

Effekten av to synlig lys modaliteter og
røntgen på klekkesuksessen hos
Acartia tonsa-egg

Sigbjørn Hjetland Vorren

Marine Coastal Development

Innlevert: mai 2014

Hovedveileder: Yngvar Olsen, IBI

Medveileder: Jan Ove Evjemo, IBI

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

Forord

Denne masteren ble skrevet ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Institutt for Biologi i Trondheim. Alle forsøk ble gjennomført ved NTNU Senter for fiskeri og havbruk (Sealab) og ved SINTEF Fiskeri og havbruk. Forsøkene var en del av SINTEF prosjektet ”Produksjon av copepodeegg i et lukket landbasert anlegg”.

Jeg vil gjerne benytte anledningen til å takke veilederene mine for tips, støtte og generell hjelp til oppgaven. Så tusen takk til min veileder Professor Yngvar Olsen, co-veileder Dr.Scient. Jan Ove Evjemo.

En stor takk til Andreas Hagemann, Yngve Attramadal, Anders Olsen, Zsolt Volent og Arne Kjøsnes for ideer, assistanse og veiledning både gjennom forsøksperioden og under arbeid av oppgaven.

Jeg vil takke alle de gode vennene mine på NTNU for de fine årene jeg har hatt, dere er kjempeflotte alle sammen. En spesiell takk til Andreas Wæhre, John Vegard Øien, Anja Elise Hanssen og Oda Skognes Høyland. Tusen takk til min *A. tonsa*-medstudent Erik Salveson for hjelp, samarbeid om forsidebildet og underholdene diskusjoner. Tusen takk til Nicolai Ferdinand Bongaard som laget 3D tegning av prototypen til forsøket. Til sist men ikke minst, takk til familie og venner som en stor inspirasjonskilde, når mørket var som mørkest.

Uten copepodene hadde denne masteren aldri vært gjennomførbar

Mai 2014
Sigbjørn Hjetland Vorren

Sammendrag

For å få en stabil og forutsigbar klekking av *Acartia tonsa* er kunnskap om miljøparametere som påvirker klekkingen essensielt. Målet med denne oppgaven var å undersøke hvilken virkning ulike kvaliteter av synlig lys inkludert røtgenstråling har på klekkesuksess i løpet av en 48 timers klekkeperiode. Copepoder ble klekket i lys med bølgelengder fra 400 - 630 nm, i tre ulike intensiteter ($1 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$, $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ og $16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$) og testet for påvirkning fra korte intervaller av små doser røtgenstråler ($1,8 \mu Sv$). Klekkesuksessen var uavhengig av både eksponering for synlig lys og røtgenstråler.

Resultatene viser at klekking av *A. tonsa* kan foregå i mørket, bølgelengder fra 400 - 630 nm og intensiteter $0,0016 - 16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$. Røtgenforsøkene viser ingen effekt på klekkesuksess kort tid etter påvirkning av røtgenstråler, som eggene kan eksponeres for under transport.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Bagrunn	1
1.2	Copepoder som fôrorganisme	1
1.3	<i>Acartia tonsa</i>	2
1.4	Elektromagnetisk spekter	4
1.4.1	Synlig lys	7
1.4.2	UV	8
1.4.3	Røntgen	8
1.5	Mål	9
2	Materialer og metoder	10
2.1	Dyrking av <i>Acartia tonsa</i>	11
2.1.1	Vannkvalitet	11
2.1.2	Dyrking	11
2.2	Effekten av ulike bølgelengder på klekkesuksess hos <i>A. tonsa</i>	12
2.2.1	Oppsett	12
2.2.2	Fremgangsmåte	17
2.3	Effekten av ulik lysintensitet på klekkesuksess hos <i>A. tonsa</i>	18
2.3.1	Oppsett	18
2.3.2	Fremgangsmåte	18
2.4	Effekten av røntgenstråling på klekkesuksessen hos <i>A.tonsa</i>	20
2.4.1	Oppsett	20
2.4.2	Fremgangsmåte	20
2.5	Statistikk	21
3	Resultater	22
3.1	Effekt av ulike bølgelengder av synlig lys på klekkesuksess hos <i>A.tonsa</i>	22
3.2	Effekt av ulik intensitet på klekkesuksess hos <i>A. tonsa</i>	24
3.3	Effekt av røntgenstråling på klekkesuksess hos <i>A.tonsa</i>	29
4	Diskusjon	32
4.1	Aksjonsspekter	32
4.2	Intensitet	34

4.3 Røntgen	35
4.4 Konklusjon og anbefalinger for videre arbeid	37
Referanser	38
5 Vedlegg	44

1 Introduksjon

1.1 Bagrunn

Marin larveproduksjon er en av de store flaskehalsene for å drive intensiv produksjon av marin fisk. Et av problemene er at mange arter har små larver som er dårlig utviklet selv etter at plommesekken er fortært. Tradisjonelt har marine larver blitt fôret med ulike *Artemia* -arter eller rotatorier (*Brachionus spp.*) (Evjemo and Olsen, 1997). Siden *Artemia spp.* og rotatorier har et naturlig lavt innhold av essensielle flerumettede fettsyrer som EPA (Eicosapentaenoic Acid, 20:5n-3) og DHA (Docosahexaenoic acid, 22:6n-3), er en avhengig av en anrikningsprosess før de føres ut til marine fiskelarver. De essensielle fettsyrene tilsettes dietten slik at næringsinnholdet i fôrorganismene blir betydelig forbedret (Rainuzzo et al., 1997) og denne prosessen bidrar til at levendefôret er mer egnet for marine fiskelarver. Selv med den forbedrede anrikningsteknikken som er tilpasset *Artemia spp.* og *Brachionus spp.* er tegn på næringsmangel hos fiskelarvene ofte synlig, for eksempel en stor andel som har unormal pigmentmenering hos torsk (*Gadus morhua*) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) (Evjemo and Olsen, 1997; Shields et al., 1999; Hamre, 2006; Imsland et al., 2006). Dette betyr at larvene er helt avhengige av å få riktig næring til riktig tid for å kunne overleve og utvikle seg normalt fra de har fortært plommesekken.

1.2 Copepoder som fôrorganisme

Copepoder er en del av det naturlige fôret til marine fiskelarver og de finnes i innsjøer og hav over hele verden. Små copepoder mindre enn 1 mm er de mest rikelige, flercellede, heterotrofe organismene vi finner i naturen (Sargent et al., 1997). I dag brukes copepoder mest i semi-ekstensiv kultur som dyrket i industriell skala har vist seg å være et bedre alternativ som fôrorganisme til marine fiskelarver enn *Artemia spp.* og rotatorier (Næss and Lie, 1998; Shields et al., 1999; Imsland et al., 2006). Siden midten av 1990 tallet har interessen for å kultivere copepoder intensivt økt betydelig, mye på grunn av den store sesongvariasjonen og globale mangelen på *Artemia* -egg (Sorgeloos et al., 2001; Støttrup and McEvoy, 2008) .

Næringsverdien generelt hos copepoder i forhold til *Artemia* og rotatorier, gjør at de egner seg bedre som fôrorganisme. Copepoder består av en høy andel protein (24 – 82 %, tørrvekt) med høyeste verdier for de som lever i midlere breddegrader (Båmstedt, 1986), og har et naturlig høyt innhold av flerumettede fettsyrer (HUFA) som EPA og DHA. Mangel av disse fettsyrene har vist seg å forsinke vekst og utvikling, og fremskynde død hos marine fiskelarver (Rainuzzo et al., 1992). I et forsøk gjort av Evjemo and Olsen (1997) viste de at anrikede *Artemia* hadde høyere andel fett, mens copepodene hadde en signifikant høyere andel av de essensielle fettsyrene som EPA og DHA. Økt vekst, overlevelse og bedre pigmentering har blitt vist hos marine juveniler som blir fôret copepoder (Støttrup and Norsker, 1997; Doi et al., 1997; Næss and Lie, 1998; Payne and Rippingale, 2000; Evjemo et al., 2003)

I marine yngelanlegg blir stamfisken ofte lysmanipulert for å kunne produsere egg hele året, mens i naturen er copepodeproduksjonen sesongavhengig. Dette gjør at en kontinuerlig tilgang til copepoder fra naturen ikke kan garanteres. Det ideelle ville være å lage en kunstig diett (fôrpartikkel), men dette reiser flere problemer som lekkasje av komponenter fra partiklene og påfølgende stor mikrobiell aktivitet i vannet. Foreløpig synes intensiv produksjon av copepoder ut som å være den beste løsningen. Calanoide og harpacticoide copepoder vil være gruppene en fokuserer på, siden disse har planktoniske nauplii som de fleste fiskelarver kan beite på i vannsøylen (Støttrup, 2000; Conceição et al., 2010). Copepoden *Acartia tonsa* har siden 1981 blitt kultivert hos det Danske Institutt for Fiskeri og Marin Forskning som fôrorganisme (Kioerboe et al., 1985). *A. tonsa* har også blitt kultivert intensivt i NTNU Senter for Fiskeri og Havbruk (Sealab) sine lokaler i mange år.

