i atmosfærene vil kunne føre til forandringer i det globale fordampnings- og nedbørsmønsteret. Dette er antatt å føre til en endring i verdenshavenes saliniteter, som vil kunne vise seg i form av stigende saltkonsentrasjoner ved lavere breddegrader og minkende saliniteter ved høyere breddegrader (IPCC, 2007).

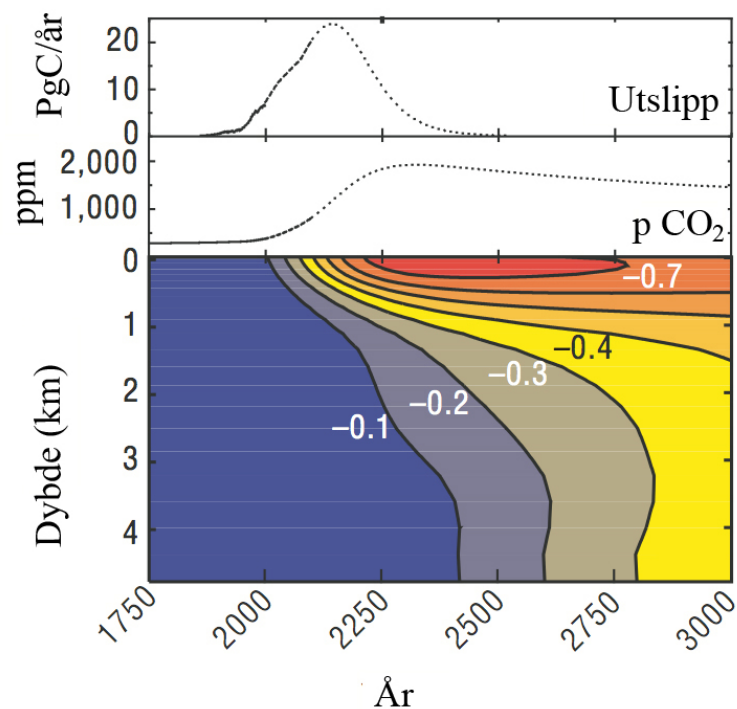
Verdenshavene har stor varmekapasitet og har absorbert mer enn 80% av energien tilført fra naturlig og antropogent strålingspådrag. Økende temperaturer fører til at verdenshavenes volum øker. Dette viderefosterkes av økende snø- og isbresmelting, noe som fører til et stigende havnivå. De siste hundre årene har havnivået steget med gjennomsnittlig 0.17 meter. Migrasjon av sjøvann til lavere landområder vil kunne føre til forringet tilgang på ferskvann og landarealer (IPCC, 2007).

Verdenshavene har stor evne til å absorbere CO_2 fra atmosfæren, gjennom en syre/base-reaksjon med vann (Ligning 1 og 2). I verdenshavene foreligger CO_2 hovedsakelig som bikarbonationer (HCO_3^-) og karbonationer (CO_3^{2-}). Dette illustreres i figur 1. pH er den negative logaritmen av H_3O^+ -konsentrasjonen. Syre/base-reaksjonen fører til en netto produksjon av H_3O^+ . Dette fører til en nedgang i pH-verdi og dermed til havforsuring (Zeebe og Wolf-Gladrow, 2001).



Figur 1: Bjerrumplott som viser sammenhengen mellom fraksjonen CO_2 -derivater (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) som en funksjon av pH i sjøvann. Sjøvanns naturlige pH vises med vertikal linje. Tilpasset fra Manahan (2008).

Eksponeringstid mot atmosfæren, sjøvannets bufferkapasitet (Revellefaktor) og blandingsgrad er viktige parametere for overflatevannets pH (Sabine et al., 2004). Lave blandingshastigheter og sprangsjikt i havet fører til at omtrent 93% av absorbert CO₂ foreligger fra 0 til 1500 meter dybde per dags dato (Sabine et al., 2004). Dette innebærer at 2/3 av antropogene utslipp fortsatt foreligger i atmosfæren (Sabine et al., 2004). Det er beregnet at cirka 90 % av atmosfærisk CO₂ blir absorbert i verdenshavene i løpet av de neste millenia (Sabine et al., 2004). Dette illustreres i figur 2.



Figur 2: Øvre del viser et fremtidig CO₂utslippsscenario frem til 2100 (IPCC IS92A). Midtre del viser den resulterende økning i atmosfærisk pCO₂. Nedre del angir hvordan pH endres over tid og dybde som et resultat av havets absorbering av atmosfærisk CO₂. Tilpasset fra Caldeira og Wicket (2003).

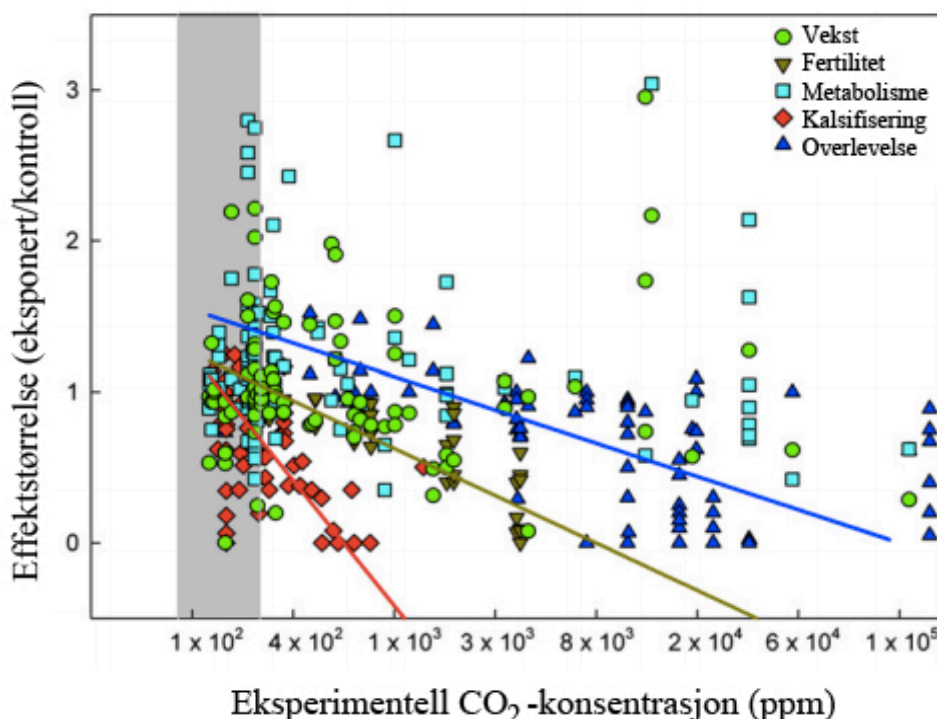
1.1 - Potensiell effekt på marine organismer.

Marine organismer eksponert for endrede miljøbetingelser, vil være utsatt for stress.

Individene som bruker mer energi på å motvirke stress, vil ha mindre energi til forplantning, vekst og vedlikehold (Hendriks et al., 2010; Pörtner, 2008).

Ulike arter vil kunne demonstrere effekter av både ulik styrke og type ved eksponering for identiske betingelser. Noen organismer vil dermed være mer eller mindre utrustet til å tåle ulike typer miljøstress. Dette kan eksempelvis føre til tap av særlig sensitive arter eller at et økosystem endres indirekte gjennom negative effekter på nøkkelarter (Widdicombe og Spicer, 2008).

Forsuringen av verdenshavene fører til en økende tilstand av hyperkapni for marine organismer. Tilstanden innebærer høyere konsentrasjoner av CO₂-derivater i organismen (Cameron og Iwama, 1987). Reproduksjonsevnen og overlevelsen til fire marine copepoder ble signifikant lavere etter en CO₂-eksponering på 2000 ppm over 8 dager (Zhang et al., 2011). Det ble observert signifikante biokjemiske endringer i copepoden *Centropages tenuiremis* eksponert for 2000-10000 ppm pCO₂ (Zhang et al., 2012). Det ble påvist en signifikant lavere klekkerate hos *C. finmarchicus* eksponert for 8000 ppm pCO₂ (Mayor et al., 2007). Det ble gjennomført en metaanalyse resultatene fra CO₂-indusert forsuring på 44 marine arter. Det ble observert en signifikant påvirkning av CO₂-indusert forsuring på effektstørrelsen (ratio av behandlingseffekt og kontrolleffekt) til prosessene kalsifisering, fertilitet og overlevelse (Hendriks et al, 2010). En sammenfatning av havforsuringseffekter på marine organismer er vist i figur 3.



Figur 3: Det ble observert en signifikant sammenheng mellom $p\text{CO}_2$ og effektstørrelsen (responsvariabel eksponert / responsvariabel kontroll) til kalsifisering, fertilitet og overlevelse i en metaanalyse av 44 marine arter. De signifikante sammenhengene vises med henholdsvis rød, gul og blå linje grafen. Tilpasset fra Hendriks et al (2010).

Hemolymfen vil være en av de første kompartmentene som vil kunne påvirkes av endringer i sjøvannets kjemi (Pörtner, 2008). Undersøkelse av osmolaliteten til hemolymfen hos CO_2 -eksponerte *C. finmarchicus* kan gi en indikasjon på hvordan syre/base-kompensasjon for havforsuring påvirker osmo- og ioneregulatoriske prosesser og omvendt.

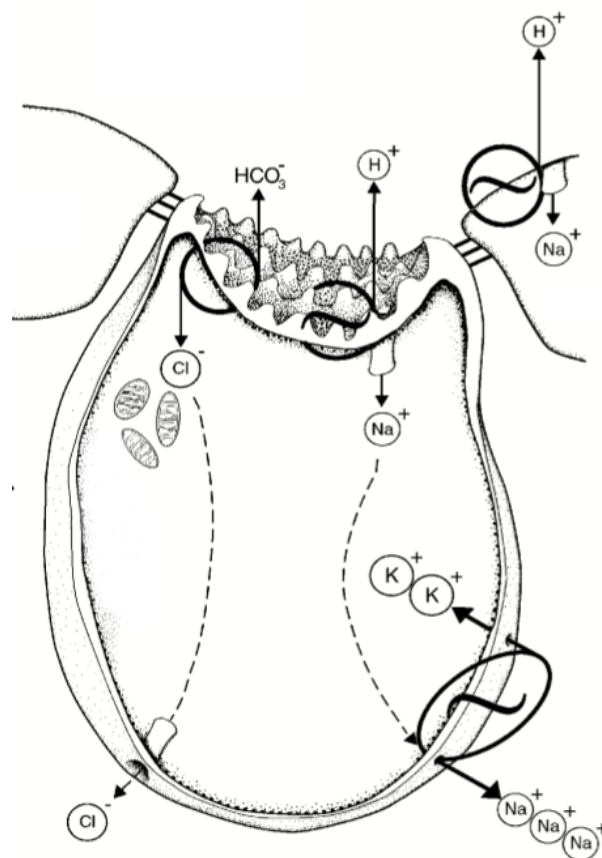
Ionebalanse og cellevolum er viktige celleparametere som fører til celledød om de ikke holdes under homeostatisk kontroll (Willett og Burton, 2002).

Endringer i havets saltinnhold fører til saltstress for marine organismer. Osmoregulerende organismer vil holde hemolymfens osmolalitet innenfor et begrenset intervall uavhengig av det eksterne miljøet. Osmolaliteter endres ved å fjerne eller tilføre osmolytter, eller vann til organismen hjelp av organer eller over epitel (Whittamore, 2012).

En osmokonform organisme har en ekstracellulærvæske med en osmolalitet som samvarierer med omgivelsene. Dette er mulig ved at organismen øker konsentrasjonen av kompatible organiske osmolytter, samtidig som konsentrasjonen til ikke-kompatible osmolytter holdes

konstant. På denne måten unngår organismen uønsket bevegelse av fritt vann, samtidig som viktige cellulære prosesser kan opprettholdes (Blaxter et al., 1998 ; Whittamore, 2012).

En generell modell viser at akvatiske dyr utsatt for endogen eller eksogen hyperkania vil kunne oppleve en nedgang i pH, før forholdene blir normalisert gjennom en kombinert ionepumping over respirasjonsorganene samt fjerning av H_3O^+ via ekskresjonsorganene (Cameron og Iwama, 1987). Benfisker i ferskvann benytter seg av kloridceller (figur 4), hvor det aktivt tas opp Na^+ og Cl^- , mens H_3O^+ blir fjernet i en interagerende prosess mellom osmotisk regulering og syre/base-regulering (McCormick, 2001).



Figur 4: Kloridcelle fra ferskvanns-benfisk. Mitokondrierike celler fører til en aktiv netto fjerning av H_3O^+ og en aktiv netto tilførsel av Na^+ og Cl^- fra organismen, hvor de osmoregulerende og syre/base-regulerende prosessene interagerer med hverandre.

Tilpasset fra McCormick, 2001

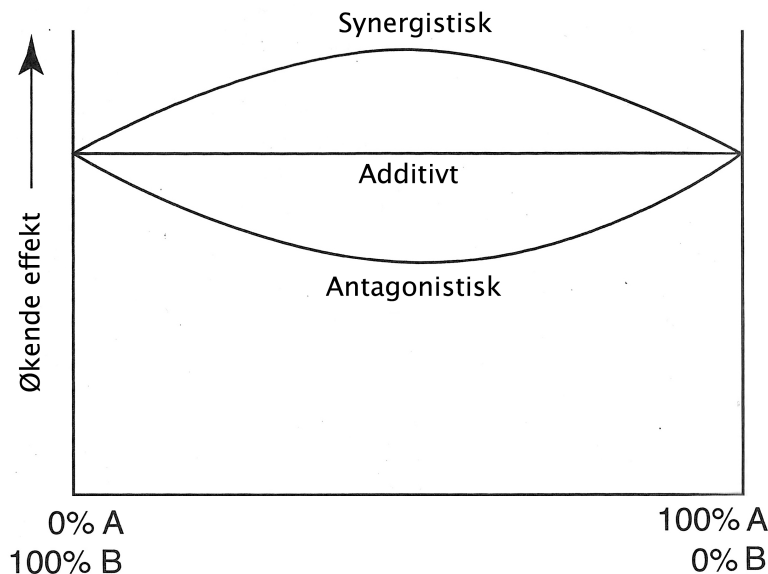
Hos krepsdyr er det generelt beskrevet at ioneregulering kan foregå gjennom kjertler nær hodet eller over de respiratoriske overflatene. Det er observert regulering av de fleste ionene som finnes i hemolymfe, samt en stigning i konsentrasjoner av osmotisk kompatible aminosyrer i marine invertebrater (Robertson, 1953).

Ionocytter er celler som gjennom sine egenskaper kan bidra til osmoregulering i en organisme. Karakteristiske egenskaper for en osmoregulerende celle er høy mitokondrietetthet, ionisk permeabilitet (aktiv eller passivt) og et stort areal både mot indre og ytre miljø ved hjelp av utposninger (Hiroi, 2012; Lignot, 1999). Skallstrukturer som er involvert i ionetransport er observert i flere arter copepoder. Strukturene ("skallvinduer") er svært tynne, har et stor areal mot omgivelsene, er ionisk permable med en høy mitokondrietetthet (Hosfeld og Schminke, 1997). Andre eksempler på responser i sammenheng med eksponering av osmolalitetssendringer er produksjonen av stressproteiner ved endret salinitet (2-5 og 15-20 ppt) og høyere temperaturer (15°C og 30°C) hos copepoden *Eurytemora affinis* (Bradley og Gonzalez, 1994).

Det finnes sparsomt med litteratur om syre/base-regulering blant *Calanus*-arter. Det ble observert at lavere invertebrater, og da særlig juvenile, var mindre motstandsdyktige mot havforsuring enn organismer med mer utviklet syre/base regulering og høyere grad av metabolisme (Atsushi et al., 2004). Det ble påvist en lavere pH i forhold til sjøvann i fordøyelsessystemet til *Calanus hyperboreus*, et system som kan tenkes å ha en syre/base regulerende funksjon i tillegg til en fordøyelsesfunksjon (Tang et al., 2011). Det ble beskrevet at *C. finmarchicus* hadde en sekretorisk funksjon i kjevekjertlene og det kan tenkes at dette organet er involvert i syre/base-reguleringen (Blaxter et al., 1998).

1.2 - Kombinert stress ved blanding av enkeltfaktorer.

Enkeltkomponentene i en blanding kan påvirke hverandres effekt på organismen (Walker et al, 2006). Dette kan føre til tre forskjellige interaksjoner: en større observert effekt enn hva summen av enkeltkomponentene skulle tilsi, forårsakes av synergistiske interaksjoner. En mindre observert effekt enn hva summen av enkeltkomponentene skulle tilsi, forårsakes av antagonistiske interaksjoner. En like stor effekt som summen av enkeltkomponentene skulle tilsi, forårsakes av additive interaksjoner (Walker et al, 2006). Dette illustreres i figur 5.



Figur 5: Illustrasjonen viser hvordan enkeltkomponenter i en blanding kan interagere med hverandre. Interaksjoner fører til at observerte effekter kan være høyere eller lavere enn den additive effekten. Dette kalles henholdsvis synergistiske og antagonistiske effekter.

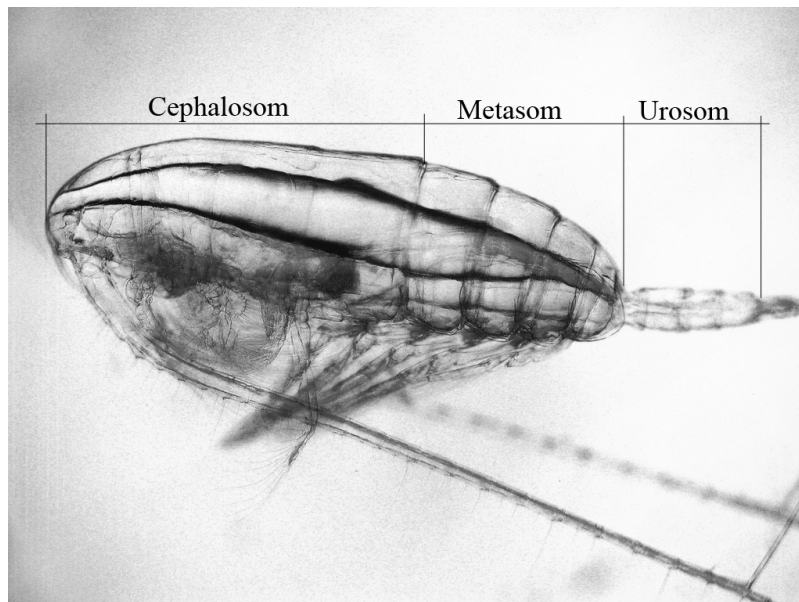
Tilpasset fra Walker et al (2006).

Det er gjort forskning rundt synergistiske effekter i blandinger av metaller og pesticider på copepoder (Forget et al, 1997; Moraitouapostolopoulou og Verriopoulos, 1982). Det ble påvist en signifikant interaksjon mellom temperatur og pH på total eggproduksjon hos *Acartia sp* (Vehmaa et al, 2012).

LC₅₀ (Concentration at 50% Lethality) er et standardmål innen toksikologi med organismens død som slutt punkt. Denne benyttes for å gjøre toksikologisk effekt på organismer sammenlignbare. LT₅₀ (Time until 50% Lethality) blir brukt som fellesnevner når effekten av to faktorer påført samtidig skal sammenlignes. LT₅₀ angir hvor lang tid det tar før det er 50% dødelighet i en gruppe.

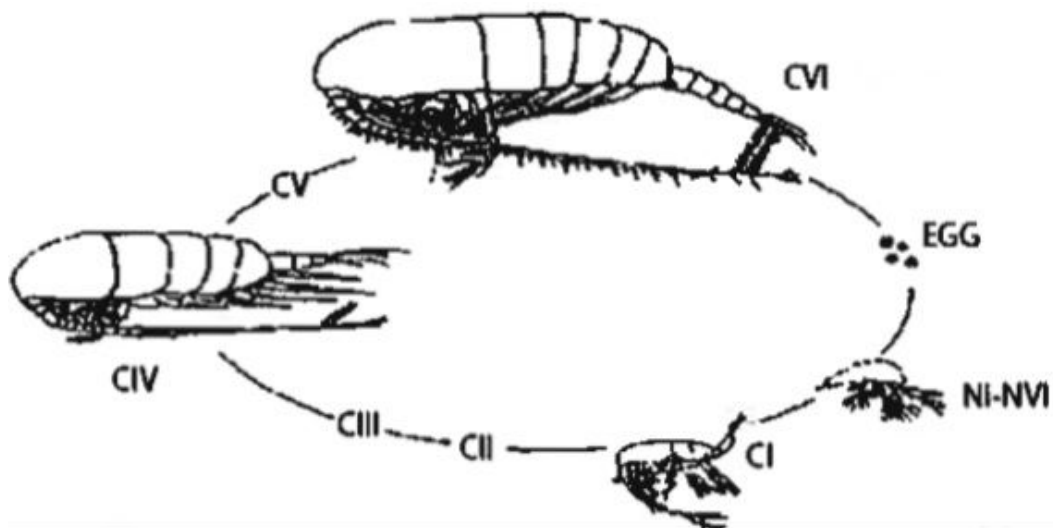
1.3 - Livshistorien til *C. finmarchicus*.