1.3 *Acartia tonsa*

A. tonsa er en planktonisk, euryhalin calanoid copepodeart som lever i kystnære områder og i estuarier. Copepoden tilhører slekten *Acartia* i familien Acartiidae og blir sett på som en varmtvanns art og er den mest tolerante for variasjon av salinitet i denne slekten. Tettheten er på sitt høyeste fra juli til oktober da den starter leggingen av diapause egg som overvintrer (Chen and Marcus, 1997; Chinnery and Williams, 2004; Katajisto, 2006; Sullivan et al., 2007). *A. tonsa* klekker fra egg i størrelsesordenen

70 – 80 μm i diameter. Eggene er sfæriske og dekket med små pigger. Etter klekking går dyrene gjennom seks naupliære stadier for så å bli copepoditter. De gjennomgår så fem copepodittstadier før de er kjønnsmodne. Fra nyklekt nauplii til fullt voksen copepode tar det mellom 12 og 16 dager. Voksne *A. tonsa* kan bli ca 1,5 mm lange der hunnene blir størst (Miller et al., 1977; Mauchline, 1998). *A. tonsa* har blitt observert å produsere subitaneous, diapause og ”delayed hatching” egg (Uye, 1985; Chinnery and Williams, 2004; Katajisto, 2006). Subetaneous egg klekker umiddelbart etter de er lagt, men de kan gå i dvale hvis forholdene ikke er gunstige, som f.eks. lav temperatur, salinitet og ugunstig pH (Drillet, 2010). Denne dvalen kalles ”quiescent” og de kan klekke så snart forholdene er gunstige igjen. Diapause egg klekker ikke selv om forholdene er fordelaktige før de har vært gjennom en refraktærperiode. Etter denne perioden kan de og gå inn i en ”quiescent” fase (Drillet, 2010). ”Delayed hatching” egg har en forlenget inkubasjonsperiode før de klekker (Tab. 1).

Tabell. 1: Oversikt over ulike typer egg lagt av *A. tonsa*.

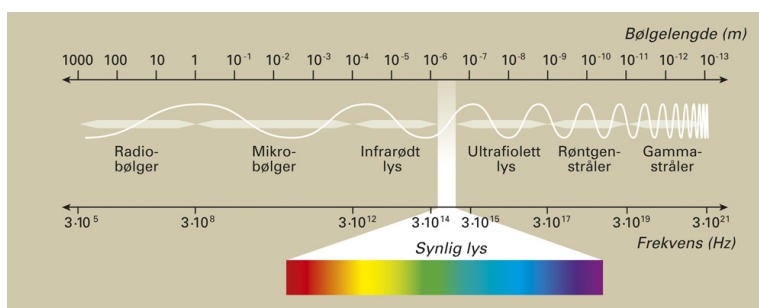
Egg typer	Forkortelse	Egenskaper
Subitaneous	SE	Klekker umiddelbart. Kan gå i dvale om forholdene ikke er optimale.
Quiescent	QSE	Dvalen subitaneous egg går i hvis vannkvaliteten ikke er gunstig. Klekker så snart forholdene er bra igjen.
Diapause	DPE	Egg som går gjennom en refraktærperiode der eggene ikke klekker som en mekanisme for forventede uønskede forhold som temperatur. Kan og gå inn i quiescent etter refraktærperioden.
Delayed hatching	DHE	En forlenget inkubasjonsperiode.

Tidligere studier av *A. tonsa* har vist at temperatur og salinitet har mye å si for utvikling og klekking. Eggene kan klekke innenfor et stort temperatur og salinitet spenn (Castro-Longoria, 2003; Chinnery and Williams, 2004; Holste and Peck, 2006), men eggene har vist seg å ha omtrent like god klekking i saliniteter fra 15 – 40 psu, der de voksne copepodene har vist høyest eggproduksjon mellom 15-20 psu (Holste and Peck, 2006). Temperatur er en annen parameter som har mye å si for klekkesuksess. Forsøk gjort av Holste and Peck (2006) og Chinnery and Williams (2004) viste at *A. tonsa*-egg klekker mellom 5 – 34 °C, med de beste resultatene fra 20 – 25 °C.

1.4 Elektromagnetisk spekter

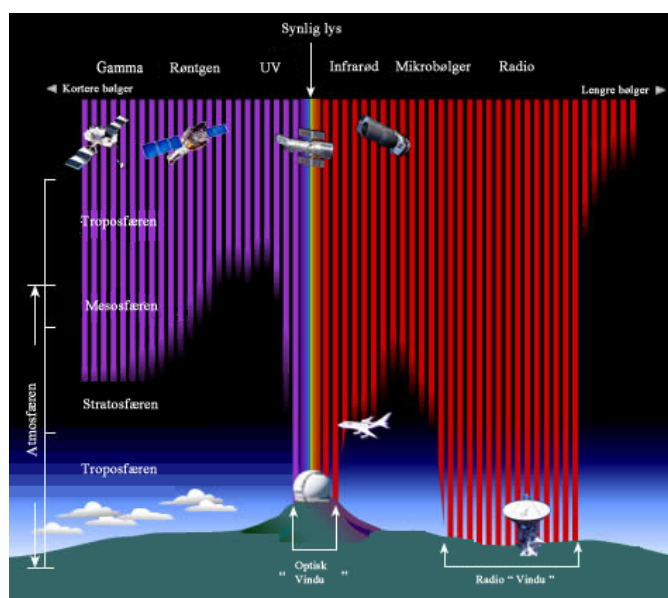
Siden *A. tonsa* er en art som finnes langs kysten og estuarier er den å finne i et habitat som utsettes for mye lys. Egg fra *A. tonsa* har blitt høstet på dybder fra strandlinjen til 37 m (Bellantoni and Peterson, 1987; Heinle, 1966). *A. tonsa* er en art som har sin høyeste tetthet i sommermånedene august til oktober og det er i denne perioden at det produseres mest egg (Dam et al., 1994; Katajisto, 2006) samtidig som solinnstrålingen er på sitt sterkeste.

Det elektromagnetiske spekteret blir kategorisert i ulike bølgetyper ut ifra egenskaper, energi og bølgelengder (Fig.1). Bare en liten del av strålingen er synlig for oss mennesker, og dette blir kalt synlig lys (400-700 nm). Ultrafiolett lys kan deles opp i UVA (320 - 400 nm), UVB (280 - 320 nm) og UVC (100 - 280 nm). Røntgen er mer høyfrekvente bølger (0,01 - 10 nm) som kan være svært skadelige.



Figur. 1: Elektromagnetiske bølger kategorisert i grupper. Kilde: Anne Langdalen. Gyldendal Norsk Forlag

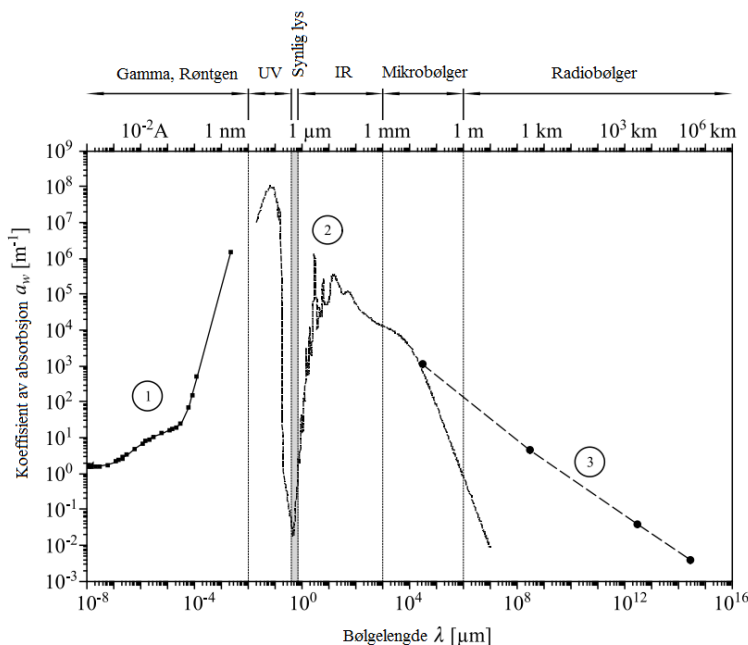
I atmosfæren absorberes, reflekteres eller spres noe av denne strålingen. Dette blir gjort av stoffer som CO_2 (*Karbondioksid*), H_2O (*Vannndamp*), CH_4 (*Metan*) og O_3 (*Ozon*) (University, 2006) . Når energien fra strålene blir absorberet i disse molekylene, gjøres den om til en annen form for energi (varme), og slippes dermed ikke gjennom atmosfæren. Bare synlig lys, UVA, en liten del UVB og noen deler av radiobølgene bryter gjennom. Høyenergibølgene (røntgen og gamma) blir helt absorbert før de når bakkenivå (Fig.2).