C. finmarchicus (raudåte) er et marint dyreplankton tilhørende de calanoide copepodene. Det er per 1993 beskrevet omtrent 11500 forskjellige arter copepoder, og det er estimert at dette kun representerer cirka 15% av totalt antall arter (Humes, 1994). De calanoide copepodene finnes primært i det marine miljø. Kroppsformen, som vist i figur 6, er relativt lik mellom de ulike artene og størrelsen varierer primært mellom 0.5-2.0 mm (Dudley, 1986). Generelt utseende for voksne dyr er et segmentert hode (cephalosom) og brystskall (metasom), med et forplantningssegment (urosom). Dyret har tosidige og brede antenner på cephalosomet, samt flere brede svømmeføtter og andre vedheng på undersiden nedover mot urosomet (Blaxter et al., 1998).



Figur 6: *C. finmarchicus*. Det vises til en generell tredeling av kroppen i et cephalosom, et metasom og et urosom. Tilpasset fra (mikebok, Flickr Creative Commons).

Kjønnsdefinerte trekk blir utviklet sent i livsløpet, hvor hankjønnen får et ekstra urosomalt segment, er mindre i størrelse og har mer modifiserte vedheng enn hunkjønnen (Gilbert og Williamson, 1994). Dyrene klekkes fra et sfærisk egg (diameter 1.5 mm) og skallskifter gjennom seks nauplii-stadier (NI til NVI) og seks copepoditt-stadier (CI til CVI) til voksen form. Livssyklusen til *C. finmarchicus* illustreres i figur 7. Copepodene migrerer både i løpet av døgnet og året. Migrasjonen er en tilpassing for å unngå predasjon, finne byttedyr, samt å forplante seg (Blaxter et al., 1998 ; Berge et al., 2009).



Figur 7: Figuren viser en oversikt over livssyklusen til *C. finmarchicus* fra egg, via flere naupliistadier og copepodittstadier til voksen form. Tilpasset fra Sakshaug et al, 2009.

Den indre anatomien består av et eksoskjelett basert på kitin, et nervesystem, et sirkulasjonssystem, et fordøyelsessystem, et reproduksjonssystem, et ekskresjonssystem, og et energilagringssystem (Blaxter et al., 1998).

Det kan lagres relativt store mengder lipider i form av voksester hos *C. finmarchicus* (Scott et al., 2000). Fettvolumet kan ta opp en relativt stor andel av kroppsvolumet, og blir brukt regelmessig i perioder med eggproduksjon eller ved lav næringstilgang (Ikeda, 1974).

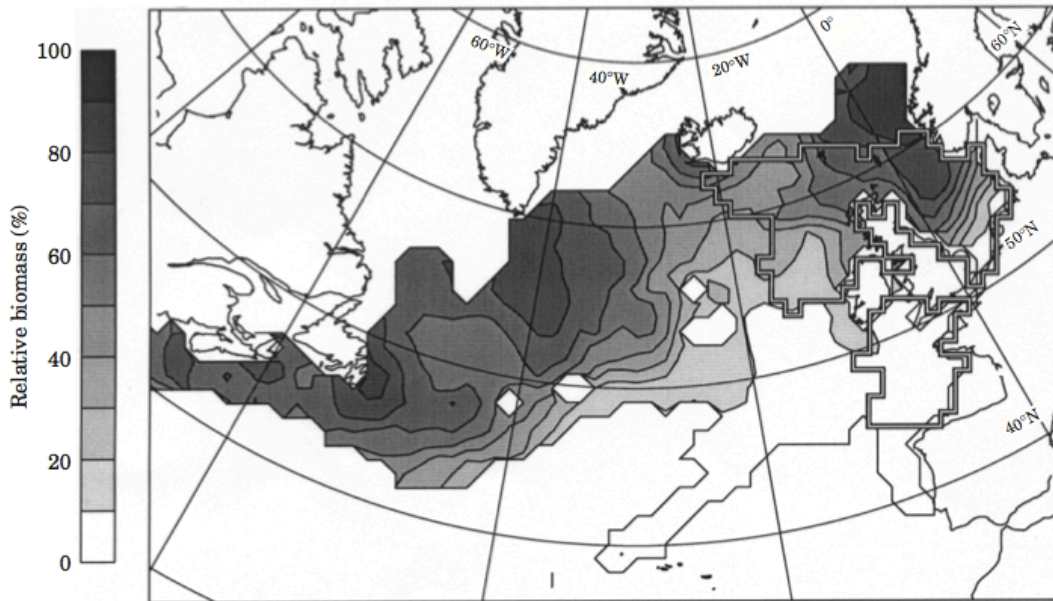
Copepoder spiser gjennom aktiv filtrering av sjøvann og ved å aktivt oppsøke byttedyr eller matpartikler (Poulet et al., 1978, Bundy og Paffenhöfer, 1993).

C. finmarchicus spiser primært planteplankton i form av dinoflagellater og diatomer, men også silikoflagellater, kokkolitoforer, tintinnider og radiolarer (Marshall, 1924).

Copepoder blir igjen spist av svært mange og varierte organismer innenfor plankton, nekton, benthos, samt pattedyr og fugler (Blaxter et al., 1998).

1.3.1 - Økologi

"Copepods are probably the most numerous multicellular organism on earth" (Blaxter, 1998).



Figur 8: Relativ biomasse av *C. finmarchicus* i forhold til total biomasse av copepoder i Nord-Atlanteren. Tilpasset fra (Planque og Batten, 2000).

Calanoide copepoder er svært tallrike i Nord-Atlanterhavet og flere av de er nøkkelarter gjennom sin samvariasjon med høyere arter (Runge, 1988). De representerer et viktig bindeledd i energioverførselen mellom fotosyntetiserende planteplankton og høyere arter i det marine næringsnett gjennom sitt store biomassebidrag (figur 8) og energiinnhold (Verity og Smetacek, 1996, Runge, 1988). Det er estimert at den årlige produksjonen av *C. finmarchicus* alene bidrar med en våtvekt på 74 millioner tonn (Aksnes og Blindheim, 1996).

Til tross for sin beskjedne størrelse er *C. finmarchicus* en organisme med betydelig påvirkning på naturen. Det er dermed viktig å forstå hvordan organismen responderer på klimaendringer (Reygondeau og Beaugrand, 2011).

Global befolkningsvekst fører til et økende behov for proteiner og andre næringsstoffer (FAO, 2012). Det er gjort forskning på foringskvaliteten til *C. finmarchicus* på larvestadier av atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) med lovende resultater (Busch et al., 2010). Det er også blitt gjort forskning på *C. finmarchicus* som helsetilskudd, gjennom sitt innhold av essensielle flerumettede fettsyrer (Hargrove, 2004). Den kommersielle innhøstingen av copepoder har vært relativt liten grunnet lav inntjening (Omori, 1978 ; Blaxter, 1998). Det er også uttrykt bekymring for konsekvensene av overfiske på copepodene (Blaxter et al., 1998).

1.4 - Problemstilling og hypoteser

Endringer i havets vannkjemi på grunn av klimaendringer vil kunne føre til at *C. finmarchicus* opplever økt stress gjennom en endret salinitet og redusert pH-verdi i havet. Kunnskap om hvordan arten tilpasser seg slike endringer vil være viktig om man skal kunne forutse hvordan organismen blir påvirket av fremtidens klimaendringer.

Problemstilling: Hvor foregår syre/base- og osmoregulering hos *C. finmarchicus* og hvordan påvirker eksponering mot endret pCO₂ og osmolalitet denne reguleringen?

H_A: Aktiv ionetransport foregår i spesifikke organer eller i avgrensede områder hos *C. finmarchicus*.

H₀: Aktiv ionetransport er desentralisert hos *C. finmarchicus*.

Hypotese A kan bli avvist om tilstrekkelig kroppsflate farges med lik frekvens og intensitet i en sølvfargingsteknikk for ionetransporterende vev.

H_A: Hemolymfens osmolalitet hos *C. finmarchicus* vil påvirkes ved eksponering mot en kombinert endring i osmolalitet og pCO₂.

H₀: Hemolymfens osmolalitet hos *C. finmarchicus* vil ikke påvirkes ved eksponering mot en kombinert endring i osmolalitet og pCO₂.

Hypotese A kan bli avvist om det ikke kan påvises en tilstrekkelig signifikant sammenheng.

H_A: Det vil observeres en interaksjon mellom effekten av hyperosmotisk sjøvann og effekten av forhøyet pCO₂ på dødelighet.

H₀: Det vil ikke observeres en interaksjon mellom effekten av hyperosmotisk sjøvann og effekten av forhøyet pCO₂ på dødelighet.

Hypotese A kan bli avvist om det ikke kan påvises en signifikant interaksjon.

H_A: Det vil observeres en interaksjon mellom effekten av hyposmotisk sjøvann og effekten av forhøyet pCO₂ på dødelighet

H₀: Det vil ikke observeres en interaksjon mellom effekten av hyposmotisk sjøvann og effekten av forhøyet pCO₂ på dødelighet

Hypotese A kan bli avvist om det ikke kan påvises en signifikant interaksjon.

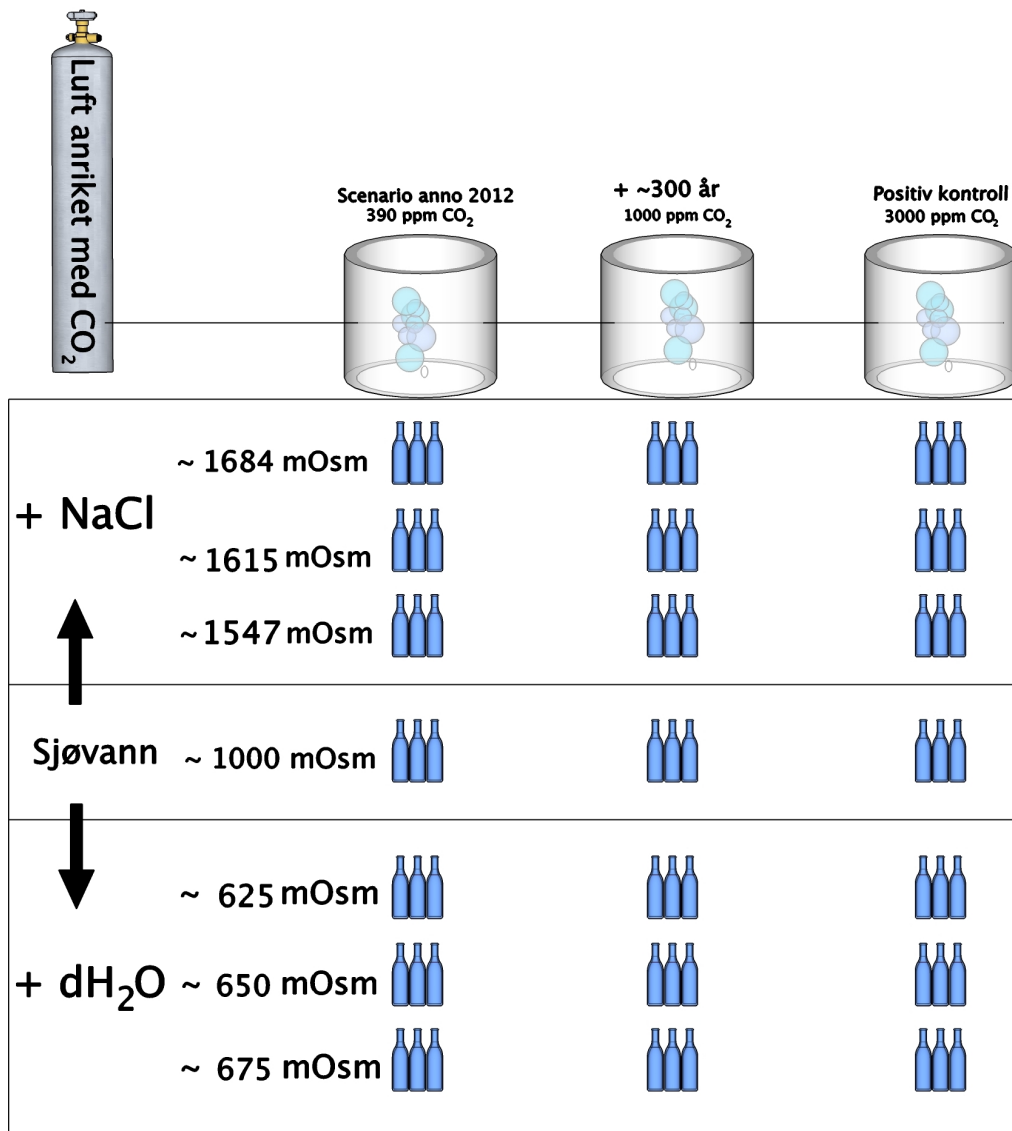
2.0 - Metoder og materialer.

Alt sjøvann benyttet i forsøkene var forhåndsbehandlet. Sjøvann fra 70 meters dybde ble pumpet fra Trondheimsfjorden, modnet mikrobielt og behandlet for å hindre overmetning av atmosfæriske gasser (Skjermo et al., 1997). Sjøvann behandlet på denne måten kalles heretter "sjøvann". Kulturbeholdninger av *C. finmarchicus* benyttet i eksperimentene ble opprettet i 2004 ved NTNU - senter for fiskeri og havbruk i Trondheim (Hansen et al., 2007).

2.1 - To-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.

Det ble utført en to-faktor analyse av effekten ved varierende osmolaliteter og pCO₂ på akutt dødelighet (LT₅₀) hos *C. finmarchicus*. En pilotundersøkelse av effekt av varierende osmolalitet på dødelighet (LC₅₀) ble brukt som grunnlag for å plukke ut osmolaliteter benyttet i tofaktor-forsøket (vedlegg 1). CO₂-konsentrasjoner ble valgt ut fra tidligere etablerte LC₅₀-verdier for pCO₂ hos *C. finmarchicus* ved 10°C (vedlegg 2).

Osmolaliteter ble manipulert ved å tilsette henholdsvis fast NaCl (Sigma Aldrich, 99.5%) eller destillert vann til sjøvann. Modifikasjon av pCO₂ ble utført ved å boble løsningene med luft anrikt med CO₂. Gassblandingsens pCO₂ ble på forhånd verifisert med en CO₂ analysator (Qubit Systems CO₂ Analyzer S153). Forsøket ble utført i et kjølerom (10.4°C). Dyrene ble valgt ut tilfeldig fra en kultur som bestod av primært voksne dyr med variert kroppsstørrelse og kjønn. Alle individer var akklimert til sine respektive pH-verdier og sjøvann med normal salinitet (normosalin) over flere uker. Det ble laget normosaline kontroller ved samtlige pCO₂ benyttet i forsøket. Alle kombinasjoner av pCO₂ og salinitet ble laget i tre replikater og overført til gasstette glassflasker (Pyrex Bidby 0.5L). Til hver flaske ble det forsiktig overført syv voksne individer. Dødelighet ble registrert 3 ganger første døgn og deretter hver 24. time. En illustrasjon av forsøket er vist i figur 9.



Figur 9: Osmolaliteter ble manipulert ved å tilsette fast NaCl (Sigma Aldrich, 99.5% NaCl) eller destillert vann til sjøvann for å lage henholdsvis hyperosmotisk og hyposmotisk sjøvann. pCO₂ ble modifisert ved å boble inn prøveløsningene med luft anriket med CO₂. Det ble benyttet tre replikater i gasstette glassflasker (Pyrex Bidby 0.5L). Dødelighet ble registrert 3 ganger første døgn og hver 24. time deretter. Etter forsøket ble karbonatkjemien i forsøket kartlagt og beregnet ved å undersøke saliniteten, alkaliniteten, pH, osmolaliteten og pCO₂ i hver prøve.

Alle replikatene ble behandlet etter et konsekvent mønster for å oppnå lik behandling av prøvene. Et individ ble definert som død dersom det ikke beveget seg aktivt ved en moderat forstyrrelse, uavhengig av hvor i vannsøylen det befant seg. Dyr som viste tydelig tegn på nedbrytelse av organismen eller hadde kroppsvæsker på utsiden av kroppen, ble også definert som døde.

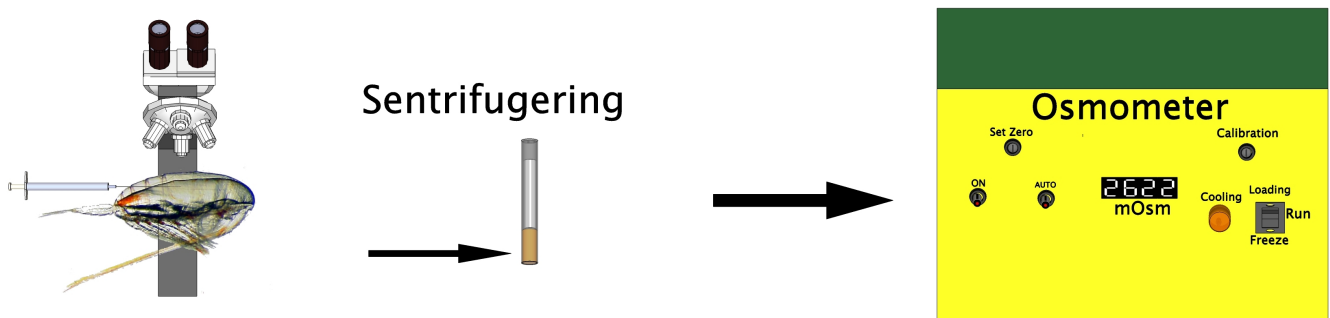
Eksponeringsbetingelsene ble kartlagt umiddelbart etter åpning av hver prøveflaske. Målingen ble utført med et pH-meter (VWR PH1000H), kalibrert mot standardløsning pH 4.005 (IUPAC) og pH 7.000 (IUPAC) og regelmessig kontrollert mot standard. Det ble benyttet en pH-skala utviklet av National Bureau of Standard (NBS pH-skala). Osmolaliteten (mOsm) i løsningene ble bestemt ved hjelp av et damptrykkosmometer (Wescor 5500 Vapor Pressure Osmometer). Osmometeret ble kalibrert mot en standardløsning (Knauer Standard 1028mOsm) og destillert vann. Det ble regelmessig utført kontroller mot standardløsning. Salinitet (ppt) ble bestemt optisk med et refraktometer (Aquarium Solution - Auto Temperatur Correcting Salinity Refractometer). Total alkalinitet ($\mu\text{mol/kg}$) ble bestemt med en autotitrator (Radiometer Analytical - Titrablab TIM860 Titration Manager). Autotitratoren og refraktometeret ble regelmessig korrigert mot en sertifisert sjøvannsstandard (University of California, San Diego. Se vedlegg 3).

2.1.1 - Statistikk

Verdier for LT_{50} ved hver enkelt replikat ble bestemt ved hjelp av logistisk regresjon i R (vedlegg 4,8,9,10). Ekstreme målinger av LT_{50} ble fjernet i tilfeller hvor standardavviket var høyere enn 90% av LT -verdien eller hvor LT_{50} -verdien var null eller mindre. Nominell $p\text{CO}_2$, nominell osmolalitet ble analysert ved hjelp av IBM SPSS Statistics 20 og LT_{50} -verdiene ble kontrollert for eventuelle avvik fra homogen varians ved hjelp av Levines test. For å avdekke signifikante forskjeller mellom behandlingene og eventuelle signifikante interaksjoner mellom faktorene $p\text{CO}_2$ og osmolalitet ble det benyttet en toveis ANOVA. Signifikansnivået i alle statistiske tester ble satt til 0.05.

2.2 - Prøvetaking og osmolalitetmåling på hemolymfe fra *C. finmarchicus*

Kanyler for prøvetaking av hemolymfe ble produsert ved å trekke ut en spiss fra et åpent kapillærrør av glass (1.1 mm ytre diameter). Dette ble gjort ved hjelp av en maskin laget for dette formål (Cambden Instruments – All purpose pipette puller 1). For å lage et vakuum slik at hemolymfe kunne bli aspirert inn i kanylen, ble det benyttet en engangssprøyte (0.5mL) med en adapter av silikon. Dyrene ble overført fra sjøvann ved hjelp av en pasteurpipette og tørket lett med papir. Dyrene ble montert med superlim på en vertikalt festet glasstav (diameter 1 mm, 2 cm lang). Hemolymfeprøvene ble tatt ved å stikke kanylen parallelt med kroppen, i retning hodet. Optimal punksjon av kutikula ble observert i segmentskillene. Fordøyelsessystem, fettsekk og andre strukturer ble unngått. Prøvevolumet ble overført fra kapillæret til et nytt oppsamlingskapillær delvis fylt med medisinsk parafin. Oppsamling av hemolymfe fra flere dyr var nødvendig for å oppnå tilstrekkelig prøvevolum ($\approx 1 \mu\text{L}$). Prøven ble kortvarig sentrifugert i en enkel sentrifuge og lagret i fryser (-15°C). Osmolalitetmålinger ble utført ved hjelp av et Clifton nanoliter osmometer (Clifton Technical Physics, USA). Smeltepunktet på inntil 6 parallelle prøver ble observert ved hjelp av et mikroskop (Zeiss Stemi SV 11). Osmolaliteten ble avlest på osmometerets integrerte skala. Det ble deretter forsøkt å utvikle metoden til bruk på *C. finmarchicus* ved å systematisk variere ulike faktorer. En forenklet illustrasjon av forsøket er vist i figur 10.



Figur 10: Kapillærrør ble trukket ut til en tynn kanyle ved hjelp av en maskin tilpasset dette formålet. Det ble benyttet en engangssprøyte (0.5mL) med silikonadapter tilpasset kanylen. Dyrene ble overført fra sjøvannet ved hjelp av en pasteurpipette, tørket lett med papir og montert med superlim på en fastmontert glasstav. Hemolymfeprøven ble tatt ved å stikke kanylen parallelt med kroppsretningen mot hodet, mellom de midterste skallsegmentene. Fordøyelsessystem, fettsekk og andre strukturer ble unngått. Oppsamlingsrør med flere prøver ble kortvarig sentrifugert i en enkel sentrifuge. Prøven ble holdt fryst (-15°C) og under medisinsk parafin ved lagring. Prøvens osmolalitet ble målt på en nanoliter osmometer.

2.3 - Histologisk sølvfarging av potensielt ionetransporterende vev hos *C.*

finmarchicus

Metoden ble basert på en sølvfargingsteknikk beskrevet i et studie av ionocytter hos *Artemia Salina* (Holliday, 1998 ; Holliday 1990). Metoden utnyttet at vev som passivt eller aktivt var permeable for ioner ville ha en netto bevegelse av tilsatte sølvioner intracellulært.

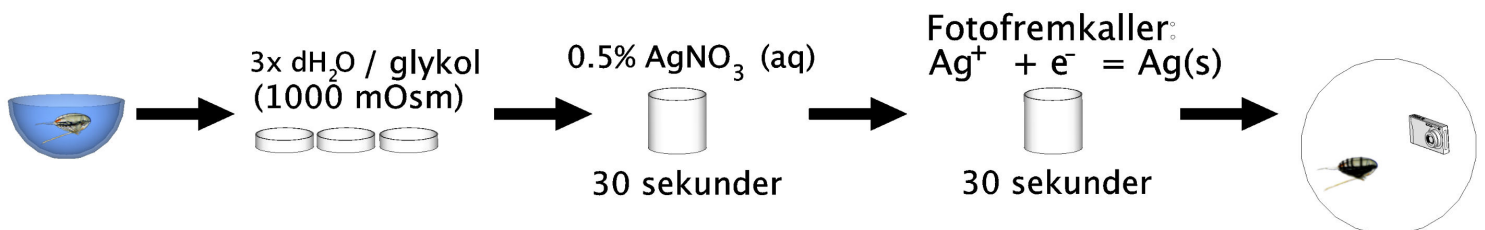
Intracellulært vil sølvionene kunne omdannes til elementært sølv ved tilsetning av fotografisk fremkaller. Dette ville farge de aktuelle områdene med en svart, tydelig kontrast. For å kontrollere om etablering av metoden var vellykket, ble metoden replikert hos *A. salina*.

Metoden ble deretter forsøkt utviklet til bruk på *C. finmarchicus*.

Voksne *C. finmarchicus*-individer ble overført fra saltvann til tre sekvensielle bad med destillert vann. Dyrene ble overført til en sølvnitratløsning (0.5 masse % av Sigma Aldrich 99% AgNO_3), tørket lett med papir og overført til en fremkaller løsning (10 volum % Ilford Multigrade eller 50 volum % Kodak D19). Ved endt behandling ble individene overført til destillert vann og avfotografert under mikroskop (Leica MZ 125 og Sony DFW-SX900).

Vaskeregimer med forskjellige varigheter og osmolaliteter ble utprøvd. Osmolaliteten ble manipulert ved tilsetning av varierende mengder glyserol (Sigma Aldrich, 99% Glycerole).

Det ble benyttet ulike konsentrasjoner og eksponeringstider av kjemisk fremkaller og sølvnitratløsning. En illustrasjon av forsøket er vist i figur 11.



Figur 11: Figuren viser et eksempel på sølvfarging av *C. finmarchicus*, hvor konsentrasjoner og eksponeringstider ble variert utover angitte verdier. Dyret ble overført fra saltvann til et tredelt vaskertrinn med destillert vann tilsatt glyserol (≈ 1000 mOsm). Dyret ble tørket lett med papir, og 0.5% $\text{AgNO}_3(\text{aq})$ ble tilsatt. Etter en eksponeringstid på 30 sekunder ble dyret tørket med papir, før fremkaller ble tilsatt. Etter en eksponeringstid på 30 sekunder ble dyret tørket med papir, og oppbevart i destillert vann inntil avfotografering under mikroskop.

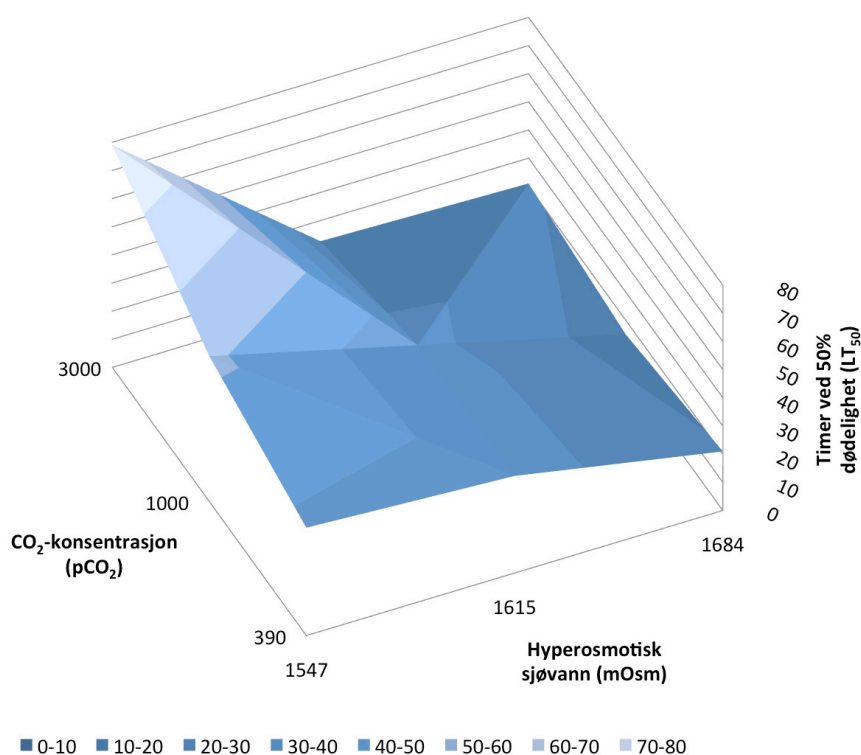
3.0 - Resultater

3.1 - To-faktor analyse av effekt av osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.

Det ble utført målinger og beregninger for å kartlegge karbonatkjemien organismene ble utsatt for i dette forsøket. Dette vises i vedlegg 5, 6 og 7.

Det ble observert en LT₅₀-verdi ved gjennomsnittet av alle pCO₂ og alle hyperosmotiske behandlinger på 33.1±17.6 timer.

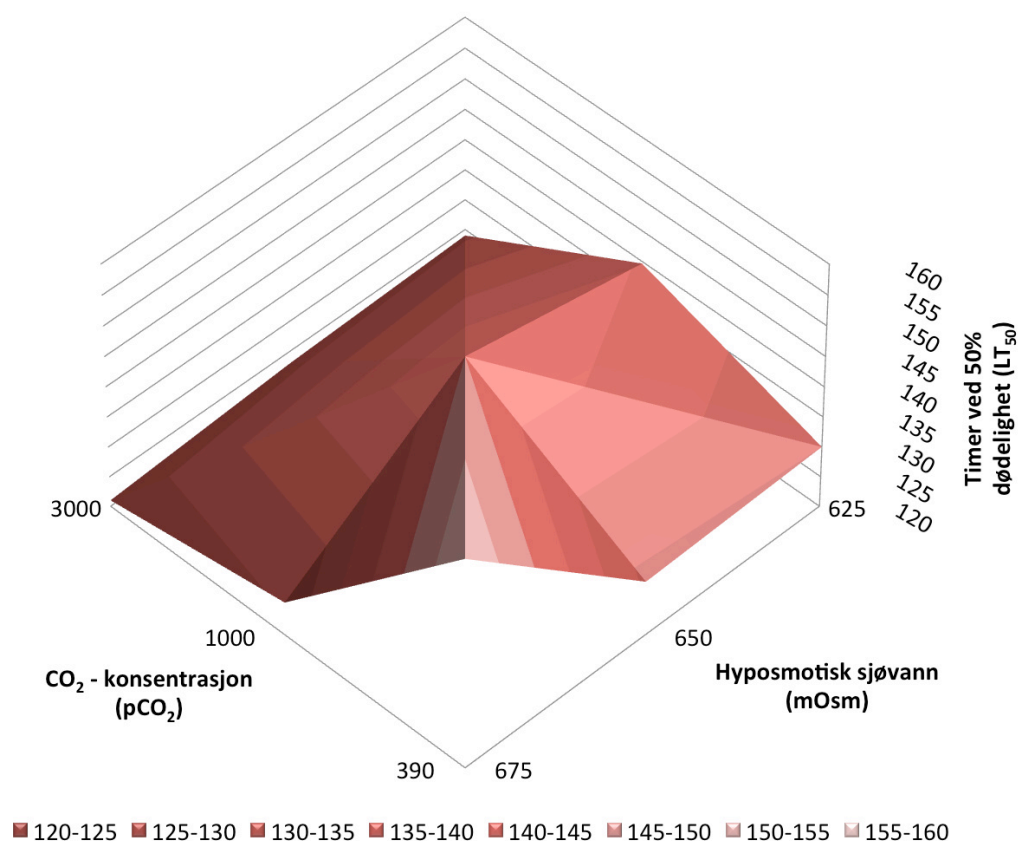
Det var en signifikant effekt på dødelighet av behandlingene i forsøket hvor økende osmolaliteter og ulike nivå av forhøyet pCO₂ ble kombinert (p= 0.02, F=6.351, df=8). Økning i osmolalitet ga en signifikant effekt (p<0.001, F=19.884, df=2). Økning av pCO₂ alene viste imidlertid ingen signifikant effekt. Det var en signifikant interaksjon mellom faktoren osmolalitet og pCO₂ (p=0.037, F=3.618, df=4). Det ble observert en positiv effekt på overlevelse ved økende pCO₂ ved én hyperosmotiske sjøvannsbehandling (1547 mOsm). LT₅₀-verdier i forhold til CO₂-konsentrasjon (pCO₂) og osmolalitet (mOsm) er illustrert i figur 12.



Figur 12: Grafen viser endring av LT₅₀ ved varierende hyperosmotisk sjøvann (mOsm) og pCO₂. Lysere fargenyanser henviser til relativt lavere dødelighet (høy LT₅₀), mens mørkere fargenyanser henviser til høyere dødelighet (lav LT₅₀).

Det ble ikke observert en signifikant effekt på dødelighet av behandlingene i forsøket hvor minkende osmolaliteter og ulike nivå av forhøyet pCO₂ ble kombinert. Det ble observert en LT₅₀-verdi ved gjennomsnittet av alle pCO₂ og alle hyposmotiske behandlinger på 132.3±19.3 timer.

LT₅₀-verdier i forhold til CO₂-konsentrasjon (pCO₂) og osmolalitet (mOsm) er illustrert i figur 13.



Figur 13: Grafen viser endring av LT₅₀ ved varierende hyposmotisk sjøvann (mOsm) og pCO₂. Lysere fargenyanser henviser til relativ lavere dødelighet (høy LT₅₀), mens mørkere fargenyanser henviser til høyere dødelighet (lav LT₅₀).

3.2 - Metodeutvikling - Osmolalitetmåling av hemolymfe hos *C. finmarchicus*.

3.2.1 - Utvikling av metodikk for hemolymfeprøvetaking.

Det ble eksperimentert for å finne fram til en kanyleform som gav størst mulig hemolymfeprøve. Det viste seg fordelaktig å benytte relativt korte og dermed stive glasskanyler. Dette førte til at penetrasjon av kutikula kunne gjennomføres uten brekkasje av kanylen. Uprøving viste at optimale glasskanyler hadde en indre diameter på mindre enn 1 mm, med en uttrukket spiss på opptil 20 mm med en ytre diameter på 0.2-0.3 mm på det tynneste.

Presis manipulering av engangssprøyten var avgjørende for vellykket prøvetaking av hemolymfe. Det ble dermed benyttet en sprøyte med lavt volum (0.5mL). Ergonomisk modifisering gjennom utvidelse av sprøytens håndteringsflater ga forbedret kontroll i forbindelse med prøvetakingen. Presis kontroll av oppsugningsvolumet var nødvendig for å oppnå en luftfri hemolymfeprøve uten forurensinger.

Direkte overførsel av hemolymfe fra dyr til prøvebrønn i osmometeret ble initielt ansett som den beste metoden for å unngå fordampningseffekter. Forsøk gjennomført i løpet av arbeidet viste imidlertid at direkte overførsel av umodifisert hemolymfe gav målinger med høye standardavvik og lav målbarhet (tabell 3).

Forflytning eller sentrifugering av svært små volumer kan føre til fordampningseffekter som påvirker løsningens osmolalitet. Sentrifugering var likevel nødvendig for å samle og muliggjøre forflytning av de små hemolymfeprøvene. For å minimalisere fordampningseffekter ble hemolymfeprøvene skjermet fra direkte kontakt med luft ved hjelp av et beskyttende lag med flytende parafin og lagret i fryser (-15°C).

3.2.2 - Utvikling av metodikk for osmolalitetmålinger på Clifton nanoliter osmometer

Det finnes flere aspekter ved osmometerets funksjon som kan bidra til lav presisjon og nøyaktighet.

Ujevn temperaturfordeling mellom de ulike prøvebrønnene vil føre til variasjon i målinger hos identiske prøver. Målinger av seks replikater destillert vann viste lave standardavvik mellom prøvebrønnene (1-2 mOsm). Dette støtter en observasjon om uniform temperaturfordeling over alle prøvebrønnene.

Store temperatursvingninger i en prøvebrønn vil kunne gi en upresis måling av smeltepunkt. Prøver med destillert vann ble temperaturregulert slik at en iskrystall ble holdt stabilt i skillet mellom fullstendig smeltet og så vidt synlig krystall. Det ble utført målinger av destillert vann og standardløsning (1028 mOsm). Et tydelig smeltepunkt ble observert hver gang en måling ble foretatt, noe som resulterte i relativt lave standardavvik (henholdsvis 2 mOsm og 72 mOsm). Observasjonen av jevn temperaturfordeling og presis temperaturkontroll underbygget at osmometeret fungerte optimalt.

Innledende osmolalitetmålinger på umodifiserte hemolymfeprøver fra *C. finmarchicus* avslørte imidlertid flere egenskaper som bidro til at smeltepunktsavlesninger var problematiske.

Det var avgjørende å kunne observere veldefinerte iskrystaller i en fryst prøve for å kunne bestemme smeltepunktet. Ved frysing av umodifiserte hemolymfeprøver ble det imidlertid observert en tåke av is, slik at ved oppvarming av prøven ble det derfor kun observert en gradvis overgang fra iståke til fullstendig smeltet. Dette gjorde at smeltepunktet var problematisk å fastslå. Dette førte til at smeltepunktet ble observert i 33% av tilfellene i osmolalitetmåling av umodifisert hemolymfe, med et standardavvik på 532 mOsm.

Hemolymfeprøvene hadde lav gjennomsiktighet og kunne inneholde islignende partikler, noe som virket forstyrrende på målingen. Det ble eksperimentert med kortvarig sentrifugering av hemolymfeprøvene for om mulig å fjerne noen av partiklene. Det ble observert tydeligere iskrystaller ved bestemmelse av smeltepunkt på sentrifugerte hemolymfeprøver. Det ble observert et smeltepunkt i 65% av tilfellene i forsøk med sentrifugert hemolymfe, men med uendret standardavvik på 570 mOsm.

Forbindelsen fenyltiocarbamide (Phenylthiocarbamide, PTC, Sigma Aldrich) er kjent for å blokkere melaniseringsreaksjoner (dannelse av brunfarge) i hemolymfe (Zettervall et al., 2004). Tilsetning av PTC før sentrifugering førte til at hemolymfen virket mer gjennomskiktig. Tendens til dannelsen av tydeligere krystaller ved frysing ble større. Det ble observert et smeltepunkt i 100% av tilfellene, men standardavviket økte imidlertid (1469 mOsm).

Osmolaliteten til en prøve er avhengig av forholdet mellom konsentrasjonen av osmotisk aktive komponenter og volumet til prøven. Det ble undersøkt om det kan være problemer med volumendringer, endringer i stoffmengden osmotisk aktive komponenter, eller begge deler, kunne gi opphav til de høye standardavvikene.

Et prøvevolum fullstendig omsluttet av olje, vil ha ingen mulighet til å endre vanninnhold. En prøve i kontakt med luft kan identifiseres ved å justere dybdeskarpheten gjennom prøven, som vil vise en tydelig ring i kontaktflaten mot luft.

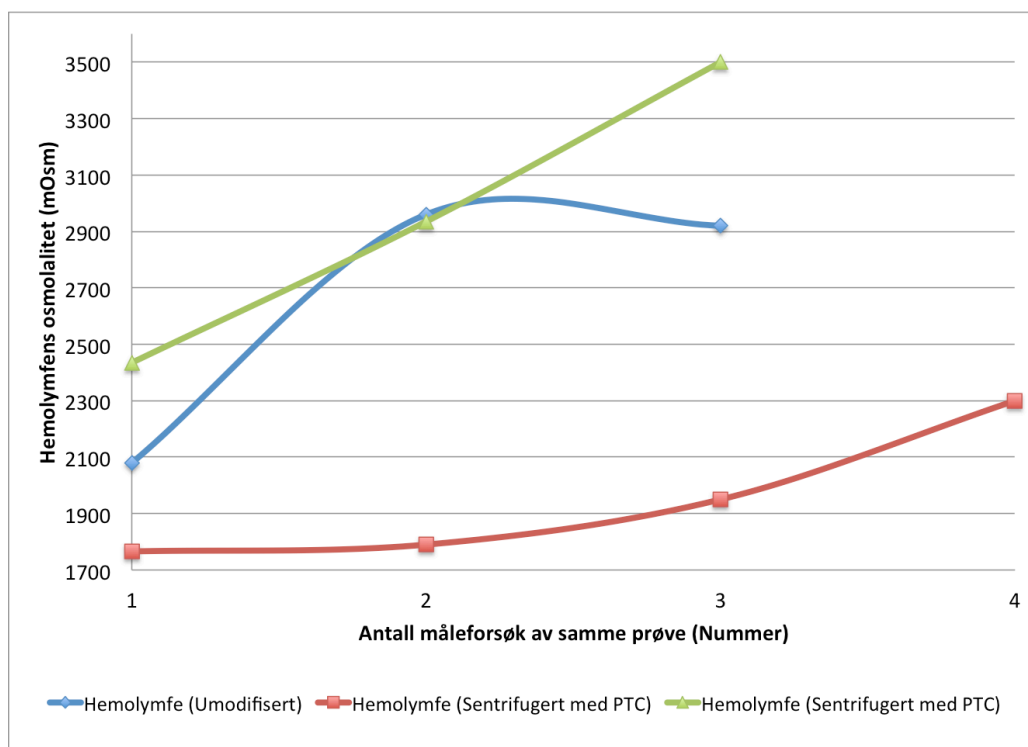
Det ble observert flere eksempler på målinger som steg fra cirka 1000 mOsm til 3000 mOsm ved gjentakende målinger av samme prøve, ved både umodifiserte og modifiserte hemolymfeprøver (figur 14). Hemolymfeprøver inkubert ved romtemperatur fra 0-3 timer ble målt og det ble observert en konstant forekomst av stigende målinger uavhengig av inkubasjonstid.