Figur. 2: Elektromagnetisk stråling som blir absorbert i atmosfæren og når bakkenivå. Modifisert bilde fra : STSci/JHU/NASA

Absorpsjon av lys i havene er en fundamental prosess i høsting av solenergi. Vann absorberer de elektromagnetiske strålene mye mer enn atmosfæren gjør. Vann som er den største absorbenten av stråling i atmosfæren i form av vanndamp, er også den klart største absorbenten i hav og sjø (Fig.3) (University, 2006). Hvis vi trekker fra energi reflektert og absorbert i atmosfæren absorberer alle verdenshav energi i størrelsesorden $6.4 \cdot 10^{10} MW$ (Wozniak and Dera, 2007), energi som varmer og fordampner vann.

Vann er en sterk absorberent av de fleste bølgelengder i det elektromagnetiske spekteret, men er nesten transparent for synlig lys (Fig.3). Det at vann er så transparent for synlig lys legger til rette for fotosyntetiske organismer i vannsøylen og ernærer nesten hele næringskjeden. Av det synlige lyset har vann den laveste absorbansen for blått lys. Vann absorberer mer av de lange bølgelengdene som rødt og grønn og vannet virker derfor blått i våre øyne. Ultrafiolette ståler blir absorbert mer med synkende bølgelengde og blir raskt absorbert. Lavenergi røntgenstråler absorberes av vann, men røntgenstråler med høyere energi blir lite absorbert.

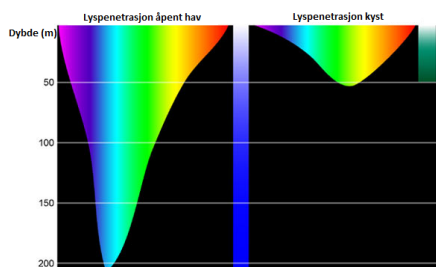


Figur. 3: Absorpsjonsspekteret over hele spekteret i vann (Gamma til lange radiobølger). (1) Forholdet mellom strålingsabsorpsjon og bølgelengde for gamma, røntgen og høyenergi UV i rent vann, basert på data fra (Aglintzev, 1961; Jaeger and Behnken, 1959; Ciborowski, 1962; Adamczewski, 1965) . (2) Forholdet mellom lavenergi UV til synliglys til absorpsjon i rent vann, basert på data fra (Segelstein, 1981). (3) Forholdet mellom lange radiobølger og absorpsjon i saltvann, basert på data fra (Popov and Orlov, 1979). Modifisert bilde : Satt sammen av (Wozniak and Dera, 2007) .

1.4.1 Synlig lys

Voksne *A. tonsa* har et enkelt naupliert øye som er sensitivt for en intensitet helt ned til $2.8 pE * m^{-2} * s^{-1}$, med den sterkeste sensitiviteten mellom 453 og 620 nm (Stearns and Forward, 1984). I naturen viser *A. tonsa* en vertikal migrasjon der de beveger seg opp i vannsøylen om natten og ned på dypere vann om dagen.

Synlig lys er absorbert ned til 1% av overflateirradiensen ved 38-102m (Målt utenfor Chile) (Montecino and Pizarro, 1995). I sjøvann absorberes sollys og ulike bølgelengder forskjellig. Dette skjer fordi absorbansen forandrer seg gjennom årstiden ved ulik breddegrad, biologisk aktivitet, ved kyst eller åpent hav (Fig.4), o.s.v, slik at organismene får svært varierende forhold. Det gjør at *A. tonsa* vil bli utsatt for en rekke ulike stråler og intensiteter.



Figur. 4: Illustrasjon av hvordan ulike bølgelengder av synlig lys absorberes i vannsøylen på ulik måte ved kysten og åpent hav. Foto : Kyle Carothers, NOAA-OE

Få studier rundt bølgelengde og lysintensitet er gjort med klekking av *A. tonsa*, men (Davis, 1993) brukte en intensitet på $18 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ i sine forsøk. Han valgte styrken ut fra intensiteten som ble målt på 35 m (Georges bank, Massachusetts). I et annet forsøk av Støttrup et al. (1986) ble en intensitet på $18 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ brukt. Ingen av disse studiene så på lysets påvirkning av klekkesuksess. Det er blitt vist at ulike bølgelengder og intensitet påvirker klekking av *Artemia* cyster. Der en bølgelengde på mellom 400 og 600 nm viste seg å være det mest effektive (Linden et al., 1985; Van der Linden et al., 1986).

1.4.2 UV

UV-stråler er mer energetiske enn synlig lys og derfor mer skadelig, men mesteparten blir absorbert av ozonlaget i atmosfæren. *A. tonsa* som en finner i kystsonen vil da kun bli utsatt for de mindre skadelige UV-strålene. UVA-stråler blir sett på som biologisk harmløse, mens UVB blir sett på som biologisk skadende (Madronich et al., 1995). I det marine miljø blir 99 % (overflate irradians) av UVA stråler absorbert på en dybde rundt 24-42 m, mens UVB har blitt absorbert til samme nivå ved 11-17 m (Montecino and Pizarro, 1995), men målinger av absorpsjon har stor variasjon på ulike lokasjoner.

Flere studier rundt UVB stråling og copepoder har blitt gjort. Saito and Taguchi (2003) testet UVB stråler på klekkesuksess av den marine copepoden *Paracalanus parvus.s.1*. Studien viste at klekkesuksessen sank med kortere bølgelengde enn 290 nm og at lengre eksponering med lav intensitet var mer skadelig enn høy intensitet med kortere eksponering. En tilsvarende studie er gjort på *Calanus sinicu* og *Acartia Clausii* av Naganuma et al. (1997); Karanas et al. (1979, 1981) med lignende resultater.

1.4.3 Røntgen

Røntgenstråler er en veldig kraftig form av elektromagnetisk stråling som har en bølgelengde på mellom 0.01 og 10 nm. Røntgenstråler blir fullstendig absorbert og spredt i atmosfæren, og de har følgelig ikke noen påvirkning på oss eller andre levende organismer. Men røntgenstråler brukes i mange ulike apparater til å gjennomlyse objekter.

Få studier rundt røntgen og krepsdyr har blitt gjennomført, men i et forsøk gjort på voksne *Artemia* ble overlevelse undersøkt under ulike styrker av røntgen. I dette forsøket gjort av Grosch and Erdman (1955) gjorde de hunnene sterile på 2-300 R (Røntgen) som er lavere intensiteter enn det som steriliserer insekter, og den dødelig dosen på voksne *Artemia* var en strålingsdose på 150-200 000 R (1400 - 1866 Sv). Røntgendoser måles i nyere tid som regel i rem (Røntgen equivalent in man), Sv (Sievert) eller Gy (Grey), men den mest brukte er SI-enheten Sv, der $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J} * \text{kg}^{-1}$. Det er mer vanlig å bruke energinivået til røntgenstrålene enn bølgelengden når de skal beskrives.

1.5 Mål

Egg fra *Acartia tonsa* som er produsert ved NTNU Senter for Fiskeri og Havbruk (Sealab) har hatt varierende klekkesuksess (%). Ved sending av egg med fly har det virket som om klekkesuksessen ble redusert. Det er usikkert hva som virker inn på klekkingen av *A. tonsa*, men for å lykkes er det nødvendig med mer kunnskap om hvilke miljøparametere som påvirker og signaliserer klekking. Dessuten er det nødvendig at eggene skal kunne lagres i en periode og kunne klekkes med sikke resultater etter behov. Målet med denne oppgaven var å bestemme hvordan de elektromagnetiske strålene UVA, synlig lys og røntgenstråler påvirker klekkesuksessen hos *A. tonsa*-egg. En optimal og konsistent klekking sammen med sikker transport er viktig for en mer forutsigbar og stabil produksjon av fôrorganismer i marine yngelanlegg.

Følgende delmål er definert:

1. Bestemme hvilken effekt ulike bølgelengder fra synlig lys har på klekkesuksess og etablere et aksjonsspekter for *A. tonsa*-egg.
2. Bestemme hvilken effekt ulik intensitet i ulike aksjonsspekter har på klekkesuksessen.
3. Bestemme om små doser med røntgenstråler påvirker klekking av *A. tonsa*-egg.

Forsøkene ble utført ved å utsette egg for ulike bølgelengder (400–700 nm) og ulike intensiteter ($0,0016 - 16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$) under inkubasjon for klekking, og bruke korte intervaller av små doser røntgenstråler (1, 8 μSv) på egg før inkubasjon.