Det ble observert at prøvens diameter relativt til prøvebrønnens diameter hadde påvirkning på tendensene til stigende måleresultater. Det ble eksperimentert med prøvediametere fra 15% til 90% av prøvebrønnens diameter.

Det ble observert stigende målinger i hemolymfeprøver med prøvediametere høyere enn 25% av prøvebrønnens diameter, i 75% av tilfellene, med et standardavvik på 1384 mOsm.

Det ble videre observert stigende målinger hos prøvediametere lavere enn 25% av prøvebrønnens diameter, i 33% av tilfellene med et standardavvik på 493 mOsm.

Tabell 3 viser hvilke prøver som ble målt, angitt med standardavvik, prosentandel målbare prøver, og prosentandel hvor det ble observert stigende målinger (Rådata i vedlegg 11).



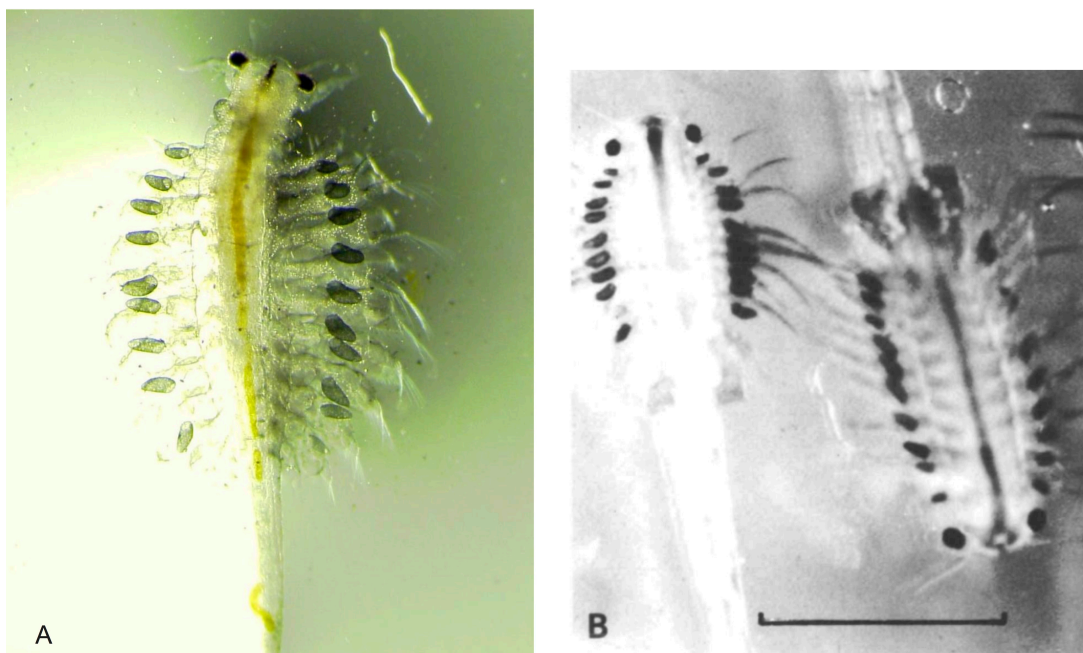
Figur 14: Grafen viser hvordan gjentakende måleforsøk av osmolaliteten til tre hemolymfeprøver (umodifisert og sentrifugert med PTC) viste en tendens til å øke når samme prøve ble målt flere ganger.

Tabell 1: Det ble eksperimentert med ulike modifikasjoner på hemolymfeprøvene i et forsøk på å etablere en metode som hadde lavt standardavvik, høy andel av målbare prøver og med ingen tendenser til stigende målinger.

Prøve	St. Dev	Målbare prøver	Tydlig stigende målinger
Destillert vann (0mOsm)	2	100%	0%
Standardløsning (1028mOsm)	72	100%	0%
Hemolymfe (Umodifisert)	532	33%	100%
Hemolymfe (Sentrifugert)	570	65%	53%
Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1469	100%	50%
Hemolymfe, sentrifugert med PTC, prøvediameter > 25%)	1384	100%	75%
Hemolymfe, sentrifugert med PTC, prøvediameter < 25%)	493	100%	33%

3.3 - Metodeutvikling - Sølvfarging hos *C. finmarchicus*

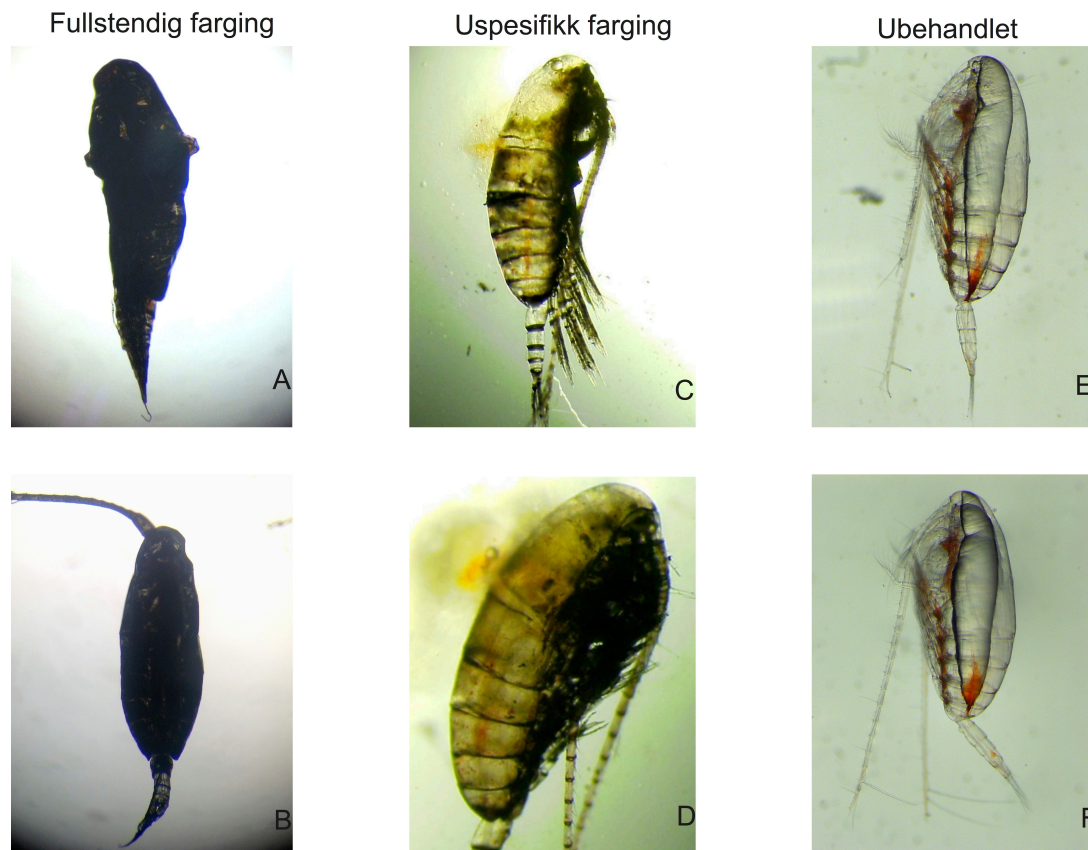
Metoden ble tilpasset fra et lignende forsøk utført på *A. salina* (Holliday, 1988 ; Holliday 1990). Verifikasjon av denne metoden ble utført på *A. salina* alet opp fra frysetørkede egg. Det ble funnet at alle kombinasjoner av sølvnitratkonsentrasjoner, fremkallerkonsentrasjoner, eksponeringstider og behandlingsregimer ga kvalitativt positive resultater hos voksne *A. salina*. Det ble ikke observert noen påvirkning på dyrets kroppslige integritet ved noen av behandlingskombinasjonene. Kvaliteten på observasjonene i eget arbeid tilsvarte viste kvalitet som oppnådd av Holliday (1990), noe som underbygger at den opprinnelige metoden var etablert. Et eksempel på dette vises i figur 15.



Figur 15: Bilde A viser et eksempel på sølvfarging av *A. Salina* utført i dette arbeidet. Bilde B viser tilsvarende bilder av sølvfarging av *A. Salina* utført av Holliday et al (1988 og 1990). De mørke feltene sett på hver side av kroppen er områder på metepipoditene farget positivt av sølvfarging. Fargen henviser til hvor det sannsynligvis har foregått en aktiv eller passiv ionetransport.

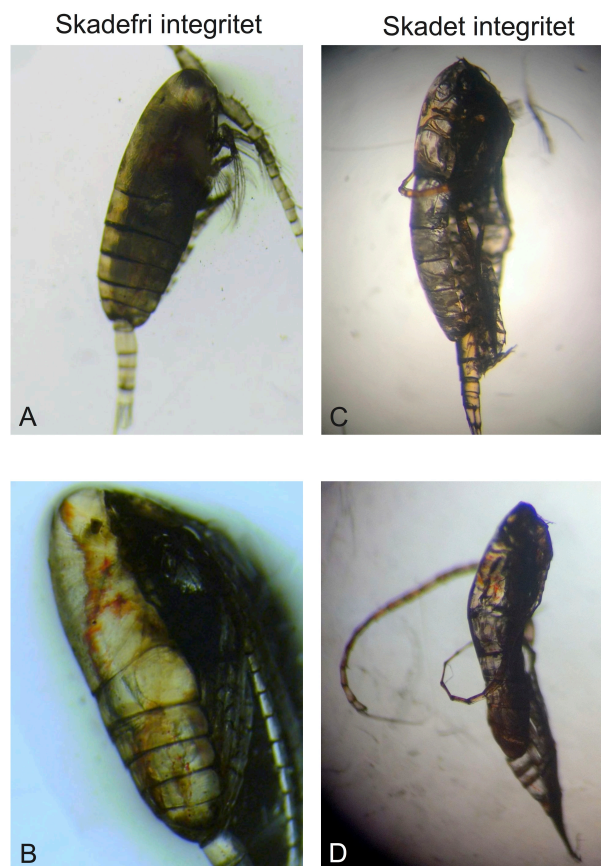
Det viste seg problematisk å utvikle metoden til bruk på *C. finmarchicus*.

Det ble observert en uspesifikk farging av antenner og andre vedheng ventralt og generelt mørkere kutikula hos *C. finmarchicus*. Fullstendig farging av hele organismen ble observert i tilfeller hvor særlige høye konsentrasjoner eller eksponeringstider ble benyttet. Eksempler på behandlede dyr blir vist i figur 16.



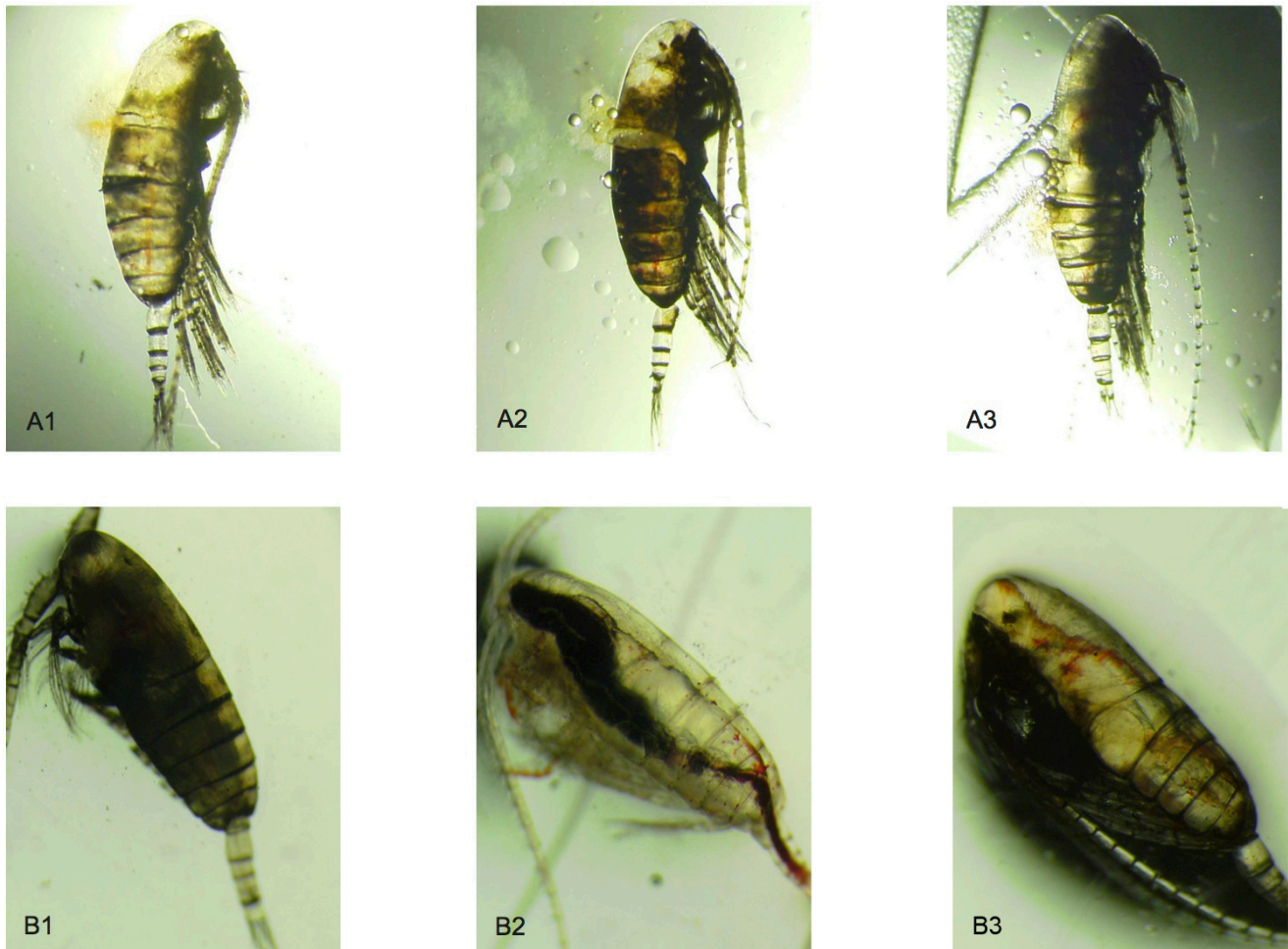
Figur 16: Bilder av voksne *C. finmarchicus* behandlet med sølvfargingsteknikken. Fullstendig farging innebar farging av alle deler av dyret med en ugjennomsiktig, svart farge. Dette ble observert i individer behandlet med særlig høye konsentrasjoner og eksponeringstider (foto A og B). En uspesifikk farging innebar variert farging av kroppen, med en noe mer konsekvent farging av antenner, vedheng og i segmentskillere. Dette ble observert hos *C. finmarchicus* behandlet ved varierte kombinasjoner av sølvnitratkonsentrasjoner, fremkallerkonsentrasjoner og eksponeringstider (foto C og D). Eksempler på ubehandlede individer er vist i foto E og F. Foto A-E: Lars Kristian Schjønhau, Foto E-F: Marit Aase.

Det ble observert skader på det ytre skall til *C. finmarchicus* i 50% av tilfellene hvor dyret var i kontakt med destillert vann. Det ble også observert en umiddelbar imobilitet og potensiell prematur dødelighet ved kontakt med destillert vann. Det ble videre observert at problemet med skadet integritet opphørte i 100% av tilfellene når vasking med destillert vann ble byttet ut med destillert vann der osmolaliteten ble hevet til ≈ 1000 mOsm ved hjelp av glyserol. Det ble observert en høyere grad av mobilitet hos dyrene etter denne modifikasjonen. Figur 17 viser eksempler på dyr med skadet integritet og dyr uten skadet integritet etter tilsetning av glyserol.



Figur 17: Effekt av destillert vann på voksne *C. finmarchicus*. Kontakt med et vaskeregime bestående av destillert vann viste tendenser til å skade integriteten hos dyrene. I et forsøk på å unngå skader ble det eksperimentert med økning av osmolaliteter ved tilsetning av glyserol til destillert vann. Foto A og B viser eksempler hvor vaskeregimet bestod av destillert vann tilsatt glyserol tilsvarende normosalint sjøvann (≈ 1000 mOsm). Dette førte til observasjonen av et skadefri integritet i 100% av tilfellene. Foto C og D viser eksempler på dyr behandlet uten denne modifikasjonen. Dette førte til et skadet ytre i 50% av tilfellene. Foto A-D: Lars Kristian Schjønhaug.

Det ble observert en tydelig variasjon i sølvfargingens posisjon og intensitet til tross for at dyrene ble behandlet identisk. Det ble imidlertid observert enkelte likhetstrekk mellom behandlingene, som bestod av mer konsekvent farging av vedheng og segmentskiller. Eksempler på dette vises i figur 18. Denne observasjonen ble gjort i samtlige kombinasjoner av sølvnitratkonsentrasjon, fremkallerkonsentrasjon og eksponeringstid som ble benyttet i løpet av dette arbeidet.



Figur 18: Fargevariasjoner ved sølvfarging av *C. finmarchicus* til tross for identisk behandling.

Foto A1, A2 og A3 ble behandlet identisk og sølvfargen demonstrerer ulike intensiteter og lokasjoner.

Foto B1, B2 og B3 ble behandlet identisk og sølvfargen demonstrerer ulike intensiteter og lokasjoner.

Det ble likevel observert enkelt likhetstrekk ved behandlingene. Sølvfarging av vedheng og

segmentskiller ble mer konsekvent observert. Foto A-D: Lars Kristian Schjønhaug

4.0 - Diskusjon

4.1 - To-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.

Det ble observert en positiv effekt på overlevelse ved økende pCO₂ ved en hyperosmotiske sjøvannsbehandling (1547 mOsm), noe som underbygger hypotesen om at det er en interaksjon mellom effekten av hyperosmotisk sjøvann og effekten av forhøyet pCO₂ på dødelighet. En mulig interaksjon mellom osmoregulering og syre/base-regulering kan for eksempel være en endring av konsentrasjonsgradienter. Det er mer energikrevende for en osmoregulatorisk struktur å arbeide opp en konsentrasjongradient enn ned en konsentrasjongradient. Dette kan dermed føre til at en organisme opplever et mindre behov for aktiv, energikrevende transport, og med en forbedring i energibudsjettet lavere dødelighet potensielt observeres. Det kan tenkes at en økning av H₃O⁺-konsentrasjon kan bidra til å modifisere en protongradient tilstrekkelig, slik at den kan virke fordelaktig gjennom en interaksjon med osmoregulering. Den mildeste hyperosmotiske sjøvannsbehandlingen i dette forsøket var cirka 50% mer salint enn ordinært sjøvann, noe som er en betydelig eksponering for en organisme som lever i de frie vannmassene hvor saliniteten generelt er stabil. Det kan dermed tenkes at den positive effekten ligger i det øvre spekteret av hvor det kan observeres en positiv effekt fra interaksjonen, uten at dødeligheten til enkeltfaktorene blir for høy. Det er nødvendig med en bredere valg av konsentrasjoner for å kunne undersøke om hvorvidt det foreligger en eventuell additiv, synergistisk eller antagonistisk effekt hvor faktorene kombineres.

Det ble observert en negativ effekt på overlevelse ved økende hyperosmotisk sjøvannsbehandling (1547 til 1684 mOsm). *C. finmarchicus* utsatt for hyperosmotiske forhold i framtidige havforsuringsscenarioer, vil dermed kunne oppleve høyere dødelighet. Endringer i atmosfærisk temperatur vil kunne føre til endringer i det globale fordampnings- og nedbørsmønstre, hvor det forventes høyere saltkonsentrasjoner ekvatorielt til minkende saliniteter i retning polene (IPCC, 2007). Dette vil si at denne problemstillingen er mindre relevant for *C. finmarchicus*, som primært finnes i de høye breddegrader på den nordlige halvkule hvor det ikke forventes økende saliniteter.

Det ble ikke avdekket signifikante effekter av hyposmotisk behandling, noe som innebærer at hypotesen som omhandler interaksjoner mellom hyposmotisk sjøvann og forhøyet pCO₂ effekt på dødelighet ikke kan underbygges. Det ble videre observert en relativt høy gjennomsnittlig overlevelse ved hyposmotisk behandling. Benyttelsen av en for mild eksponering mot hyposmotisk sjøvann kan ha bidratt til å maskere en potensiell signifikant sammenheng. Fremtidige forsøk burde inkorporere en strengere hyposmotisk behandling for å avdekke potensielt signifikante effekter på dødelighet. Videre vil en utvidelse av forsøket til å inkludere en bredere skala av osmolalitätsbehandlinger kunne bidra til en undersøkelse med større muligheter for sammenligninger. Eksempelvis kan et forsøk med konsentrasjoner som er symmetrisk om sjøvanns osmolalitet benyttes. Dette vil kunne bidra til å belyse om hvorvidt belastninger av hyperosmotisk sjøvann eller hyposmotisk sjøvann vil være mest skadelig for *C. finmarchicus*.

Det ble avdekket aspekter ved den praktiske gjennomføringen av tofaktorforsøket som kan forbedres i et framtidig forsøk. Hyposmotiske behandlinger viste en tydelig tendens til å føre til immobilitet for organismen de første eksponeringstimene, før individene igjen oppviste mobilitet. Denne tendensen kan ha ført til feilregistreringer, hvor individer registrert som døde ved forsøksstart, faktisk var immobile. Hos individer som faktisk døde i løpet av en slik sjokkfase, vil det ha vært vanskelig å etablere et reelt dødstidspunkt siden det ikke var mulig å definere hvor en eventuell sjokkfase sluttet og døden inntraff. Det finnes flere fargemetoder som utnytter at levende dyr farges annerledes enn døde dyr, eksempelvis nøytral-rød-fargemetoden (Elliot og Tang, 2009 ; Zetsche et al, 2012). Metodene er generelt ikke mulig å benytte i et forsøk hvor dødeligheten skal registreres flere ganger på samme individ, da behandlingene i seg selv er dødelig for organismen.

Bruk av beholdere hvor registreringen kan gjøres effektivt og korrekt vil føre til at individtallet per replikat kan økes. Lysbrytningen i runde glassflasker av typen som ble benyttet i forsøket forårsaket visuelle blindsoner, noe som kan ha ført til at noen dyr kunne ha blitt registrert dobbelt eller ikke ble registrert. Benyttelsen av gasstette, høye, rektangulære flasker vil kunne bidra til færre feilregistreringer.

4.2 - Metodeutvikling - Osmolalitetmåling av hemolymfe hos *C. finmarchicus*.

Det ble observert osmolalitetmålinger av samme hemolymfeprøve som endret seg fra cirka 1000 mOsm til 3000 mOsm (figur 14). Hvis denne endringen skulle forklares ut ifra ren fordampning, ville dette krevd en relativ volumendring av prøven fra 1 til $\frac{1}{3}$. En antagelse om invers proporsjonal sammenheng mellom prøvediameter og fordampning vil føre til en volumendring tilsvarende en diameterendring på cirka 30 % (Vedlegg 12). Dette tilsvarer en diameterendring som vil være lett synlig i mikroskop, og en slik endring ble ikke observert. Det ble antatt at en diameterendring ned mot 5-10 % vil være den minste observerbare endring.

Det ble observert at prøver med diametere lavere enn 25% av prøvebrønnens diameter hadde en tendens til å gi lavere standardavvik og lavere andel stigende målinger. Denne tendensen var ikke forventet, siden osmolaliteten til en prøve med høyere volum vil være mer robust mot påvirkning av fordampningseffekter. Det vil videre være problematisk å avlese osmolaliteten til prøver med diametere lavere en 15% av prøvebrønnens diameter direkte ut i fra iskrystallens størrelse. Et mindre prøvevolum stiller høyere krav til presis temperaturregulering hos osmometeret for osmolalitetmåling. Det er videre utfordrende å plassere en prøve med diameter på $20 \pm 5\%$ av prøvebrønnens diameter.

Autolytisk kløyving av proteiner til frie aminosyrer kunne ha ført til en økt molmengde osmotisk aktivt materiale i hemolymfeprøvene. Dette virker likevel ikke sannsynlig, da det ble observert en konstant forekomst av stigende målinger uavhengig av hemolymfeprøvens inkubasjonstid i romtemperatur. Observasjonene av påvirkningen av hemolymfeprøvens diameter i forhold til prøvebrønnens diameter kan peke i retning av en problemstilling koblet til osmometeret under måling. Sammen kan dette tyde på at en eventuell endring i hemolymfen først ble initiert ved plassering i prøvebrønnen fremfor å være relatert til fordampnings- eller enzymproblematikk. Dette er en problemstilling som må undersøkes videre. Metoden oppnådde ikke en tilstrekkelig presisjon hvor den kunne bidra til å belyse hypotesen satt opp for dette delforsøket. Det vil dermed være nødvendig med videre utvikling for å kunne underbygge eller falsifisere hypotesen.

4.3 - Metodeutvikling - Sølvfarging hos *C. finmarchicus*.

Den vellykkede sølvfargingen av voksne *A. salina* ved alle variasjoner av metoden viser at selve metoden i seg selv er robust. Likevel fungerte ikke metoden på *C. finmarchicus*.

A. salina kan leve under svært varierte saliniteter, noe som medfører et behov for en betydelig ionocytaktivitet. Dette kan tyde på at sølvfargingsmetoden er relativt lite sensitiv og at det trengs en betydelig ionocytaktivitet for å produsere et tilstrekkelig signal.

De varierende lokasjonene og intensiteten av sølvfarging hos individer eksponert for samme behandling, kan tyde på at metoden har en lav signal-til-støy ratio hos *C. finmarchicus*. Dette vil si at andre faktorer har stor påvirkning på sølvfargens posisjon og intensitet, og dette vil maskere en eventuell sølvfarging påvirket av ionocyttenes aktivitet. Det kan også tenkes at det finnes reaktive elementer på overflaten til *C. finmarchicus* som fører til retensjon av sølvioner på overflaten og medfører falske positiver. Det er observert flere typer proteiner og polysakkarider på overflaten hos *C. finmarchicus* (Raymont et al, 1974).

Metoden viste store variasjoner som gjorde det problematisk å undersøke hypotesen satt opp for dette delforsøket. Det vil dermed være nødvendig med videre utvikling for å kunne underbygge eller falsifisere hypotesen.

I et fremtidig forsøk vil det være et mål å unngå immobilitet og prematur dødelighet hos dyrene i forsøk hvor det skal undersøkes en struktur som må være i forholdsvis høy aktivitet i for å føre til positivt indikasjon. Det vil dermed være viktig å rette fokus mot å tilpasse metodene slik at individene kan overleve lengst mulig igjennom en fargeprosess. Det vil også være interessant å se på andre metoder som kan farge ionecytter ut i fra sine karakteristiske egenskaper, som høy mitokondrietetthet eller ionetransportaktivitet. Eksempler på dette kan være fluorescens mitokondriefargeteknikker (Agnello et al, 2008).

5.0 - Konklusjon

5.1 - To-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.

Det ble observert en positiv effekt på overlevelse ved økende pCO₂ ved en hyperosmotiske sjøvannsbehandling (1547 mOsm). Det kan tenkes at en potensiell endring av H₃O⁺ sin konsentrasjonsgradient kan bidra til at en osmoregulerende prosess kan unngå aktive, energikrevende arbeider som følge av en interaksjon med pCO₂. Det ble observert en negativ effekt på overlevelse ved økende hyperosmotisk sjøvannsbehandling (1547 til 1684 mOsm). Det forventes gjennom endringer i nedbør og fordampningsmønstrene minkende saliniteter i de høyere lengdegrader (IPCC, 2007). Dette gir en antydning at problemstillingen kan være mindre relevant for *C. finmarchicus*, som primært finnes i de høye breddegrader på den nordlige halvkule. I fremtidige forsøk bør det benyttes bredere eksponeringskonsentrasjonsintervaller, særlig for hyposmotiske sjøvannsbehandlinger. Dette kan blant annet bidra til et større sammenligningsgrunnlag mellom enkeltfaktorer.

5.2 - Metodeutvikling - Osmolalitetmåling av hemolymfe hos *C. finmarchicus*.

Resultatene viste at det var flere problematiske aspekter ved osmolalitetmålinger av hemolymfe hos *C. finmarchicus*. Ved måling av umodifisert hemolymfe var det vanskelig å få gjort en avlesning av smeltepunkt, og i de tilfellene det lyktes å få en avlesning var standardavviket på parallelle målinger meget høy. Hovedproblemet med målinger av umodifisert hemolymfe var innhold av forstyrrende partikler og redusert gjennomsiktighet på grunn av mye farge, samt dannelsen av iståke som gjorde det meget vanskelig å lese av smeltepunktet. Dette ble forbedret ved sentrifugering og ved tilsetning av PTC.

Det ble observert en tendens til at osmolalitetmålinger av umodifisert hemolymfe økte over tid, ved gjentakende måling av samme prøve. Det ble observert at prøvediametere lavere enn 25% i forhold til prøvebrønnen hadde en positiv betydning for denne tendensen. Videre er det sannsynlig at det ikke foreligger problemer med fordampnings- eller enzyeffekter i forhold til tendenes til stigende osmolalitetmålinger hos hemolymfeprøvene. Til tross for disse forbedringene gjenstår et videre arbeid med metodene før osmolalitetmålinger kan benyttes til å belyse hvordan hemolymfen påvirkes av kombinert stress fra osmolalitet- og pCO₂-endringer.

5.3 - Metodeutvikling - Sølvfarging hos *C. finmarchicus*.

Resultatene viste mange problematiske aspekter ved sølvfarging av eventuelle ionocytter hos *C. finmarchicus*. Det ble observert en høy variasjon i sølvfargingens lokasjon og intensitet hos individer eksponert for identisk behandling. Modifikasjoner gjennomført i løpet av arbeidet førte til at flere individer uten forble uten skader på ytre skall, og mindre grad av immobilitet og potensiell dødelighet ved en tidlig fase i forsøket. Det vil etter forfatterens mening være problematisk å videreutvikle denne metoden tilstrekkelig for å oppnå målet om spesifikk sølvfarging med en tilstrekkelig høy signal-til-støy ratio hos *C. finmarchicus*. Det kan dermed med fordel utforskes andre metoder som kan påvise ionocytter, som for eksempel mitokondriefarging eller andre fargemetoder som er spesifikke mot ionocytter sine karakteristiske trekk.

6.0 - Referanseliste

- Agnello M, Morici G, Rinaldi AM. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*. 2008;56(3):145-9.
- Aksnes DL, Blindheim J. Circulation patterns in the North Atlantic and possible impact on population dynamics of *Calanus finmarchicus*. *Ophelia*. 1996;44(1-3):7-28.
- Atsushi I, Takashi K, Masahiro H, Kyoung-Seon L, Jun K. Effects of CO₂ on Marine Fish: Larvae and Adults. *Journal of Oceanography*. 2004;60(4):731-41.
- Berge J, Cottier F, Last KS, Varpe Ø, Leu E, Søreide J, et al. Diel vertical migration of Arctic zooplankton during the polar night. *Biology Letters*. 2009;5(1):69-72.
- Blaxter JHS, Douglas B, Tyler PA, Mauchline J. *The Biology of Calanoid Copepods: The Biology of Calanoid Copepods*. Elsevier Science; 1998;:46,216,521.
- Bundy MH, Paffenhofer GA. Analysis of flow fields associated with freely swimming calanoid copepods. *Mar Ecol-Prog Ser*. 1996;133(1-3):99-113.
- Busch KET, Falk-Petersen I-B, Peruzzi S, Rist NA, Hamre K. Natural zooplankton as larval feed in intensive rearing systems for juvenile production of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*. 2010;41(12):1727-40.
- Caldeira K, Wickett ME. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*. 2003;425(6956):365.
- Cameron JN, Iwama GK. Compensation of progressive hypercapnia in channel catfish and blue crabs. *Journal of Experimental Biology*. 1987;133:183-97.
- Dudley PL. Aspects of general body shape and development in Copepoda, Syllogeus 1986;58:7-25.
- Elliott DT, Tang KW. Simple staining method for differentiating live and dead marine zooplankton in field samples. *Limnology and Oceanography-Methods*. 2009;7:585-94.
- FAO, Food and agriculture organization of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture, 2012*, Rome, Italy.
- Forget J, Pavillon J-F, Beliaeff B, Bocquenè, G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC₅₀ values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). Pensacola, FL, ETATS-UNIS: SETAC; 1999.
- Gonzalez CRM, Bradley BP. Salinity stress proteins in *Eurytemora affinis*. *Hydrobiologia*. 1994;292-293(0):461-8.

- Hansen BH, Altin D, Nordtug T, Olsen AJ. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2007;2(3):250-6.
- Hargrove JL, Greenspan P, Hartle DK. Nutritional Significance and Metabolism of Very Long Chain Fatty Alcohols and Acids from Dietary Waxes. *Experimental Biology and Medicine*. 2004;229(3):215-26.
- Hendriks IE, Duarte CM, Álvarez M. Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2010;86(2):157-64.
- Hiroi J, McCormick SD. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Respiratory Physiology; Neurobiology*. 2012.
- Holliday CW. Branchial Na^+/K^+ -ATPase and osmoregulation in the isopod *Idotea Wosnesenskii*. *Journal of Experimental Biology*. 1988;136:259-72.
- Holliday CW, Roye DB, Roer RD. Salinity-induced changes in branchial Na^+/K^+ -ATPase activity and transepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia Salina*. *Journal of Experimental Biology*. 1990;151:279-96.
- Hosfeld B, Schminke HK. The ultrastructure of ionocytes from osmoregulatory integumental windows of *Parastenocaris vicesima* (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida), *Arch. Hydrobiol*. 1997;139(3):389-400.
- Humes AG. How many copepods? *Hydrobiologia*. 1994;292-293(1):1-7.
- Ikeda T. *Nutritional Ecology of Marine Zooplankton*: Hokkaido University. Faculty of Fisheries; 1974;:40,51.
- IPCC: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2007;:
- Lignot JH, Charmantier-Daures M, Charmantier G. Immunolocalization of Na^+,K^+ -ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res*. 1999;296(2):417-26.
- Manahan SE. *Environmental Chemistry*, Eighth Edition: Taylor & Francis Group; 2005;:59.
- Marshall S. The Food of *Calanus finmarchicus* during 1923. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)*. 1924;13(02):473-9.

- Mayor DJ, Matthews C, Cook K, Zuur AF, Hay S. CO₂-induced acidification affects hatching success in *Calanus finmarchicus*. Marine Ecology Progress Series. 2007;350:91-7.
- McCormick SD. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. American Zoologist. 2001;41(4):781-94.
- Moraitouapostolopoulou M, Verriopoulos G. Individual and combined toxicity of 3 heavy metals, Cu, Cd and Cr for the marine copepod *Tisbe holothuriae*. Hydrobiologia. 1982;87(1):83-7.
- Omori M. Zooplankton fisheries of the world: A review. Marine Biology. 1978;48(3):199-205.
- Planque B, Batten SD. *Calanus finmarchicus* in the North Atlantic: the year of *Calanus* in the context of interdecadal change. ICES Journal of Marine Science. 2000;57(6):1528-35.
- Poulet SA, Marsot P. Chemosensory grazing by marine calanoid copepods (arthropoda: crustacea). Science. 1978;200(4348):1403-5.
- Pörtner HO. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. Marine Ecology Progress Series. 2008;373:203-17.
- Raymont JEG, Krishnaswamy S, Woodhouse MA, Griffin RL. Studies on the Fine Structure of Copepoda Observations on *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences. 1974;185(1081):409-24.
- Reygondeau G, Beaugrand G. Future climate-driven shifts in distribution of *Calanus finmarchicus*. Glob Change Biol. 2011;17(2):756-66.
- Robertson JD. Further Studies on Ionic Regulation in Marine Invertebrates. Journal of Experimental Biology. 1953;30(2):277-96.
- Runge JA. Should we expect a relationship between primary production and fisheries? The role of copepod dynamics as a filter of trophic variability. Hydrobiologia. 1988;167-168(1):61-71.
- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R, Wond CS, Wallace DWR, Tilbrook B, Millero FJ, Peng, T-H, Kozyr A, Ono T, Rios AF. The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂. Science. 2004;305(5682):367-71.
- Sakshaug E, Johnsen GH, Kovacs KM. Ecosystem Barents Sea: Tapir Forlag; 2009. p.209.
- Scott CL, Kwasniewski S, Falk-Petersen S, Sargent JR. Lipids and life strategies of *Calanus finmarchicus*, *Calanus glacialis* and *Calanus hyperboreus* in late autumn, Kongsfjorden, Svalbard. Polar Biology. 2000;23(7):510-6.
- Skjermo J, Salvesen I, Øie G, Olsen Y, Vadstein O. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. Aquaculture International. 1997;5(1):13-28.

- Solgaard G, Standal IB, Draget KI. Proteolytic activity and protease classes in the zooplankton species *Calanus finmarchicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;147(3):475-81.
- Solgaard G, Thorsen KH, Draget KI. Encapsulation of a proteolytically active novel bioproduct; controlling the release of proteinous components. *Food and Bioproducts Processing*. 2008;87(1):40-5.
- Tang KW, Glud RN, Glud A, Rysgaard S, Nielsen TG. Copepod guts as biogeochemical hotspots in the sea: Evidence from microelectrode profiling of *Calanus* spp. *Limnol Oceanogr*. 2011;56(2):666-72.
- Vehmaa A, Brutemark A, Engström-Öst J. Maternal Effects May Act as an Adaptation Mechanism for Copepods Facing pH and Temperature Changes. *PLoS One*. 2012;7(10).
- Verity PG, Smetacek V. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*. 1996;130:277-93.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. *Principles of Ecotoxicology*, Third Edition: Taylor & Francis; 2005;:60, 99-101,144.
- Whittamore JM. Osmoregulation and epithelial water transport: lessons from the intestine of marine teleost fish. *J Comp Physiol B*. 2012;182(1):1-39.
- Widdicombe S, Spicer JJ. Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: What can animal physiology tell us? *J Exp Mar Biol Ecol*. 2008;366(1-2):187-97.
- Willett CS, Burton RS. Proline biosynthesis genes and their regulation under salinity stress in the euryhaline copepod *Tigriopus californicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002;132(4):739-50.
- Zeebe RE, Wolf-Gladrow DA. *CO₂ in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes*; 2001;:34.
- Zetsche E-M, Meysman FJR. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *Journal of Plankton Research*. 2012;34(6):493-509.
- Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, Ando I, et al. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(39):14192-7.
- Zhang D, Li S, Wang G, Guo D. Impacts of CO₂-driven seawater acidification on survival, egg production rate and hatching success of four marine copepods. *Acta Oceanol Sin*. 2011;30(6):86-94.
- Zhang DJ, Li SJ, Wang GZ, Guo DH, Xing KZ, Zhang SL. Biochemical responses of the copepod *Centropages tenuiremis* to CO₂-driven acidified seawater. *Water Science and Technology*. 2012;65(1):30-7.

7.0 - Vedlegg

Vedlegg 1: Pilotundersøkelse av innledende osmolaliteter benyttet i tofaktor-analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus*.