2 Materialer og metoder

Forsøkene ble utført på NTNU Senter for Fiskeri og Havbruk (Sealab), Brattørkaia 17B, Trondheim. Oppgavene var en del av SINTEF-prosjektet ”Produksjon av copepodeegg i et lukket landbasert anlegg”. Forsøkene ble utført mellom august 2012 og desember 2013. I alle forsøkene ble egg fra *Acartia tonsa* brukt for å undersøke om stråling kan påvirke klekkesuksessen. Alle forsøkene ble utført over en 48 timers klekkeperiode der en ukjent mengde egg ble pipetert ut og lagt i 10 mL vann. I forsøkene ble det brukt to ulike grupper egg:

- Ferske (Nylagte egg fra copepodekarene (Fig. 5) som ble brukt i forsøk samme dag. Eggene var fra 0 til 24 timer gamle)
- Lagrede (Høstet egg ved et tidligere tidspunkt og lagret i et kjøleskap over en periode)



Figur. 5: Karene *Acartia tonsa* kultiveres i ved NTNU Senter for Fiskeri og Havbruk (Sealab).

2.1 Dyrking av *Acartia tonsa*

2.1.1 Vannkvalitet

Vannet som ble brukt til copepodedyrking og algeproduksjon ble hentet fra Trodheimsfjorden. Inntaksrøret ligger på 70 meters dyp 800 meter fra land og vannet ble sandfiltrert, UV-behandlet og luftet. Vannet holdt da et redoxpotential på mellom 100 - 160 mV. I algeproduksjonen ble vannet klorert med natriumhypokloritt ($25 \text{ mL } 15 \% \text{ NaOCL per } 100L \text{ H}_2O$) under kraftig lufting i minst 5 timer. Deretter ble vannet avklorert med natriumthiosulfat pentahydrat ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$) ved tilsats av $3g \text{ Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$ per 25 mL NaOCL under kraftig lufting i 6 timer. Vannet var så avklorert og brukt i algeproduksjonen.

2.1.2 Dyrking

Den calanoide copepoden *Acartia tonsa* (Klone DFH.AT1) ble dyrket i NTNU/SINTEF's lokaler på Brattøra i 1000 liters tanker. Copepodekulturene ble kontinuerlig føret med *Rhodomonas baltica* fra et reservoar og algetettheten i copepodetankene ble holdt rundt 30 - 40000 celler per mL . Fra disse tankene ble det daglig høstet copepodeegg ved hjelp av en roterende arm i bunnen av karet. Eggene ble konsentrert og manuelt samlet inn gjennom en slange og over til en bøtte. Eggene ble så rensset og vasket ut ved hjelp av tre filtere ($200 \mu\text{m}$, $120 \mu\text{m}$ og $64 \mu\text{m}$) før de ble overført til anoxisk/sjøvann (34 psu) i plastikkprøvebeholdere (NUNC 25 mL). Rørene ble pakket inn i aluminiumsfolie for å unngå lyspåvirkning og kjølt ned i et kjøleskap (SANYO Medi-Cool, model: MPR-311D[H]) som holdt 2°C

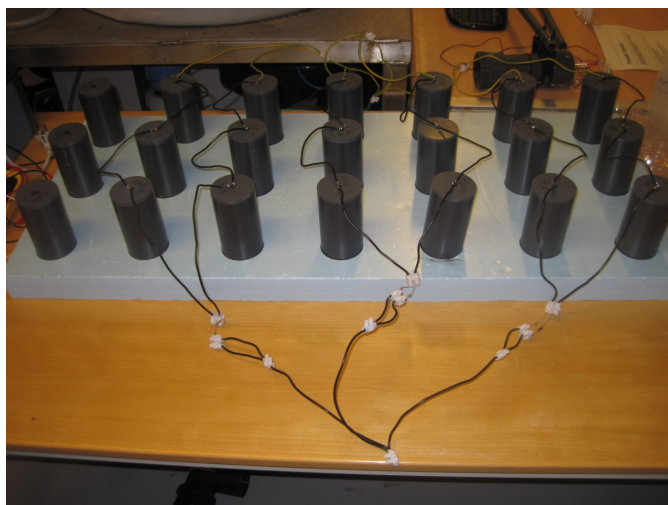
R. baltica (Clone NIVA 5/91 Cryptophyceae: Pyrenomonadales) ble dyrket i syv akryltanker ($160 - 200 \text{ L}$) med seks lysrør. Det ble gjennomført en semikontinuerlig høsting av algene der halvparten av volumet fra tankene ble høstet og erstattet med avklorert vann hver dag. Som vekstmedium til algene ble det iblandet Conway medium ($1 \text{ mL per liter avklorert vann}$) som ble tilsatt algetankene sammen med kontinuerlig tilførsel av CO_2 .

2.2 Effekten av ulike bølgelengder på klekkesuksess hos *A. tonsa*

Hensikten med forsøket var å se om ulike bølgelengder påvirket klekkesuksessen til *A. tonsa*. Egg som var ferske, lagret i en måned eller i tre måneder ble testet.

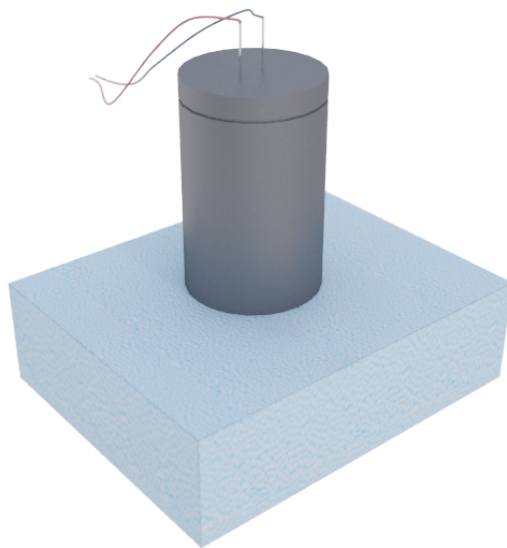
2.2.1 Oppsett

Forsøket ble gjennomført i en spesialrigg som bestod av syv rader. Hver farge hadde hver sin rad, med tre replikater (Fig. 6). Hvert av kammerene ble dreid til av pvc og et pvc-lokk ble tilpasset hvert av kammerene. I lokkene ble det boret et hull (8 mm) der diodene ble presset inn. Anoden og katoden stakk ut av lokket og diodebunnen ble tettet med svart silikon. Foran hver rad av tre dioder ble en motstand satt for å få lik intensitet på diodene og samtidig hindre overbelastning. Disse ble skrudd fast i ”sukkerbiter” for å lettere kunne skifte dem ut. Motstandene var ikke like for hver rad siden de ulike diodene trengte ulik strøm for å levere lik intensitet. En prototype ble laget før forsøkene for å undersøke mulig overoppheting i kammeret (Fig. 7).



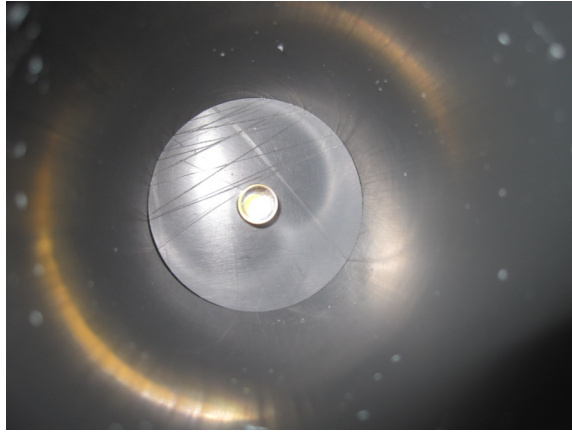
Figur. 6: Forsøksriggen til lysforsøkene. Til venstre er den mørke uten dioder. De andre rekkene har tre dioder koblet i serie og alle fargene koblet i parallell med en motstand i forkant.

I bunnen ble en EPS 80 blå isoporplate skjært til, der det ble sagd spor (3 cm dype) med samme diameter som på pvc-rørene for at kammerene skulle stå stødig. Sporene fungerte og som en stopper for ekstern lyspåvikning. Dette ble også brukt under måling av intensitet. For å måle intensiteten ble et hull borret i senter av isoporen til prototypen (Fig. 7). Hullet var dimensjonert for sensoren som så ble presset inn til riktig høyde.



Figur. 7: 3D tegning av prototypen. Laget av Nicolai Ferdinand Bongaard.

Diodene var plassert i toppen og høyden på kammerene (Fig. 8) var laget slik at brennvidden til diodene traff hele arealet der petriskålene sto. I petriskålene ble copepode-eggene lagt og diameteren på røret var bredt nok til at en petriskål kunne plasseres inni.



Figur. 8: Innsiden av et forsøkskammer med diode i senter i toppen.








Lokkene ble dreid til med en fals med presspassning for å tette godt og unngå at de hoppet av under forsøkene (Fig. 9). I anoden og katoden ble ledningene loddet fast for å sikre god kobling.

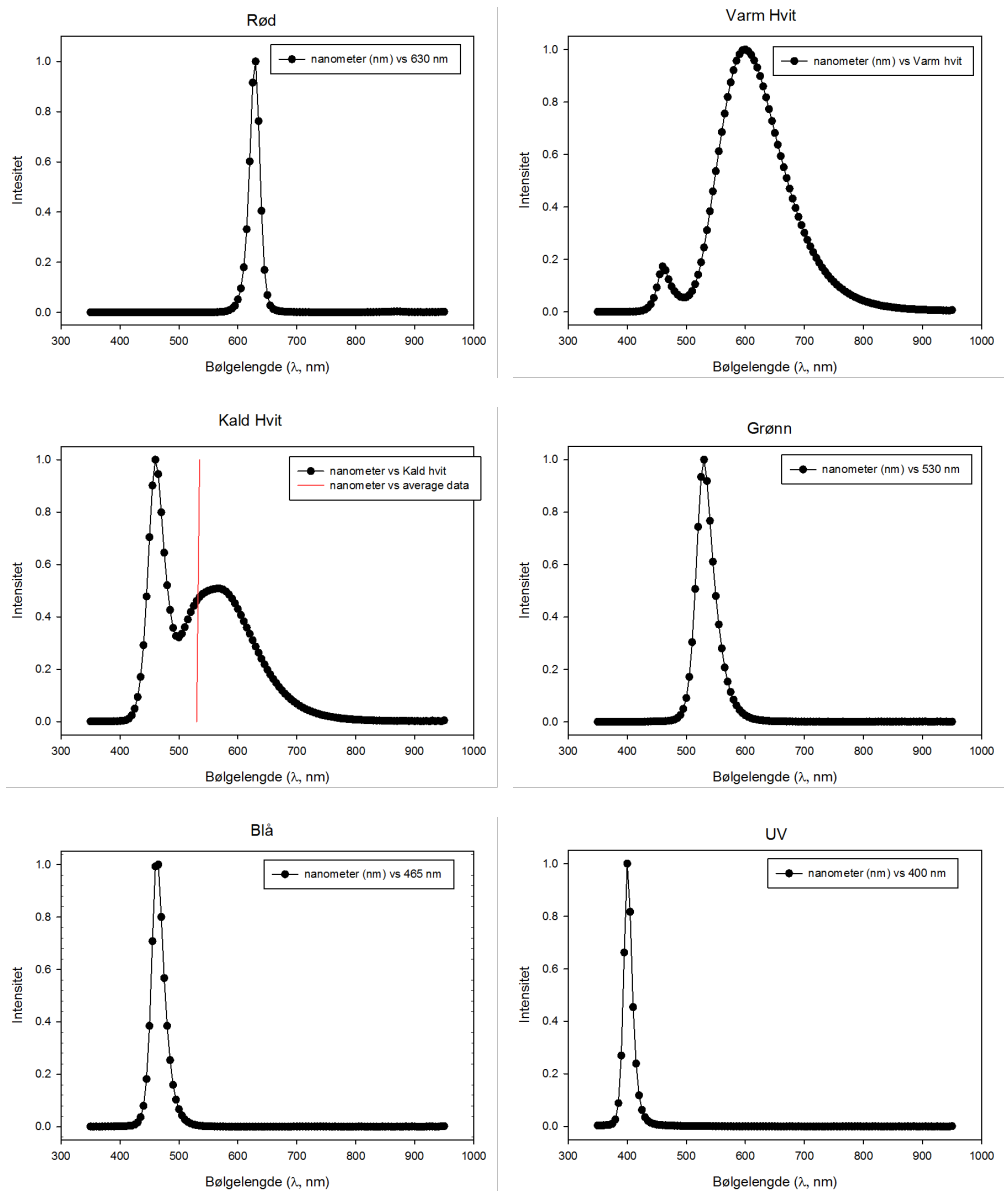


Figur. 9: Lokket på et forsøkskammer som ble dreid til for å passe godt i sylind-
deren og tette for all ekstern lyspåvirkning.

En mørketest tatt av hvert enkelt kammer for å verifisere at alle kammerene var like tette for ekstern lyspåvirkning. Dette ble målt med en LI-COR LI-1400 Datalogger tilpasset med en LI-192 Underwater Quantum Sensor. Deretter ble lysintensiteten til alle diodene målt for å se at intensiteten på lyset var likt i alle. Eventuelle motstander og dioder ble byttet ut for å utligne forskjellene. Intensiteten til hele enheten ble også justert med en variabel strømforsyning (Oltronix power supply c40-08D) som forsynte diodene med strøm. Temperatur ble logget i et av kammerene med en Pico-Lite Temperature USB Data Logger. Lysspekteret fra diodene ble målt av Zsolt Volent (SINTEF) med en Hyperspektral sensor (RAMSES-ACC-VIS - Hyperspectral UV-VIS Irradiance Sensor - 320 - 950 nm) (Fig. 10).

Tabell. 2: Fargene, intensiteten og bølgelengden som ble valgt i de ulike forsøkskammerene. Lysspekteret er vist i Fig. 10.

	Farge	Styrke ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Diodetype	Bølgelengde
	Mørke	0,0016	Ingen diode	0
	Rød	1	M10R25-1	630 nm
	Hvit	1	M10V25-1	540 nm
	Varm Hvit	1	M10HV25-1	600 nm
	Grønn	1	M10G25-1	530 nm
	Blå	1	M10B25-1	465 nm
	Ultraviolett	1	M10UV-1	400 nm



Figur. 10: Målinger av lysspekteret til diodene som ble brukt i lysforsøkene. Den røde linjen i kaldhvit er midtpunktet for mengden lys (540 nm), mens i de resterende fargene er toppunktet brukt som referansepunkt.

2.2.2 Fremgangsmåte

For å sikre at eggene var ferske og upåvirket av lys ble eggene fra copepodetankene høstet kl 18:00 dagen før forsøket. Copepodetankene ble først satt i konstant mørke i 12 timer. Deretter ble eggene høstet, vasket og overført til plastikkprøvebeholdere (NUNC 25 mL), alt gjennomført i konstant mørke for å unngå lysforurensing. Petriskålene var på forhånd fylt med sjøvann (10 mL, 34 psu). Plastikkprøvebeholderne med egg ble ristet godt før hvert uttak og 5 μL ble pipetert ut (Fisher Scientific Finnpipette 5 – 50 μL) til hver petriskål. Når alle petriskålene var på plass og kammrene satt over, ble lyset skrudd på. I et av kammrene ble en PicoLite Temperature USB Data Logger festet for å måle temperaturen gjennom hele forsøket.

Eggene ble eksponert for konstant lys i 48 timer i 22 °C for å klekke. For å evaluere klekkesuksessen ble prøvene tilsatt Phytifix (Lugols løsning) for å gjøre dyrene mer synlige og for å ta livet av dem. Petriskålene ble satt under et stereomikroskop (Leica MZ 125) og nyklekte *A. tonsa* nauplier og uklekte egg ble talt manuelt ved hjelp av en peristatpumpe (Watson Marlow 120s). Klekkesuksessen ble bestemt ved hjelp av Ligning (1).

$$Klekkesuksess = \frac{\text{Antall nauplii}}{\text{Antall nauplii} + \text{Antall uklekte egg}} \quad (1)$$

De neste forsøken ble utført med egg lagret i henholdsvis en og tre måneder i et farmasautisk kjøleskap (SANYO Medi-Cool, model MPR-311D[H]). Eggene ble pipetert ut på samme måte i totalt mørke og overført til petriskåler. Samme prosedyre ble fulgt under hele forsøket som med ferske egg.

2.3 Effekten av ulik lysintensitet på klekkesuksess hos *A. tonsa*

Hensikten med dette forsøket var å se om ulik lysintensitet påvirket klekkesuksessen av egg fra *A. tonsa*. En måned gamle egg ble klekket i tre ulike intensiteter.

2.3.1 Oppsett

Forsøket ble gjennomført i samme forsøksrigg som bølgelengdeforsøket. Tre ulike intensiteter av lys ble etablert ved å bytte ut motstandene som endrer styrken på strømmen (mA) som ble tilført diodene. Intensitetene som ble valgt er vist i Tab. 3. Intensitetene i forsøket ble valgt ut fra tre kriterier:

1. Hvor høy intensitet diodene klarte å levere uten å gå i stykker.
2. Intensiteten brukt i tidligere studier.
3. På et intensitetsnivå der alle diodene leverte samme intensitet.

Alle diodene ble kalibrert med en LI-COR LI-1400 Datalogger før hvert av forsøkene for å sikre at diodene leverte lik intensitet. Siden UV og de røde diodene ikke klarte å levere mer enn $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ uten at de sviktet, ble de stilt inn på $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ i forsøket der de andre diodene hadde $16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$.