Hyposmotisk sjøvann			Hyperosmotisk sjøvann		
0.5 dl destvann	4.5dl sjøvann	≈900mOsm	1,75g NaCl	5dl sjøvann	≈1120mOsm
Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr	Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr
0	100%	7	0	100%	7
1	100%		1	100%	
6	100%		6	100%	
12	-		12	-	
24	100%		24	100%	
48	100%		48	100%	
72	100%		72	100%	
96	100%		96	100%	

1 dl destvann	4dl sjøvann	≈800mOsm	3.5g NaCl	5dl sjøvann	≈1240mOsm
Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr	Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr
0	100%	7	0	100%	7
1	100%		1	100%	
6	100%		6	100%	
12	-		12	-	
24	100%		24	100%	
48	100%		48	100%	
72	100%		72	100%	
96	100%		96	100%	

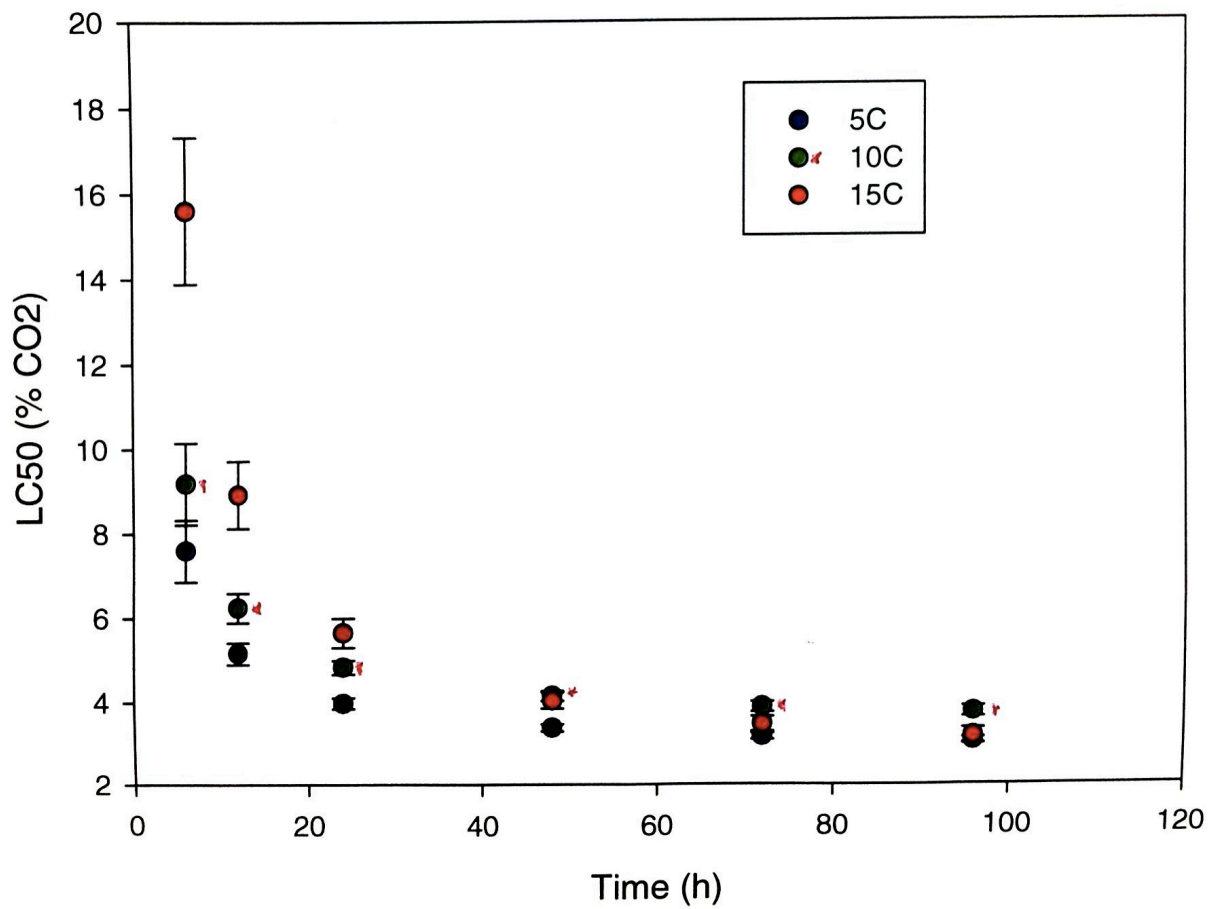
1.25 dl destvann	3,75dl sjøvann	≈750mOsm	7g NaCl	5dl sjøvann	≈1480mOsm
Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr	Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr
0	100%	7	0	100%	7
1	100%		1	100%	
6	100%		6	86%	
12	-		12	-	
24	100%		24	86%	
48	100%		48	71%	
72	100%		72	43%	
96	100%		96	0%	

1.5 dl destvann	3.5dl sjøvann	≈700mOsm	8.75g NaCl	5dl sjøvann	≈1600mOsm
Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr	Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr
0	100%	7	0	100%	7
1	100%		1	86%	
6	100%		6	86%	
12	-		12	-	
24	100%		24	29%	
48	100%		48	14%	
72	100%		72	0%	
96	100%		96	0%	

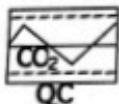
2 dl destvann	3dl sjøvann	≈600mOsm
Timer	Overlevelse	Totalt antall dyr
0	100%	7
1	14%	
6	0	
12	0	
24	0	
48	0	
72	0	
96	0	

Vedlegg 2: Pilotundersøkelse av innledende pCO₂ benyttet i to-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus* (Upub. Personlig meddelelse: Sindre Andre Pedersen, NTNU).

Effekt av CO₂ konsentrasjon og temperatur på overlevelse hos *Calanus finmarchicus* over tid



Vedlegg 3: Detaljert oversikt over standardløsningen benyttet til å kalibrere flere målinger i løpet av dette arbeidet.



<http://andrew.ucsd.edu/co2qc/>

University of California, San Diego
Scripps Institution of Oceanography
Marine Physical Laboratory
9500 Gilman Drive
La Jolla, CA 92093-0244

Certificate of Analysis

Reference material for oceanic CO₂ measurements

Batch 104 (Bottled on June 11, 2010)

This reference material consists of natural sea water sterilized by a combination of filtration, ultra-violet radiation and addition of mercuric chloride.

Analysis Results

The various procedures used for these analyses are detailed overleaf.

Salinity	33.300	
Total dissolved inorganic carbon		2020.10 ± 0.39 μmol·kg ⁻¹ (9; 9)
Total alkalinity		2222.61 ± 1.01 μmol·kg ⁻¹ (31; 14)
Phosphate	0.77 μmol·kg ⁻¹	
Silicate	4.4 μmol·kg ⁻¹	
Nitrite	0.00 μmol·kg ⁻¹	
Nitrate	6.7 μmol·kg ⁻¹	

The cited uncertainties represent the standard deviation. Figures in parentheses are the number of analyses made (total number of analyses; number of separate bottles analysed). The nutrient levels may have changed on storage, their stability has not been examined. CO₂ analyses were performed over a period of time to confirm that the batch is stable.

The 95% confidence limits for the certified analyses are thus:

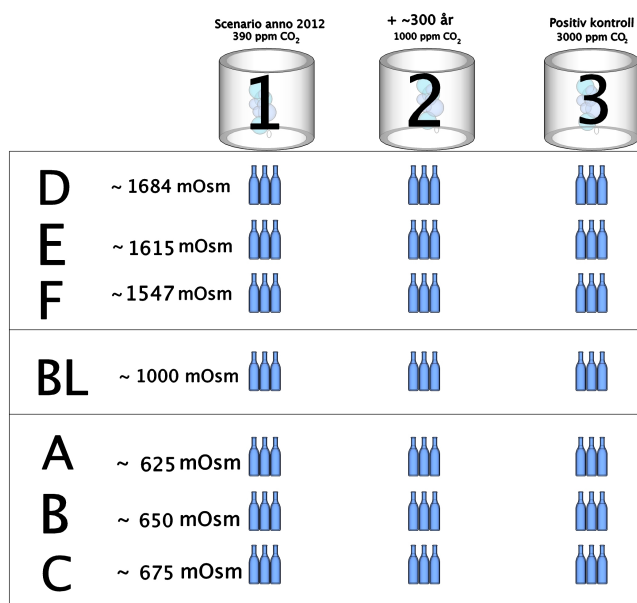
Total dissolved inorganic carbon	2020.10 ± 0.30 μmol·kg ⁻¹
Total alkalinity	2222.61 ± 0.37 μmol·kg ⁻¹

STORAGE: The bottles should be stored out of direct sunlight, and preferably at or below room temperature (25 °C). They should not be allowed to freeze!

Andrew G. Dickson
September 20, 2010

Vedlegg 4: Eksempelberegning av LT_{50} kalkulert ved logistisk regresjon i R.

Eksempel: Prøve 1A1 (Syntaks: ppm type, mOsm type, replikat nummer)



Prøve	Døde	Total antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1A1	1	5	20.00	6
1A1	1		20.00	12
1A1	1		20.00	24
1A1	1		20.00	48
1A1	1		20.00	72
1A1	1		20.00	96
1A1	2		40.00	120
1A1	2		40.00	144
1A1	4		80.00	168
1A1	5		100.00	192

```
data2 = data.frame(tid = c(6,12,24,48,72,96,120,144,168,192),
dead = c(1,1,1,1,1,1,2,2,4,5),
live = c(4,4,4,4,4,4,3,3,1,0)
)
attach(data2)
y<-cbind(live,dead)
linreg<-glm(y~tid,binomial)
summary(linreg)
library(MASS)
dose.p(linreg,p=0.5)
```

Resultat $LT_{50} = 123$, standard error = 19.

Tilpasset fra <http://lukemiller.org/index.php/2010/02/calculating-lt50-median-lethal-temperature-aka-ld50-quickly-in-r/>

Vedlegg 5: Rådata fra karbonatkjemi-målinger på hyperosmotiske kombinasjoner med pCO₂ (Salinitet, total alkalinitet, pH, osmolalitet før forsøk og osmolalitet etter forsøk).

Prøve (Salinitet)	Måling #1 (ppt)	#2 (ppt)	Gj.Snitt	Korrigert	St.Dev	Korrigeringsverdi
Standardløsning (33.3 ppt)	20	20	20	33.3	0.0	13.3
1D1	34.5	35.5	35	48.3	0.7	
1D2	34.5	36	35.3	48.6	1.1	
1D3	35	35.5	35.3	48.6	0.4	
1DSUM				48.5	1.3	
1E1	36	37	36.5	49.8	0.7	
1E2	37	38	37.5	50.8	0.7	
1E3	36.5	37	36.8	50.1	0.4	
1ESUM				50.2	1.1	
1F1	38.5	39.5	39	52.3	0.7	
1F2	38.5	39.5	39.0	52.3	0.7	
1F3	39	39	39.0	52.3	0.0	
1FSUM				52.3	1.0	
1BL1	21.5	21.5	21.5	34.8	0.0	
1BL2	21	21.5	21.3	34.6	0.4	
1BL3	21.5	21	21.3	34.6	0.4	
1BLSUM				34.6	0.5	
2D1	36	36	36	49.3	0.0	
2D2	35.5	36	35.8	49.1	0.4	
2D3	35.5	35.5	35.5	48.8	0.0	
2DSUM				49.1	0.4	
2E1	37.5	37	37.25	50.6	0.4	
2E2	37	37	37.0	50.3	0.0	
2E3	37.5	37	37.3	50.6	0.4	
2ESUM				50.5	0.5	
2F1	39.5	40	39.75	53.1	0.4	
2F2	39	39.5	39.3	52.6	0.4	
2F3	39.5	39	39.3	52.6	0.4	
2FSUM				52.7	0.6	
2BL1	22.5	21.5	22	35.3	0.7	
2BL2	22	22	22.0	35.3	0.0	
2BL3	22	22	22.0	35.3	0.0	
2BLSUM				35.3	0.7	
3D1	37	36.5	36.75	50.1	0.4	
3D2	36.5	36	36.3	49.6	0.4	
3D3	36	36	36.0	49.3	0.0	
3DSUM				49.6	0.5	
3E1	38	38	38	51.3	0.0	
3E2	38	38	38.0	51.3	0.0	
3E3	38	38	38.0	51.3	0.0	
3ESUM				51.3	0.0	
3F1	39.5	40	39.75	53.1	0.4	
3F2	40	40	40.0	53.3	0.0	
3F3	39.5	40	39.8	53.1	0.4	
3FSUM				53.1	0.5	
3BL1	22	22.5	22.25	35.6	0.4	
3BL2	22	22	22.0	35.3	0.0	
3BL3	22	22	22.0	35.3	0.0	
3BLSUM				35.4	0.4	
Standardløsning (33.3 ppt)	20	20	20	33.3	0.0	13.3

Prøve (Alkalinitet)	Måling#1 (µmol/kg)	#2	Gj.Snitt	Korrigert	Korrigeringsverdi
Standardløsning (2222.6)	2260	2276	2268	2223	-45.4
1D1	2219			2174	
1D2	2252			2207	
1D3	2259			2214	
1DSUM			2243	2198	
1E1	2240			2195	
1E2	2240			2195	
1E3	2243			2198	
1ESUM			2241	2196	
1F1	2247			2202	
1F2	2248			2203	
1F3	2249			2204	
1FSUM			2248	2203	
1BL1	2289			2244	
1BL2	2275			2230	
1BL3	2278			2233	
1BLSUM			2281	2235	
2D1	2244			2199	
2D2	2249			2204	
2D3	2247			2202	
2DSUM			2247	2201	
2E1	2238			2193	
2E2	2244			2199	
2E3	2243			2198	
2ESUM			2242	2196	
2F1	2245			2200	
2F2	2245			2200	
2F3	2240			2195	
2FSUM			2243	2198	
2BL1	2283			2238	
2BL2	2281			2236	
2BL3	2284			2239	
2BLSUM			2283	2237	
3D1	2257			2212	
3D2	2242			2197	
3D3	2260			2215	
3DSUM			2253	2208	
3E1	2247			2202	
3E2	2244			2199	
3E3	2241			2196	
3ESUM			2244	2199	
3F1	2248			2203	
3F2	2253			2208	
3F3	2237			2192	
3FSUM			2246	2201	
3BL1	2229			2184	
3BL2	2291			2246	
3BL3	2278			2233	
3BLSUM			2266	2221	

Prøve (NBS pH)	pH-5min	pH-10min	pH-15min	pH-20min	pH-25min	pH-30min	Reg.pH	Korrigert	Korrigeringsverdi	Gj.Snitt korrigeringsverdi
Standardløsning (pH7)	7.049	7.054	7.056	7.057	7.061	7.061	7.061	7.003	-0.061	-0.059
1D1	7.886	7.914	7.925	7.925			7.925	7.867		
1D2	7.923	7.926	7.926				7.926	7.868		
1D3	7.925	7.920	7.931	7.931			7.931	7.873		
1DSUM							7.927	7.869		
1E1	7.929	7.929					7.929	7.871		
1E2	7.910	7.912					7.912	7.854		
1E3	7.910	7.924	7.924				7.924	7.866		
1ESUM							7.922	7.863		
1F1	7.929	7.929					7.929	7.871		
1F2	7.920	7.922	7.922				7.922	7.864		
1F3	7.921	7.921					7.921	7.863		
1FSUM							7.924	7.866		
1BL1	8.024	8.024					8.024	7.966		
1BL2	8.019	8.019					8.019	7.961		
1BL3	8.005	8.005					8.005	7.947		
1BLSUM							8.016	7.958		
2D1	7.620	7.620					7.620	7.562		
2D2	7.654	7.650	7.650				7.650	7.592		
2D3							TAPT			
2DSUM							7.635	7.577		
2E1	7.638	7.638					7.638	7.580		
2E2	7.613	7.613	7.629	7.629			7.629	7.571		
2E3	7.660	7.660					7.660	7.602		
2ESUM							7.642	7.584		
2F1	7.639	7.632	7.632				7.632	7.574		
2F2	7.606	7.607	7.607				7.607	7.549		
2F3	7.623	7.623					7.623	7.565		
2FSUM							7.621	7.562		
2BL1	7.707	7.697	7.697				7.697	7.639		
2BL2	7.685	7.680	7.680				7.680	7.622		
2BL3	7.686	7.686					7.686	7.628		
2BLSUM							7.688	7.629		
3D1	7.177	7.177					7.177	7.119		
3D2	7.163	7.157	7.157				7.157	7.099		
3D3	7.154	9.700	9.700				7.151	7.093		
3DSUM							7.162	7.103		
3E1	7.131	7.131					7.131	7.073		
3E2	7.152	7.152					7.152	7.094		
3E3	7.143	7.143					7.143	7.085		
3ESUM							7.142	7.084		
3F1	7.156	7.156					7.156	7.098		
3F2	7.132	7.132					7.132	7.074		
3F3	7.125	7.125					7.125	7.067		
3FSUM							7.138	7.079		
3BL1	7.249	7.249					7.249	7.191		
3BL2	7.258	7.258					7.258	7.200		
3BL3	7.247	7.247					7.247	7.189		
3BLSUM							7.251	7.193		
Standardløsning (pH7)	7.130	7.093	7.071	7.056	7.056		7.056	6.998	-0.056	-0.056

Prøve (Osmolalitet)	PreOsmol #1 (mOsm)	#2	#3	#4	#5	#6	#7	Gj.snitt	Korrigeret	St.Dev	Korrigeringsverdi	Gj.Snitt korrigeringsverdi
Standardløsning (1028mOsm)	1026	1022	1024	1032	1024	1030	1041	1028		7	0	21
1D	1205	1205						1205		0		
1E	1218	1221	1217	1220				1219		2		
1F	1252	1244	1243	1242				1245		5		
1BL	1002	996	993	993	994			996		4		
Standardløsning (1028mOsm)	1002	992	1002	995				998		5	30	
2D	1197	1193	1201					1197		4		
2E	1243	1229	1233	1224				1232		8		
2F	1252	1253						1253		1		
2BL	985	975	978	973				978		5		
3D	1215	1208	1210	1213				1212		3		
3E	1232	1234	1234					1233		1		
3F	1254	1256						1255		1		
3BL	1005	988	994	1000				997		7		
Standardløsning (1028mOsm)	989	982	985	986	988	988	988	987		2	41	21

Prøve (Osmolalitet)	PostOsmol #1 (mOsm)	#2	#3	#4	#5	Gj.snitt	Korrigeret	St.Dev	Korrigeringsverdi	Gj.Snitt korrigeringsverdi
Standardløsning (1028mOsm)	987	984	981	983		984	979	3	44	-4
1D1	1207	1204	1197			1203	1198	5		
1D2	1198	1202	1198			1199	1195	2		
1D3	1205	1203				1204	1200	1		
1DSUM						1202	1198	4		
#1E1	1188	1184	1185			1186	1181	2		
#1E2	1185	1185	1179			1183	1179	3		
#1E3	1192	1188	1184			1188	1184	4		
1ESUM						1186	1181	4		
1F1	1214	1207	1212			1211	1207	4		
1F2	1252	1240	1243			1245	1241	6		
1F3	1205	1212	1211	1209		1209	1205	3		
1FSUM						1222	1217	17		
Standardløsning (1028mOsm)	977	982	996	964	957	975	971	15	53	-4
1BL1	946	981	963	982	957	966	961	16		
1BL2	954	977	982	958		968	963	14		
1BL3	957	951	953			954	949	3		
1BLSUM						962	958	13		
2D1	1185	1170	1164	1178		1174	1170	9		
2D2	1169	1170				1170	1165	1		
2D3	1169	1169				1169	1165	0		
2DSUM						1171	1167	7		
#2E1	1191	1195				1193	1189	3		
#2E2	1197	1197				1197	1193	0		
#2E3	1200	1192				1196	1192	6		
2ESUM						1195	1191	3		
2F1	1249	1235	1246			1243	1239	7		
2F2	1272	1261				1267	1262	8		
2F3	1283	1291				1287	1283	6		
2FSUM						1266	1261	21		
2BL1	1119	1117				1118	1114	1		
2BL2	1129	1124				1127	1122	4		
2BL3	1125	1117				1121	1117	6		
2BLSUM						1122	1118	5		
Standardløsning (1028mOsm)	1051	1043	1069	1059	1051	1055	1050	10	-27	-4
3D1	1243	1227	1247	1227		1236	1232	11		
3D2	1241	1237				1239	1235	3		
3D3	1249	1249				1249	1245	0		
3DSUM						1241	1237	9		
#3E1	1279	1280				1280	1275	1		
#3E2	1286	1276	1275			1279	1275	6		
#3E3	1281	1273	1273			1276	1271	5		
3ESUM						1278	1274	4		
3F1	1300	1295	1289			1295	1290	6		
3F2	1298	1288	1293			1293	1289	5		
3F3	1297	1202				1250	1245	67		
3FSUM						1279	1275	33		
3BL1	1089	1090				1090	1085	1		
3BL2	1102	1106				1104	1100	3		
3BL3	1106	1106				1106	1102	0		
3BLSUM						1100	1096	8		
Standardløsning (1028mOsm)	1117	1114	1116			1116	1111	2	-88	-4

Vedlegg 6: Rådata fra karbonatkjemi-målinger på hyposmotiske kombinasjoner med pCO₂ (Salinitet, total alkalinitet, pH, osmolalitet før forsøk og osmolalitet etter forsøk).