2.3.2 Fremgangsmåte

Forsøket ble utført med en måned gamle egg fra kjøleskaplageret. Alle forsøkene ble gjort med egg fra samme tank, samme høstedata, og alle ledd av forberedelsene og selve igangsettingen av forsøket ble foretatt i mørket. Eggene ble først delt opp i tre like plastikkprøvebeholdere og tilsatt kaldt sjøvann. To av prøvene ble satt tilbake i kjøleskapet og dekket til med aluminiumsfolie. Disse eggene ble så tatt i bruk i forsøk to og fire dager etter det første forsøket ble startet. Eggene ble pipetert ut og plassert i petriskåler inne i forsøkskammerene. Temperaturen ble logget i et av kammerene under hvert av forsøkene med en PicoLite Temperature USB Data Logger.

Forsøket sto med konstant lys i 48 timer i 22 – 25 °C for å klekke. For å evaluere klekkesuksessen ble prøvene tilsatt Phytofix (Lugols løsning) og satt under et stereomikroskop (Leica MZ 125). *A. tonsa* nauplier og uklekte egg ble talt manuelt ved hjelp av en peristatpumpe (watson marlow 120s) som sugde ut dyr og egg fra petriskålene. Klekkesuksessen ble beregnet ved hjelp av Ligning (1).

Tabell. 3: Intensitesforsøk nummer 1,2 og 3. Intensiteten var 5 og 16 ganger så høy som forsøk nr 1.

1	Farge	Styrke ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Diodetype	Bølgelengde
	Svart	0.0016	Ingen diode	0
	Rød	1	M10R25-1	630 nm
	Hvit	1	M10V25-1	540 nm
	Varm Hvit	1	M10HV25-1	600 nm
	Grønn	1	M10G25-1	530 nm
	Blå	1	M10B25-1	465 nm
	Ultraviolet	1	M10UV-1	400 nm

2	Farge	Styrke ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Diodetype	Bølgelengde
	Svart	0.0016	Ingen diode	0
	Rød	5	M10R25-1	630 nm
	Hvit	5	M10V25-1	540 nm
	Varm Hvit	5	M10HV25-1	600 nm
	Grønn	5	M10G25-1	530 nm
	Blå	5	M10B25-1	465 nm
	Ultraviolet	5	M10UV-1	400 nm

3	Farge	Styrke ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Diodetype	Bølgelengde
	Mørke	0.0016	Ingen diode	0
	Rød	5	M10R25-1	630 nm
	Hvit	16	M10V25-1	540 nm
	Varm Hvit	16	M10HV25-1	600 nm
	Grønn	16	M10G25-1	530 nm
	Blå	16	M10B25-1	465 nm
	Ultraviolet	5	M10UV-1	400 nm

2.4 Effekten av røntgenstråling på klekkesuksessen hos *A.tonsa*

Copepodeegg som skulle sendes fra Trondheim til Spania med fly har vist varierende klekkesuksess etter forsendelsen. Formålet med forsøket var å se om røntgenapparater på flyplasser har effekt på klekkesuksessen til *A.tonsa*-egg.

2.4.1 Oppsett

Egg ble høstet fra tre copepodekar på Sealab. I lokalene til NTNU/SINTEF dyrkes copepodene i tre ulike kar (Fig. 5) og fra hver av tankene ble eggene høstet og fordelt likt i fire plastikkprøvebeholdere hver (NUNC 25 mL). En av beholderene fra hvert kar ble pakket inn i aluminiumsfolie og plassert i et kjøleskap. De resterende 12 ble pakket inn i aluminiumsfolie, satt i en kjølt isoporkasse og fraktet til Værnes flyplass. Replikatene ble delt opp i tre grupper med en replikat fra hver tank og ble deretter kjørt gjennom et røntgenapparat (Smiths Detection HI-SCAN 6046si). Dette apparatet har en røntgendose på 1,8 micro Sv(0,18milli rem).

Tabell. 4: Gruppering av prøvebeholdere og antall runder gjennom røntgenmaskinen.

	Kontroll	1 Runde	5 Runder	10 Runder
Kar 1	1	1	1	1
Kar 2	1	1	1	1
Kar 3	1	1	1	1

2.4.2 Fremgangsmåte

Petriskålene som ble brukt til klekkestestene var på forhånd fylt med temperert sjøvann (10 mL, 34 psu, 22 °C). Prøvebeholdere ble ristet godt før hvert uttak og 5 µL egg ble pipettert ut (Fisher Scientific Finnpiquette 5 – 50µL) til hver petriskål. Eggene ble satt til klekking og talt opp etter 48 timer.

2.5 Statistikk

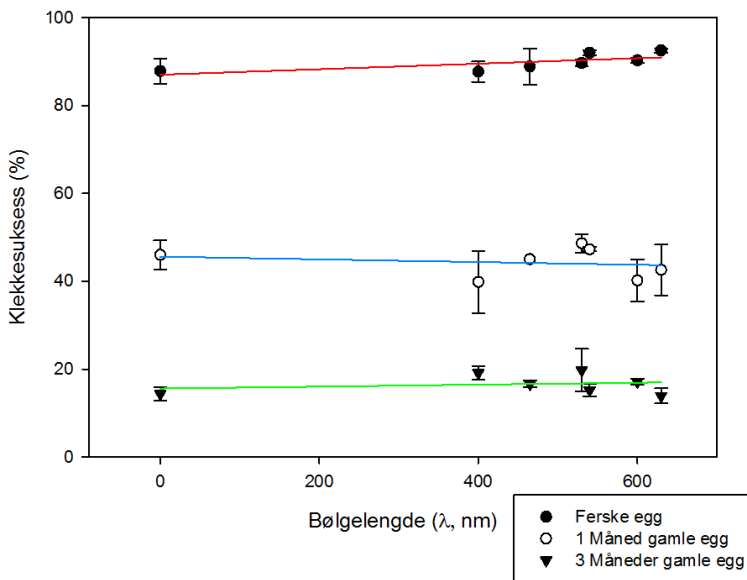
All data fra forøkene ble samlet i Windows Office Excel (Microsoft Inc). I Microsoft Excel ble klekkesuksess og standardavvik regnet ut. Alle grafene ble laget i Sigmaplot versjon 12.5 for Windows (Systat Software Inc).

Statistiske analyser ble gjort i R (The R Project for Statistical Computing) og SPSS (IBM) med et signifikansnivå på $\alpha = 0.05$. Der lysforsøkene ble testet med en ANOVA-test. Residualene ble sjekket for normalfordistribusjon.

3 Resultater

3.1 Effekt av ulike bølgelengder av synlig lys på klekkesuksess hos *A.tonsa*

Klekkesuksessen sank fra et gjennomsnitt på 89,8 % \pm 0,73 SE hos ferske egg til 44,0 % \pm 1,16 SE i en måned lagrede egg og helt ned til 16,6 % \pm 0,86 SE hos 3 måneder lagrede egg. Selv om klekkesuksessen sank drastisk holdt klekkesuksessen seg lik i forhold til bølgelengdene. Eggene klekket like godt i konstant mørke som i belysningen med bølgelengdene 400 - 630 nm. Ved hjelp av statistiske analyser viser en ANOVA-test ingen signifikante forskjeller mellom bølgelengde og klekkesuksess over de tre ulike lagringsperiodene ($p = 0.50$). Fig. 11 viser klekkesuksessen fra bølgelengdeforsøkene med egg fra tre ulike lagringsperioder. Klekkesuksessen er vist med et gjennomsnitt av alle nauplii og uklekte egg med tre replikater i hvert punkt \pm standard error.



Figur. 11: Klekkesuksess for *A. tonsa*-egg som funksjon av bølgelengder til eksponert lys over ulike lagringsperioder. Punktene er fra venstre: Mørk (0), UV (400 nm), Blå (465 nm), Grønn (530 nm), Kald Hvit (540 nm), Varm Hvit (600 nm) og Rød (630 nm). Gjennomsnitt over 3 replikater \pm SE.

I alle tre forsøkene var intensiteten ($1 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$, med $0.0016 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ i den mørke), temperatur ($22^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$), salinitet (34 psu) og pH (8.3) lik gjennom hele forsøket. Siden en ukjent mengde egg ble pipettert ut i mørket, varierer antallet i prøvene stort (Tab. 5).

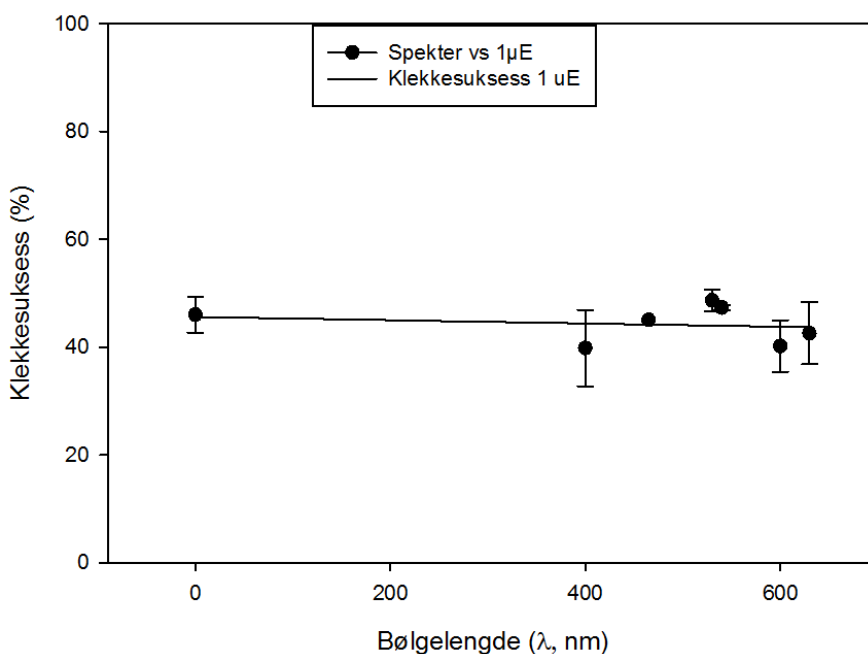
Tabell. 5: Variasjoner i antall nauplii og egg fra inkubasjonene i bølgelengdeforsøkene. Verdiene viser minste og høyeste antall med gjennomsnittet i parentes.

Prøve	Variasjon av antall egg (Gjennomsnitt)	Variasjon av antall nauplii (Gjennomsnitt)
Ferske	2-40 (20)	14-398 (182)
1 Måned	15-250 (95)	22-246 (78)
3 Måneder	19-302 (113)	5-60 (22)

De største klekkesuksess variasjonene var i gruppen med egg lagret i en måned. Forskjellene var små med et gap på maks 9 % klekkesuksess fra høyeste til laveste verdi. Sett de tre ulike lagringsperiodene under ett var dette den største variasjonen i klekkesuksess for eggene. Forsøket med egg lagret i en måned mangler en replikat på UV, Blå, Varm Hvit og Rød etter litt dårlig behandling av prøvene.

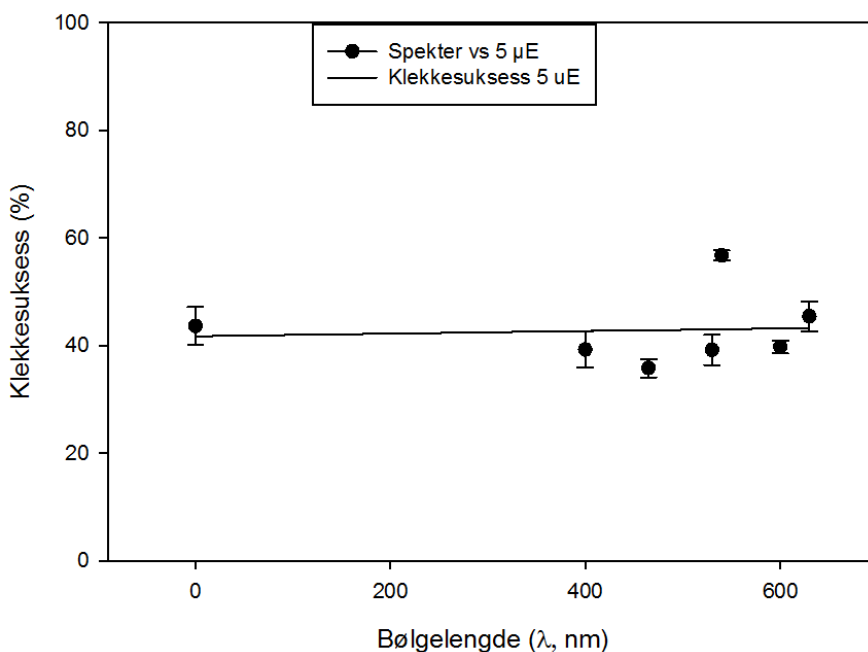
3.2 Effekt av ulik intensitet på klekkesuksess hos *A. tonsa*

Fig. 12 viser klekkesuksessen fra lysintensitetsforsøket med den laveste intensiteten. Klekkesuksessen er vist med et gjennomsnitt av alle nauplii og uklekte egg med tre replikater i hvert punkt \pm standard error. I forsøket var intensiteten $1 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$, med $0.0016 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ i den mørke. Dette var den samme intensiteten som ble brukt i aksjonsspekterforsøket. Bare små forskjeller i klekkesuksess kan observeres. Fra høyeste til laveste nivå på klekkesuksessen var det en forskjell på 8,84 %, men UV, Varm Hvit og Rød har litt større variasjon i replikatene. Temperaturen $22^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$, salinitet (36 psu) og pH (8.4) var lik gjennom hele forsøket og i alle replikatene.



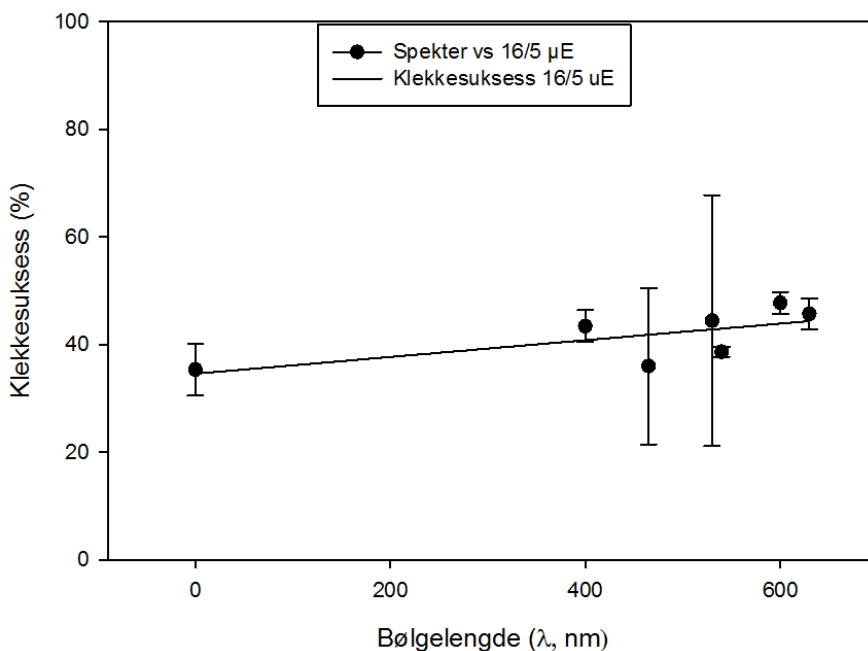
Figur. 12: Klekkesuksess for *A. tonsa*-egg i $1 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ lysintensitet, lagret i en måned. Punktene er fra venstre: Mørk (0), UV (400 nm), Blå (465 nm), Grønn (530 nm), Kald Hvit (540 nm), Varm Hvit (600 nm) og Rød (630 nm). Gjennomsnitt over 3 replikater \pm SE.

Fig. 13 viser klekkesuksessen for *A.tonsa*-egg klekket i $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ og $0.0016 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ i den mørke. Klekkesuksessen er vist med et gjennomsnitt av alle nauplii og uklekte egg med tre replikater i hvert punkt \pm standard error. Eggene var klekket i sjøvann med salinitet på 36 psu, pH: 8,4 og en temperatur på $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Gjennomsnittet til kald hvit ligger en del over de andre fargene i prosentvis klekkesuksess. Denne replikaten skiller seg ut fra alle de andre i intensitesførsøkene med å være 8 % høyere, dette mest sannsynligvis fordi denne inkuberingen ble gjort med bare 40 nauplii/egg totalt for replikatene. De andre fargene hadde et betydelig høyere snitt, med over 200 nauplii/egg i gjennomsnitt.



Figur. 13: Klekkesuksess for *A. tonsa*-egg i ulike bølgelengder i $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ lagret i en måned. Punktene er fra venstre: Mørk (0), UV (400 nm), Blå (465 nm), Grønn (530 nm), Kald Hvit (540 nm), Varm Hvit (600 nm) og Rød (630 nm). Gjennomsnitt over 3 replikater \pm SE.

Fig 14. viser klekkesuksessen for *A.tonsa*-egg klekket i $16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$, mens UV og rød hadde $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$. Diodeene for Rød og UV klarte ikke å levere høyere intensitet enn $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ uten å svikte. Klekketestene varierer mer siden antallet dyr og egg i prøvene varierte stort. Det det var markante variasjoner i inkuberingene for grønt og blått lys. De grønne og blå replikatene hadde under 40 levedyktige individer totalt i replikatene, der enkelte besto av 1-3 nauplii/egg. Mørk var i denne testen noe lavere enn replikatene i 1 og $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$. Eggene ble klekket i sjøvann med salinitet på 34 psu, pH 8,4 og en litt høyere temperatur på $25^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$. Temperaturen steg når intensiteten ble justert opp og diodeene genererte mer varme.



Figur. 14: Klekkesuksess for *A. tonsa*-egg i ulike bølgelengder i $16/5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ lagret i en måned. Punktene er fra venstre: Mørk (0), UV (400 nm), Blå (465 nm), Grønn (530 nm), Kald Hvit (540 nm), Varm Hvit (600 nm) og Rød (630 nm). Gjennomsnitt over 3 replikater \pm SE.