Prøve (Salinitet)	Måling #1 (ppt)	#2 (ppt)	Gj.Snitt	Korrigert	St.Dev	Korrigeringsverdi
Standardløsning (33.3 ppt)	40	40	40		0.0	-6.7
1A1	31	31.5	31.3	24.6	0.4	
1A2	30.5	31	30.8	24.1	0.4	
1A3	30	30	30	23.3	0.0	
1ASUM			30.7	24.0	0.5	
1B1	28.5	28.5	28.5	21.8	0.0	
1B2	29	28	28.5	21.8	0.7	
1B3	29	28.5	28.8	22.1	0.4	
1BSUM			28.6	21.9	0.8	
Standardløsning (33.3 ppt)	40	40	40	33.3	0.0	
1C1	28	28	28	21.3	0.0	
1C2	29.5	29.5	29.5	22.8	0.0	
1C3	28.5	29.5	29	22.3	0.7	
1CSUM			28.8	22.1	0.7	
1BL1	42	42	42	35.3	0.0	
1BL2	42	42	42	35.3	0.0	
1BL3	42	42	42	35.3	0.0	
1BLSUM			42.0	35.3	0.0	
2A1	30	31	30.5	23.8	0.7	
2A2	30	30	30	23.3	0.0	
2A3	30.5	31	30.8	24.1	0.4	
2ASUM			30.4	23.7	0.8	
2B1	29	29	29	22.3	0.0	
2B2	29.5	29	29.3	22.6	0.4	
2B3	29.5	29	29.3	22.6	0.4	
2BSUM			29.2	22.5	0.5	
2C1	28	28	28	21.3	0.0	
2C2	29	29.5	29.3	22.6	0.4	
2C3	28	28	28	21.3	0.0	
2CSUM			28.4	21.7	0.4	
2BL1	41.5	42	41.8	35.1	0.4	
2BL2	42	42.5	42.3	35.6	0.4	
2BL3	41.5	42	41.8	35.1	0.4	
2BLSUM			41.9	35.2	0.5	
3A1	31.5	31.5	31.5	24.8	0.0	
3A2	31	31	31	24.3	0.0	
3A3	31	31	31	24.3	0.0	
3ASUM			31.2	24.5	0.5	
3B1	30.5	31	30.8	24.1	0.4	
3B2	30.5	30.5	30.5	23.8	0.0	
3B3	30	31	30.5	23.8	0.7	
3BSUM			30.6	23.9	0.5	
3C1	29.5	29	29.3	22.6	0.4	
3C2	29	29.5	29.3	22.6	0.4	
3C3	29	29.5	29.3	22.6	0.4	
3CSUM			29.3	22.6	0.5	
3BL1	42.5	42.5	42.5	35.8	0.0	
3BL2	42	42	42.0	35.3	0.0	
3BL3	42	42.5	42.3	35.6	0.4	
3BLSUM			42.3	35.6	0.5	
Standardløsning (33.3 ppt)	40	40	40	33.3	0.0	-6.7

Prøve (Alkalinitet)	Måling#1 (µmol/kg)	#2	Gj.Snitt	Korrigert	Korrigeringsverdi
Standardløsning (2222.6)	2250	2255	2253		-30
1A1	1568			1538	
1A2	1556			1526	
1A3	1547			1517	
1ASUM	1557			1527	
1B1	1496			1466	
1B2	1492			1462	
1B3	1495			1465	
1BSUM	1494			1464	
1C1	1455			1425	
1C2	1464			1434	
1C3	1452			1422	
1CSUM	1457			1427	
1BL1	2273			2243	
1BL2	2272			2242	
1BL3	2275			2245	
1BLSUM	2273			2243	
2A1	1557			1527	
2A2	1559			1529	
2A3	1553			1523	
2ASUM	1556			1526	
2B1	1508			1478	
2B2	1505			1475	
2B3	1518			1488	
2BSUM	1510			1480	
2C1	1451			1421	
2C2	1454			1424	
2C3	1445			1415	
2CSUM	1450			1420	
2BL1	2270			2240	
2BL2	2276			2246	
2BL3	2269			2239	
2BLSUM	2272			2242	
3A1	1552			1522	
3A2	1542			1512	
3A3	1552			1522	
3ASUM	1549			1519	
3B1	1492			1462	
3B2	1499			1469	
3B3	1456			1426	
3BSUM	1482			1452	
3C1	1443			1413	
3C2	1452			1422	
3C3	1449			1419	
3CSUM	1448			1418	
3BL1	2263			2233	
3BL2	2266			2236	
3BL3	2262			2232	
3BLSUM	2264			2234	

Prøve (NBS pH)	pH-5min	pH-10min	pH-15min	pH-20min	pH-25min	pH-30min	Reg.pH	Korrigeret	Korrigeringsverdi	Gj.Snitt korrigeringsverdi
Standardløsning (pH7)	7.164	7.121	7.095	7.058	7.059		7.059	7.000	-0.059	-0.059
1A1	7.870	7.893	7.903	7.910	7.915		7.915	7.856		
1A2	7.876	7.890	7.897	7.904	7.908		7.908	7.849		
1A3	7.941	7.945	7.946	7.948	7.950		7.950	7.891		
1ASUM							7.924	7.866		
1B1	7.827	7.855	7.864	7.867	7.874		7.874	7.815		
1B2	7.917	7.928	7.934	7.937	7.938		7.938	7.879		
1B3	7.927	7.927	7.927	7.929	7.929		7.929	7.870		
1BSUM							7.914	7.855		
1C1	7.759	7.757	7.759	7.759			7.759	7.700		
1C2	7.760	7.758					7.758	7.699		
1C3	7.716	7.718	7.718				7.718	7.659		
1CSUM							7.745	7.686		
1BL1	7.927	7.934	7.940	7.940			7.940	7.881		
1BL2	7.975	7.978	7.978				7.978	7.919		
1BL3	7.997	7.995	8.000	7.998			7.998	7.939		
1BLSUM							7.972	7.913		
2A1	7.485	7.475	7.475				7.475	7.416		
2A2	7.415	7.411	7.411				7.411	7.352		
2A3	7.436	7.435					7.435	7.376		
2ASUM							7.440	7.382		
2B1	7.862	7.856	7.856				7.856	7.797		
2B2	7.836	7.836					7.836	7.777		
2B3	7.868	7.868					7.868	7.809		
2BSUM							7.853	7.795		
2C1	7.511	7.510					7.510	7.451		
2C2	7.449	7.449					7.449	7.390		
2C3	7.587	7.585	7.585				7.585	7.526		
2CSUM							7.515	7.456		
2BL1	7.661	7.661					7.661	7.602		
2BL2	7.680	7.683					7.683	7.624		
2BL3	7.658	7.658					7.658	7.599		
2BLSUM							7.667	7.609		
Standardløsning (pH7)	7.138	7.106	7.085	7.064			7.064	7.005	-0.064	-0.059
3A1	7.082	7.092	7.095	7.095			7.095	7.036		
3A2	7.119	7.119					7.119	7.060		
3A3	7.096	7.094	7.094				7.094	7.035		
3ASUM							7.103	7.044		
3B1	6.955	6.951	6.951				6.951	6.892		
3B2	7.036	7.036					7.036	6.977		
3B3	7.016	7.015					7.015	6.956		
3BSUM							7.001	6.942		
3C1	7.029	7.026	7.026				7.026	6.967		
3C2	7.050	7.046	7.046				7.046	6.987		
3C3	7.023	7.025	7.025				7.025	6.966		
3CSUM							7.032	6.974		
3BL1	7.027	7.025	7.025				7.025	6.966		
3BL2	7.158	7.158					7.158	7.099		
3BL3	7.185	7.188	7.188				7.188	7.129		
3BLSUM							7.124	7.065		
Standardløsning (pH7)	7.156	7.124	7.090	7.068	7.053	7.053	7.053	6.994	-0.053	-0.059

Prøve (Osmolalitet)	PreOsmol #1 (mOsm)	#2	#3	#4	#5	#6	#7	Gj.snitt	Korrigert	St.Dev	Korrigeringsverdi	Gj.Snitt korrigeringsverdi
Standardløsning (1028mOsm)	1030	1031	1025	1031	1027	1023	1025	1027	1029	3.3	1	1.5
1A	669	669	665	668	669	666	665	667	669	1.9		
1B	658	659	647	646	644	654	642	650	652	6.9		
1C	625	619	620	614	619	616	614	618	620	3.9		
1BL	1009	1017	1025	1024	1027	1024	1034	1023	1024	7.9		
2A	666	662	662	670	665	663	658	664	665	3.8		
2B	645	644	639	645	641	646	654	645	646	4.7		
2C	617	617	618	622	617	621	614	618	620	2.7		
2BL	995	998	991	995	993	995	996	995	996	2.2		
3A	665	668	668	669	667	672	665	668	669	2.4		
3B	639	646	649	646	646	647	647	646	647	3.1		
3C	621	619	618	615	622	621	618	619	621	2.4		
3BL	996	993	997	996	998	1011	1000	999	1000	5.8		
Standardløsning (1028mOsm)	1028	1024	1028	1024	1033	1025	1023	1026	1028	3.5	2	1.5

Prøve (Osmolalitet)	PostOsmol #1 (mOsm)	#2	#3	#4	#5	Gj.snitt	Korrigert	St.Dev	Korrigeringsverdi
Standardløsning (1028mOsm)	1031	1028	1028	1024	1023	1027	1028	3	1
1A1	667	669	665	664	665	666	667	2	
1A2	658	656	657	661	658	658	659	2	
1A3	654	655	656	656	657	656	657	1	
1ASUM						660	661	3	
1B1	641	639	636	638	644	640	641	3	
1B2	646	637	640	639	638	640	641	4	
1B3	647	646	642	639	640	643	644	4	
1BSUM						641	642	6	
1C1	618	621	615	621	619	619	620	2	
1C2	621	620	617	621	622	620	621	2	
1C3	621	614	620	616	616	617	619	3	
1CSUM						619	620	4	
1BL1	972	969	969	969	979	972	973	4	
1BL2	970	975	968	972	971	971	972	3	
1BL3	971	980	972	967	969	972	973	5	
1BLSUM						972	973	7	
2A1	666	661	662	661	663	663	664	2	
2A2	662	660	664	663	661	662	663	2	
2A3	664	658	661	661	658	660	662	3	
2ASUM						662	663	4	
2B1	643	643	640	639	642	641	643	2	
2B2	645	638	635	641	636	639	640	4	
2B3	638	639	636	637	636	637	638	1	
2BSUM						639	640	5	
2C1	622	617	613	616	616	617	618	3	
2C2	624	617	618	618	620	619	621	3	
2C3	618	622	618	621	624	621	622	3	
2CSUM						619	620	5	
2BL1	975	977	975	978	975	976	977	1	
2BL2	957	959	943	947	943	950	951	8	
2BL3	1015	1021	1025	1021	1024	1021	1022	4	
2BLSUM						982	984	9	
3A1	721	724	719	726	725	723	724	3	
3A2	720	718	718	717		718	719	1	
3A3	748	746	745	745		746	747	1	
3ASUM						729	730	3	
3B1	657	654	657	654		656	657	2	
3B2	654	654	654			654	655	0	
3B3	652	651	652			652	653	1	
3BSUM						654	655	2	
3C1	626	622	625	630	627	626	627	3	
3C2	711	707	701	709		707	708	4	
3C3	714	713	710	711		712	713	2	
3CSUM						682	683	6	
3BL1	1024	1024	1026	1031		1026	1027	3	
3BL2	994	991	992	990		992	993	2	
3BL3	1012	1009	1013	1011		1011	1012	19	
3BLSUM						1010	1011	19	

Vedlegg 7: Beregninger av pCO₂ i samtlige prøver ved hjelp av programmet "CO2calc".

Eksempeldata 1A1:

Prøve	Salinitet (ppt)	Temp. (°C)	Lufttrykk (decibar)	Alkalinitet (µmol/kg)	Målt pH (NBS)
1A1	24.6	10.4	10.1	1568	7.86

CO2calc

Single-Point Mode Batch Processing

Sample Information

Name: optional Date: 1/ 1/1900 Latitude in decimal degrees: optional New File...
 Comment: optional Time: 9:00:00 AM Longitude in decimal degrees: optional Open File...
 Record calculation

Input Results

Results at input conditions Results at adjusted conditions

Physical Data (adjusted):
 Salinity: 24.600
 temperature (°C): 10.400
 Pressure (dbars): 10.100

Carbonate Results (adj.):
 TA (µmol/kgSW): 1568.000
 TCO₂ (µmol/kgSW): 1534.168
 pH (chosen scale): 7.860
 fCO₂ water (µatm): 634.418
 pCO₂ water (µatm): 636.857

Auxiliary Results (adjusted):
 HCO₃ (µmol/kgSW): 1464.161 Si Alk (µmol/kgSW): 0.000
 CO₃ (µmol/kgSW): 40.842 Revelle: 18.196
 CO₂ (µmol/kgSW): 29.164 Ω Ca: 1.028
 B Alk (µmol/kgSW): 21.484 Ω Ar: 0.633
 OH (µmol/kgSW): 0.684 xCO₂ (dry at 1 atm) (ppm): 644.768
 P Alk (µmol/kgSW): 0.000

Nutrient Data:
 Total P (µmol/kgSW): 0.000
 Total Si (µmol/kgSW): 0.000

Air-sea CO₂ Flux (adj.):
 Air-Sea Flux (mmol/m²/day): 0.000

CO₂ Constants: Millero, 2010
 KHSO₄: Dickson (1990b)
 pH Scale: NBS scale (mol/kgSW) Air-Sea Flux: Ho et al., 2006

Select Constants, Units, and Scales... Process

Prøve	pCO ₂	Prøve	pCO ₂	Prøve	pCO ₂
1D1	679	2D1	1488	3D1	4292
1D2	687	2D2	1388	3D2	4488
1D3	689	2D3	1426	3D3	4645
1E1	673	2E1	1394	3E1	4761
1E2	700	2E2	1437	3E2	4535
1E3	671	2E3	1329	3E3	4637
1F1	653	2F1	1395	3F1	4367
1F2	670	2F2	1299	3F2	4692
1F3	671	2F3	1435	3F3	4666
1BL1	628	2BL1	1414	3BL1	4018
1BL2	642	2BL2	1483	3BL2	4046
1BL3	659	2BL3	1449	3BL3	4118

Prøve	pCO ₂	Prøve	pCO ₂	Prøve	pCO ₂
1A1	637	2A1	1832	3A1	4405
1A2	651	2A2	2173	3A2	4196
1A3	592	2A3	2002	3A3	4424
1B1	690	2B1	727	3B1	6037
1B2	595	2B2	759	3B2	4935
1B3	609	2B3	712	3B3	5021
1C1	902	2C1	1630	3C1	4915
1C2	893	2C2	1857	3C2	4721
1C3	980	2C3	1344	3C3	4936
1BL1	795	2BL1	1583	3BL1	6956
1BL2	719	2BL2	1506	3BL2	5160
1BL3	684	2BL3	1582	3BL3	4791

Vedlegg 8: Beskrivende statistikk, Levenes test og ANOVA test for hyperosmotiske behandlinger.

Descriptive Statistics

Dependent Variable: LT50_R_Log

Osmolalitet	CO2	Mean	Std. Deviation	N
1547.00	390.00	38.33	10.599	3
	1000.00	51.67	7.572	3
	3000.00	79.00	.	1
	Total	49.86	16.314	7
1615.00	390.00	34.50	3.536	2
	1000.00	33.33	3.512	3
	3000.00	22.67	17.039	3
	Total	29.62	11.032	8
1684.00	390.00	21.00	.	1
	1000.00	15.00	10.000	3
	3000.00	21.00	4.243	2
	Total	18.00	7.376	6
Total	390.00	34.17	9.621	6
	1000.00	33.33	17.161	9
	3000.00	31.50	25.727	6
	Total	33.05	17.537	21

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LT50_R_Log

F	df1	df2	Sig.
1.246	8	12	.353

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Osmolalitet + CO2 + Osmolalitet * CO2

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LT50_R_Log

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4975.786 ^a	8	621.973	6.351	.002
Intercept	21465.482	1	21465.482	219.191	.000
Osmolalitet	3894.519	2	1947.260	19.884	.000
CO2	262.246	2	131.123	1.339	.299
Osmolalitet * CO2	1417.234	4	354.309	3.618	.037
Error	1175.167	12	97.931		
Total	29086.000	21			
Corrected Total	6150.952	20			

a. R Squared = .809 (Adjusted R Squared = .682)

Beskrivende statistikk, Levenes test og ANOVA test for hyposmotiske behandlinger.

Descriptive Statistics

Dependent Variable: LT50_R_Log

Osmolalitet	CO2	Mean	Std. Deviation	N
625.00	390.00	130.00	18.385	2
	1000.00	139.67	23.861	3
	3000.00	124.00	28.618	3
	Total	131.38	22.322	8
650.00	390.00	129.00	6.557	3
	1000.00	145.00	1.414	2
	3000.00	123.00	7.000	3
	Total	130.75	10.566	8
675.00	390.00	154.67	31.021	3
	1000.00	125.50	.707	2
	3000.00	121.00	13.856	3
	Total	134.75	24.604	8
Total	390.00	138.87	22.510	8
	1000.00	137.14	16.098	7
	3000.00	122.67	16.332	9
	Total	132.29	19.315	24

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LT50_R_Log

F	df1	df2	Sig.
2.040	8	15	.111

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LT50_R_Log

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2971.125 ^a	8	371.391	.993	.479
Intercept	405847.627	1	405847.627	1085.186	.000
Osmolalitet	24.206	2	12.103	.032	.968
CO2	1200.134	2	600.067	1.605	.234
Osmolalitet * CO2	1554.578	4	388.644	1.039	.420
Error	5609.833	15	373.989		
Total	428607.000	24			
Corrected Total	8580.958	23			

a. R Squared = .346 (Adjusted R Squared = -.002)

Vedlegg 9: Rådata fra to-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus* (hyperosmotiske behandlinger).

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1D1	1	5	20	6
1D1	1		20	12
1D1	1		20	24
1D1	2		40	48
1D1	5		100	72
1D1	5		100	96
1D2	2	5	40	6
1D2	2		40	12
1D2	2		40	24
1D2	3		60	48
1D2	4		80	72
1D2	5		100	96
1D3	1	6	17	6
1D3	1		17	12
1D3	1		17	24
1D3	3		50	48
1D3	4		67	72
1D3	6		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2D1	0	5	0	6
2D1	0		0	12
2D1	1		20	24
2D1	3		60	48
2D1	5		100	72
2D1	5		100	96
2D2	0	5	0	6
2D2	0		0	12
2D2	1		20	24
2D2	2		40	48
2D2	3		60	72
2D2	5		100	96
2D3	0	7	0	6
2D3	1		14	12
2D3	1		14	24
2D3	2		29	48
2D3	5		71	72
2D3	7		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3D1	0	8	0	6
3D1	0		0	12
3D1	0		0	24
3D1	2		25	48
3D1	4		50	72
3D1	5		63	96
3D2	0	6	0	6
3D2	0		0	12
3D2	0		0	24
3D2	2		33	48
3D2	6		100	72
3D2	6		100	96
3D3	0	5	0	6
3D3	0		0	12
3D3	0		0	24
3D3	3		60	48
3D3	5		100	72
3D3	5		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1E1	2	4	50	6
1E1	3		75	12
1E1	3		75	24
1E1	3		75	48
1E1	4		100	72
1E1	4		100	96
1E2	1	6	17	6
1E2	1		17	12
1E2	2		33	24
1E2	4		67	48
1E2	5		83	72
1E2	6		100	96
1E3	1	5	20	6
1E3	2		40	12
1E3	3		60	24
1E3	2		40	48
1E3	4		80	72
1E3	5		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2E1	2	6	33	6
2E1	2		33	12
2E1	2		33	24
2E1	4		67	48
2E1	5		83	72
2E1	6		100	96
2E2	2	7	29	6
2E2	2		29	12
2E2	3		43	24
2E2	4		57	48
2E2	6		86	72
2E2	7		100	96
2E3	1	6	17	6
2E3	1		17	12
2E3	2		33	24
2E3	4		67	48
2E3	5		83	72
2E3	6		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3E1	1	6	17	6
3E1	1		17	12
3E1	1		17	24
3E1	3		50	48
3E1	6		100	72
3E1	6		100	96
3E2	2	5	40	6
3E2	2		40	12
3E2	2		40	24
3E2	3		60	48
3E2	5		100	72
3E2	5		100	96
3E3	3	6	50	6
3E3	4		67	12
3E3	4		67	24
3E3	4		67	48
3E3	6		100	72
3E3	6		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1F1	3	4	75	6
1F1	3		75	12
1F1	3		75	24
1F1	3		75	48
1F1	4		100	72
1F1	4		100	96
1F2	2	5	40	6
1F2	2		40	12
1F2	2		40	24
1F2	4		80	48
1F2	5		100	72
1F2	5		100	96
1F3	3	5	60	6
1F3	3		60	12
1F3	3		60	24
1F3	4		80	48
1F3	5		100	72
1F3	5		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2F1	3	6	50	6
2F1	4		67	12
2F1	4		67	24
2F1	5		83	48
2F1	6		100	72
2F1	6		100	96
2F2	3	6	50	6
2F2	3		50	12
2F2	3		50	24
2F2	4		67	48
2F2	6		100	72
2F2	6		100	96
2F3	2	6	33	6
2F3	3		50	12
2F3	3		50	24
2F3	3		50	48
2F3	5		83	72
2F3	6		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3F1	1	4	25	6
3F1	1		25	12
3F1	2		50	24
3F1	4		100	48
3F1	4		100	72
3F1	4		100	96
3F2	4	6	67	6
3F2	4		67	12
3F2	4		67	24
3F2	5		83	48
3F2	6		100	72
3F2	6		100	96
3F3	2	6	33	6
3F3	2		33	12
3F3	3		50	24
3F3	4		67	48
3F3	6		100	72
3F3	6		100	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1B1	0	6	0	6
1B1	0		0	12
1B1	0		0	24
1B1	0		0	48
1B1	0		0	72
1B1	0		0	96
1B2	0	6	0	6
1B2	0		0	12
1B2	0		0	24
1B2	0		0	48
1B2	0		0	72
1B2	0		0	96
1B3	0	5	0	6
1B3	0		0	12
1B3	0		0	24
1B3	0		0	48
1B3	0		0	72
1B3	0		0	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2B1	0	7	0	6
2B1	0		0	12
2B1	0		0	24
2B1	0		0	48
2B1	0		0	72
2B1	0		0	96
2B2	0	7	0	6
2B2	0		0	12
2B2	0		0	24
2B2	0		0	48
2B2	0		0	72
2B2	0		0	96
2B3	0	8	0	6
2B3	0		0	12
2B3	0		0	24
2B3	0		0	48
2B3	0		0	72
2B3	0		0	96

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3B1	0	6	0	6
3B1	0		0	12
3B1	0		0	24
3B1	0		0	48
3B1	0		0	72
3B1	0		0	96
3B2	0	7	0	6
3B2	0		0	12
3B2	0		0	24
3B2	0		0	48
3B2	0		0	72
3B2	0		0	96
3B3	0	8	0	6
3B3	0		0	12
3B3	0		0	24
3B3	0		0	48
3B3	0		0	72
3B3	0		0	96

Vedlegg 10: Rådata fra to-faktor analyse av interaksjoner mellom osmolalitet og pCO₂ på overlevelse hos *C. finmarchicus* (hyposmotiske behandlinger).

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1A1	1	5	20.00	6
1A1	1		20.00	12
1A1	1		20.00	24
1A1	1		20.00	48
1A1	1		20.00	72
1A1	1		20.00	96
1A1	2		40.00	120
1A1	2		40.00	144
1A1	4		80.00	168
1A1	5		100.00	192
1A2	0	7	0.00	6
1A2	0		0.00	12
1A2	0		0.00	24
1A2	0		0.00	48
1A2	0		0.00	72
1A2	0		0.00	96
1A2	0		0.00	120
1A2	1		14.29	144
1A2	2		28.57	168
1A2	4		57.14	192
1A3	0	6	0.00	6
1A3	0		0.00	12
1A3	0		0.00	24
1A3	0		0.00	48
1A3	0		0.00	72
1A3	0		0.00	96
1A3	0		0.00	120
1A3	1		16.67	144
1A3	5		83.33	168
1A3	6		100.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2A1	0	4	0.00	6
2A1	0		0.00	12
2A1	0		0.00	24
2A1	0		0.00	48
2A1	0		0.00	72
2A1	1		25.00	96
2A1	2		50.00	120
2A1	3		75.00	144
2A1	3		75.00	168
2A1	4		100.00	192
2A2	0	4	0.00	6
2A2	0		0.00	12
2A2	0		0.00	24
2A2	1		25.00	48
2A2	1		25.00	72
2A2	2		50.00	96
2A2	2		50.00	120
2A2	2		50.00	144
2A2	2		50.00	168
2A2	4		100.00	192
2A3	2	6	33.33	6
2A3	2		33.33	12
2A3	2		33.33	24
2A3	2		33.33	48
2A3	2		33.33	72
2A3	2		33.33	96
2A3	2		33.33	120
2A3	3		50.00	144
2A3	4		66.67	168
2A3	4		66.67	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3A1	0	6	0.00	6
3A1	0		0.00	12
3A1	0		0.00	24
3A1	0		0.00	48
3A1	1		16.67	72
3A1	3		50.00	96
3A1	4		66.67	120
3A1	4		66.67	144
3A1	5		83.33	168
3A1	6		100.00	192
3A2	0	5	0.00	6
3A2	0		0.00	12
3A2	0		0.00	24
3A2	0		0.00	48
3A2	1		20.00	72
3A2	2		40.00	96
3A2	3		60.00	120
3A2	4		80.00	144
3A2	4		80.00	168
3A2	5		100.00	192
3A3	0	5	0.00	6
3A3	0		0.00	12
3A3	0		0.00	24
3A3	0		0.00	48
3A3	0		0.00	72
3A3	1		20.00	96
3A3	1		20.00	120
3A3	3		60.00	144
3A3	4		80.00	168
3A3	5		100.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1B1	0	7	0.00	6
1B1	0		0.00	12
1B1	0		0.00	24
1B1	0		0.00	48
1B1	1		14.29	72
1B1	2		28.57	96
1B1	4		57.14	120
1B1	5		71.43	144
1B1	6		85.71	168
1B1	6		85.71	192
1B2	0	7	0.00	6
1B2	0		0.00	12
1B2	0		0.00	24
1B2	0		0.00	48
1B2	1		14.29	72
1B2	3		42.86	96
1B2	3		42.86	120
1B2	3		42.86	144
1B2	5		71.43	168
1B2	6		85.71	192
1B3	0	5	0.00	6
1B3	0		0.00	12
1B3	0		0.00	24
1B3	0		0.00	48
1B3	0		0.00	72
1B3	1		20.00	96
1B3	3		60.00	120
1B3	3		60.00	144
1B3	4		80.00	168
1B3	5		100.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2B1	1	3	33.33	6
2B1	1		33.33	12
2B1	1		33.33	24
2B1	1		33.33	48
2B1	1		33.33	72
2B1	1		33.33	96
2B1	1		33.33	120
2B1	2		66.67	144
2B1	3		100.00	168
2B1	3		100.00	192
2B2	0	5	0.00	6
2B2	0		0.00	12
2B2	0		0.00	24
2B2	1		20.00	48
2B2	1		20.00	72
2B2	1		20.00	96
2B2	1		20.00	120
2B2	3		60.00	144
2B2	3		60.00	168
2B2	4		80.00	192
2B3	0	6	0.00	6
2B3	0		0.00	12
2B3	0		0.00	24
2B3	0		0.00	48
2B3	0		0.00	72
2B3	1		16.67	96
2B3	2		33.33	120
2B3	3		50.00	144
2B3	4		66.67	168
2B3	5		83.33	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3B1	0	7	0.00	6
3B1	0		0.00	12
3B1	0		0.00	24
3B1	0		0.00	48
3B1	1		14.29	72
3B1	3		42.86	96
3B1	5		71.43	120
3B1	5		71.43	144
3B1	5		71.43	168
3B1	7		100.00	192
3B2	0	5	0.00	6
3B2	0		0.00	12
3B2	0		0.00	24
3B2	1		20.00	48
3B2	1		20.00	72
3B2	1		20.00	96
3B2	2		40.00	120
3B2	2		40.00	144
3B2	4		80.00	168
3B2	5		100.00	192
3B3	0	5	0.00	6
3B3	0		0.00	12
3B3	0		0.00	24
3B3	0		0.00	48
3B3	0		0.00	72
3B3	2		40.00	96
3B3	2		40.00	120
3B3	4		80.00	144
3B3	4		80.00	168
3B3	5		100.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1C1	0	4	0.00	6
1C1	0		0.00	12
1C1	0		0.00	24
1C1	0		0.00	48
1C1	1		25.00	72
1C1	1		25.00	96
1C1	1		25.00	120
1C1	2		50.00	144
1C1	3		75.00	168
1C1	3		75.00	192
1C2	0	5	0.00	6
1C2	1		20.00	12
1C2	1		20.00	24
1C2	1		20.00	48
1C2	1		20.00	72
1C2	3		60.00	96
1C2	3		60.00	120
1C2	3		60.00	144
1C2	3		60.00	168
1C2	4		80.00	192
1C3	1	6	16.67	6
1C3	1		16.67	12
1C3	1		16.67	24
1C3	1		16.67	48
1C3	1		16.67	72
1C3	2		33.33	96
1C3	2		33.33	120
1C3	2		33.33	144
1C3	2		33.33	168
1C3	3		50.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2C1	0	6	0.00	6
2C1	0		0.00	12
2C1	0		0.00	24
2C1	0		0.00	48
2C1	1		16.67	72
2C1	1		16.67	96
2C1	1		16.67	120
2C1	2		33.33	144
2C1	3		50.00	168
2C1	4		66.67	192
2C2	0	6	0.00	6
2C2	0		0.00	12
2C2	0		0.00	24
2C2	0		0.00	48
2C2	0		0.00	72
2C2	2		33.33	96
2C2	3		50.00	120
2C2	4		66.67	144
2C2	5		83.33	168
2C2	5		83.33	192
2C3	0	5	0.00	6
2C3	0		0.00	12
2C3	0		0.00	24
2C3	0		0.00	48
2C3	1		20.00	72
2C3	1		20.00	96
2C3	3		60.00	120
2C3	3		60.00	144
2C3	4		80.00	168
2C3	5		100.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3C1	0	5	0.00	6
3C1	0		0.00	12
3C1	0		0.00	24
3C1	0		0.00	48
3C1	1		20.00	72
3C1	4		80.00	96
3C1	4		80.00	120
3C1	4		80.00	144
3C1	5		100.00	168
3C1	5		100.00	192
3C2	0	6	0.00	6
3C2	0		0.00	12
3C2	0		0.00	24
3C2	0		0.00	48
3C2	0		0.00	72
3C2	1		16.67	96
3C2	1		16.67	120
3C2	3		50.00	144
3C2	5		83.33	168
3C2	6		100.00	192
3C3	0	7	0.00	6
3C3	0		0.00	12
3C3	0		0.00	24
3C3	0		0.00	48
3C3	1		14.29	72
3C3	3		42.86	96
3C3	3		42.86	120
3C3	4		57.14	144
3C3	5		71.43	168
3C3	7		100.00	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
1BL1	0	7	0	6
1BL1	0		0	12
1BL1	0		0	24
1BL1	0		0	48
1BL1	1		14	72
1BL1	2		29	96
1BL1	2		29	120
1BL1	2		29	144
1BL1	2		29	168
1BL1	3		43	192
1BL2	0	6	0	6
1BL2	0		0	12
1BL2	0		0	24
1BL2	0		0	48
1BL2	0		0	72
1BL2	0		0	96
1BL2	0		0	120
1BL2	1		17	144
1BL2	2		33	168
1BL2	2		33	192
1BL3	0	6	0	6
1BL3	0		0	12
1BL3	0		0	24
1BL3	0		0	48
1BL3	1		17	72
1BL3	2		33	96
1BL3	2		33	120
1BL3	2		33	144
1BL3	2		33	168
1BL3	3		50	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
2BL1	0	8	0	6
2BL1	0		0	12
2BL1	0		0	24
2BL1	0		0	48
2BL1	0		0	72
2BL1	0		0	96
2BL1	1		13	120
2BL1	1		13	144
2BL1	2		25	168
2BL1	2		25	192
2BL2	0	8	0	6
2BL2	0		0	12
2BL2	0		0	24
2BL2	0		0	48
2BL2	0		0	72
2BL2	0		0	96
2BL2	0		0	120
2BL2	0		0	144
2BL2	1		13	168
2BL2	1		13	192
2BL3	0	5	0	6
2BL3	0		0	12
2BL3	0		0	24
2BL3	0		0	48
2BL3	0		0	72
2BL3	1		20	96
2BL3	1		20	120
2BL3	1		20	144
2BL3	1		20	168
2BL3	2		40	192

Prøve	Døde	Totalt antall	Dødelighet (%)	Tid (Timer)
3BL1	0	5	0	6
3BL1	0		0	12
3BL1	0		0	24
3BL1	1		20	48
3BL1	1		20	72
3BL1	2		40	96
3BL1	2		40	120
3BL1	2		40	144
3BL1	2		40	168
3BL1	2		40	192
3BL2	0	5	0	6
3BL2	0		0	12
3BL2	0		0	24
3BL2	0		0	48
3BL2	0		0	72
3BL2	1		20	96
3BL2	1		20	120
3BL2	1		20	144
3BL2	1		20	168
3BL2	1		20	192
3BL3	0	6	0	6
3BL3	0		0	12
3BL3	0		0	24
3BL3	0		0	48
3BL3	0		0	72
3BL3	0		0	96
3BL3	1		17	120
3BL3	1		17	144
3BL3	1		17	168
3BL3	1		17	192

Vedlegg 11: Rådata fra metodeutvikling av osmolalitetmålinger av hemolymfe hos *C. finmarchicus*.

Måli:	Prøve	Måling #1 (mOsm)	#2	#3	#4	#5	GI Snitt	St.Dev.	Stigningsfall (In.Reg.)	Kommentar
Førstemtrykk	Dest.vann (OmOsm)	-50	-50				-50	0	0	
	Dest.vann (UmOsm)	-50	-50				0	0	0	Umålbare: Fryser ikke
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	0	Ja
	Hemolymfe (Umofisert)	1990	2080	2960	2920		2488	524	367	Umålbare: sterk farge, gradvis og generell smeltepunkt
	Standard (I028mOsm)	1150	1130	1145			1142	10	-3	
Temperaturvariasjoner over prøvplata?	Standard (I028mOsm)	1130	1135				1133	4	5	
	Dest.vann (OmOsm)							1 til 2		Tydlig avlesning. Separate målinger tapp.
	Dest.vann (OmOsm)							1 til 2		Tydlig avlesning. Separate målinger tapp.
	Dest.vann (OmOsm)							1 til 2		Tydlig avlesning. Separate målinger tapp.
	Dest.vann (OmOsm)							1 til 2		Tydlig avlesning. Separate målinger tapp.
Effekt av sentrifugering?	Standard (I028mOsm)	900	915	915	914		911	7	4	
	Dest.vann (OmOsm)	1040	1115	1160	1170		1121	59	44	Umålbare: sterk farge, gradvis og generell smeltepunkt
	Hemolymfe (Umofisert)	20	25	25	24		24	2	1	Umålbare som usentrifugert, men mer tydelig smeltepunkt.
	Hemolymfe (Umofisert)	2480	2645	2630	2690	2800	2611	91	69	
	Standard (I028mOsm)	1660	2060				1860	283	400	Umålbare
Effekt av sentrifugering?	Dest.vann (OmOsm)	11	9	15			12	3	2	
	Standard (I028mOsm)	987	995	997			993	5	5	
	Hemolymfe (Umofisert)	1660	2060				1860	283	400	Umålbare
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare
Effekt av sentrifugering?	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare: (Gradvis overgang mellom frys/smeltet)
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare: (Gradvis overgang mellom frys/smeltet)
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare: (Gradvis overgang mellom frys/smeltet)
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare: (Gradvis overgang mellom frys/smeltet)
	Hemolymfe (Umofisert)	-					-	-	-	Umålbare: (Gradvis overgang mellom frys/smeltet)
Effekt av større prøvolum i opps.vør?	Hemolymfe (Sentrifugert)	1200	1170	1190	1228		1197	24	10	
	Hemolymfe (Sentrifugert)	1240	1353	1495			1363	128	128	
	Hemolymfe (Sentrifugert)	1390	1620	1720	2000		1683	253	193	
	Dest.vann (OmOsm)	28	29				29	1	1	Minimumsverdi (Måling #4)
	Standard (I028mOsm)	1358	1410	1449	1420	1460	1409	38	21	
Effekt av lav prøvediameter-PTC?	Hemolymfe (Sentrifugert)	-	-	5000			-	-	Ja	Umålbare: Minimumsverdi (Måling #3)
	Hemolymfe (Sentrifugert)	-	-	5000			-	-	Ja	Umålbare: Minimumsverdi (Måling #3)
	Hemolymfe (Sentrifugert)	-	-	5000			-	-	Ja	Umålbare: Minimumsverdi (Måling #3)
	Hemolymfe (Sentrifugert)	-	-	5000			-	-	Ja	Umålbare: Minimumsverdi (Måling #3)
	Hemolymfe (Sentrifugert)	-	-	5000			-	-	Ja	Umålbare: Minimumsverdi (Måling #3)
Effekt av varierende prøvediameter+PTC?	Hemolymfe (Sentrifugert, 2xvolum)	1135	1395				1265	184	260	
	Hemolymfe (Sentrifugert, 2xvolum)	1600	5000				3900	2404	3400	Minimumsverdi (Måling #1, #2) (Fjernet, uligget)
	Hemolymfe (Sentrifugert, 2xvolum)	1065	1225	1300			1197	120	118	
	Hemolymfe (Sentrifugert, 2xvolum)	1010	1040	1215			1088	111	103	
	Hemolymfe (Sentrifugert, 2xvolum)	985	1087	945			1006	73	-20	
Effekt av varierende prøvediameter+PTC?	Hemolymfe (Sentrifugert, 2xvolum)	1065	1220	1250			1118	99	93	
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1700	1765	1790	1950	2300	1901	241	139	Stærk bedring av målbarehet, Minimumsverdi (Måling #5), Prøvens diameter = 90% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1735	2435	2935	3500		2651	750	580	Stærk bedring av målbarehet, Minimumsverdi (Måling #4), Prøvens diameter = 80% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1575	1625	2020	1885		1726	201	73	Stærk bedring av målbarehet, Prøvens diameter = 50% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	2755	4000	5000			3922	1120	1118	Stærk bedring av målbarehet, Minimumsverdi (Måling #2, #3), Prøvens diameter = 35% av brønddiameter
Effekt av lav prøvediameter-PTC?	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1525	1630	1520	1515	1565	1551	48	-4	Stærk bedring av målbarehet, Prøvens diameter = 25% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1920	2100	2500			2173	297	290	Stærk bedring av målbarehet, Minimumsverdi (Måling #2, #3), Prøvens diameter = 25% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1925	1655	1695	1635		1728	134	-83	Stærk bedring av målbarehet, Prøvens diameter = 25% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1500	1705	1660	1690		1639	94	53	Stærk bedring av målbarehet, Prøvens diameter = 25% av brønddiameter
	Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	2000	2500				2250	354	500	Stærk bedring av målbarehet, Minimumsverdi (Måling #1, #2), Prøvens diameter = 15% av brønddiameter
Hemolymfe (Sentrifugert med PTC)	1525	1350	1590	1565		1358	27	16	Stærk bedring av målbarehet, Prøvens diameter = 15% av brønddiameter	

Vedlegg 12: Beregning av diameterendring i en sfærisk prøve som blir påført en relativ volumendring fra 1 til $\frac{1}{3}$.

$$V(\text{sfære}) = \frac{\pi d^3}{6} \Rightarrow d = \sqrt[3]{\frac{6 \times V(\text{sfære})}{\pi}}$$

$$\Rightarrow d(1) = \sqrt[3]{\frac{6 \times 1}{\pi}} = 1.2407$$

$$\Rightarrow d(\frac{1}{3}) = \sqrt[3]{\frac{6 \times \frac{1}{3}}{\pi}} = 0.8602$$

$$d(\text{endring}) = \frac{0.8602}{1.2407} \times 100 = 69.33\%$$

(100% - 69.33% = 30.66% mindre diameter)