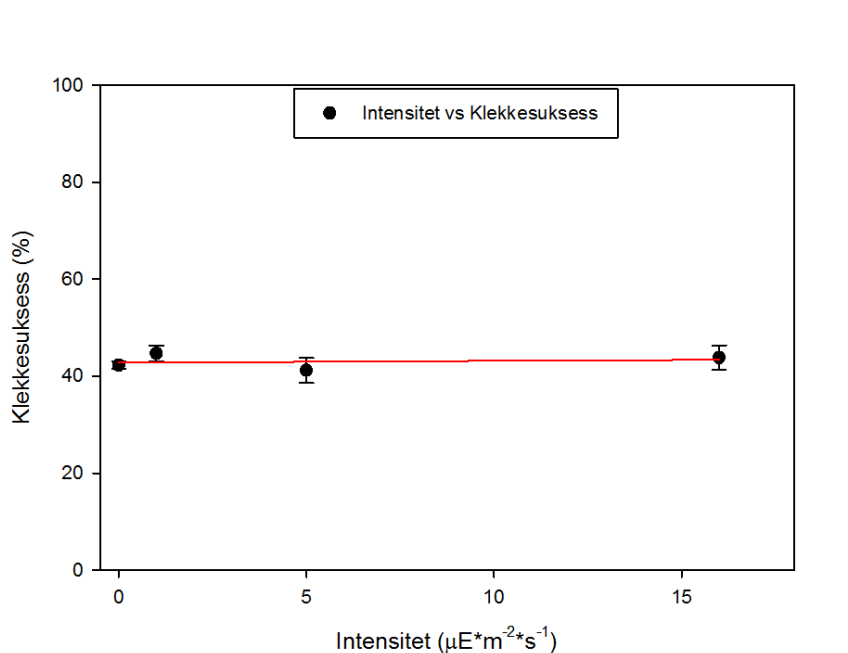
En ukjent mengde egg ble pipettert ut i totalt mørke og derfor varierer antallet i prøvene mye (Tab. 6). Ved den høyeste intensiteten var det et par replikater som ikke inneholdt egg eller nauplii, og noen replikater måtte forkastes på grunn av dårlig behandling. Det var ikke mulig å se om noen egg hadde blitt med i pipetten ved forsøksstart noe som gav et varierende antall dyr i prøvene.

Tabell. 6: Variasjoner i antallet fra prøvene i intensitetsforsøkene. Viser minste og høyeste antall med gjennomsnittet i parentes.

Prøve	Variasjon av Antall egg (Gjennomsnitt)	Variasjon av Antall nauplii (Gjennomsnitt)
$1 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	38-250 (95)	22-256 (78)
$5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	8-198 (61)	10-153 (43)
$16/5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0-266 (36)	0-135 (24)

Ved å teste klekkesuksessen i de tre inkubasjonsforsøkene mot lysintensitetene i en ANOVA-test var det ingen signifikante forskjeller ($p = 0.75$). En ANOVA-test på klekkesuksessen mot bølgelengde ga ingen signifikante forskjeller ($p = 0.44$).

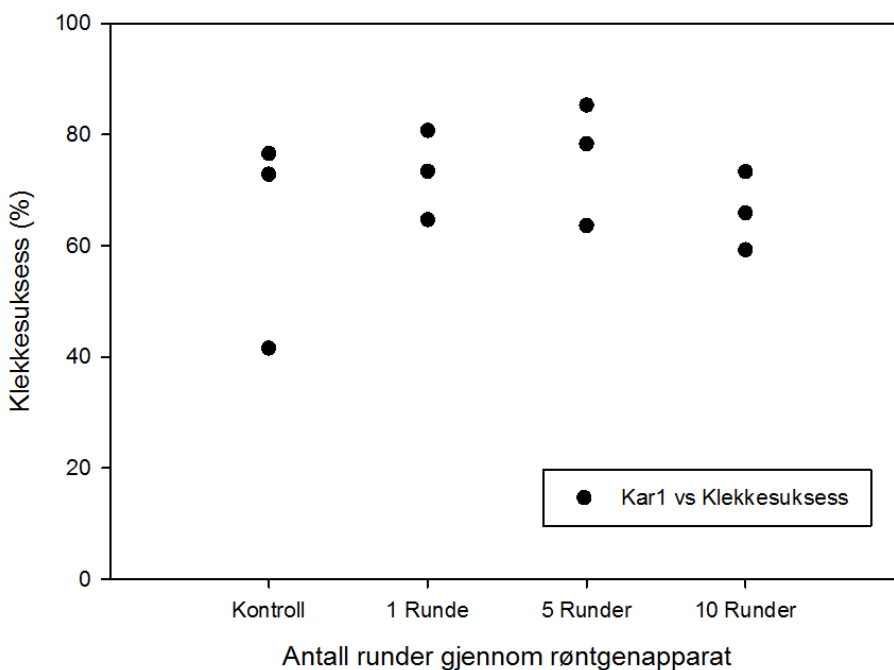
En oppsummering av grafene fra intensitetsforsøket (Fig. 15) som viser klekkesuksess som funksjon av intensitetene $0,0016 - 16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$. I hvert av punktene er alle bølgelengdene for hver intensitet inkludert med de mørke replikatene til venstre. Aksjonsspekterforsøket viste at bølgelengde ikke hadde betydning for klekkesuksess og er ekskludert i Fig. 15. Ingen av punktene skiller seg ut og klekkesuksessen var lik over intensitetene $0,0016 - 16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$.



Figur. 15: Responskurve for intensitet $0,0016 - 16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$. Klekkesuksess for *A. tonsa*-egg vist som et gjennomsnitt over alle bølgelengdene for hver intensitet \pm SE.

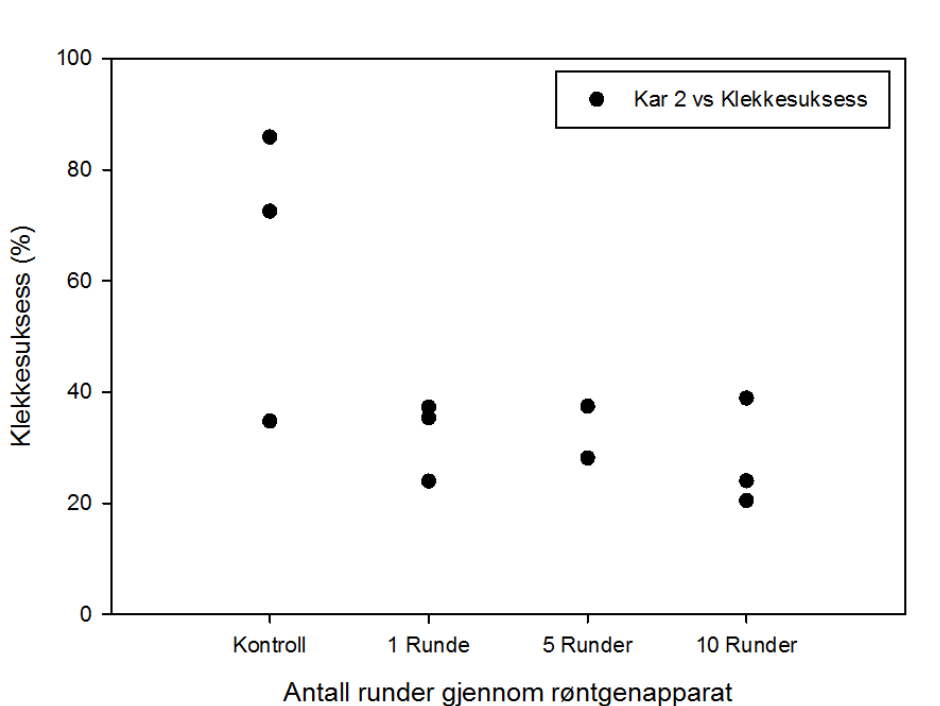
3.3 Effekt av røntgenstråling på klekkesuksess hos *A.tonsa*

Fig. 16 viser klekkesuksessen mot antall ganger gjennom et røntgenapparat, med egg fra kar 1. Klekkesuksessen viser en trend til ingen påvirkning fra røntgenstrålene. Variasjoner i miljøparametere mellom de tre karene copepodene ble dyrket i gjorde at resultatene ikke ble kombinert. Klekkesuksessen er vist som enkeltforsøk for å vise variasjonen og utliggere i enkelte replikater. Det var mange levedyktige egg og dyr i alle inkubasjonene, med et snitt på 94 nauplii og 44 uklekte egg for hvert punkt. Variasjonen var stor i alle replikatene, men det som skillte seg ut var kontrolltesten som hadde en replikat nede på 41.5 % klekkesuksess. De resterende klekkestestene viste et gjennomsnitt på $72.2 \% \pm 2.4 \text{ SE}$.



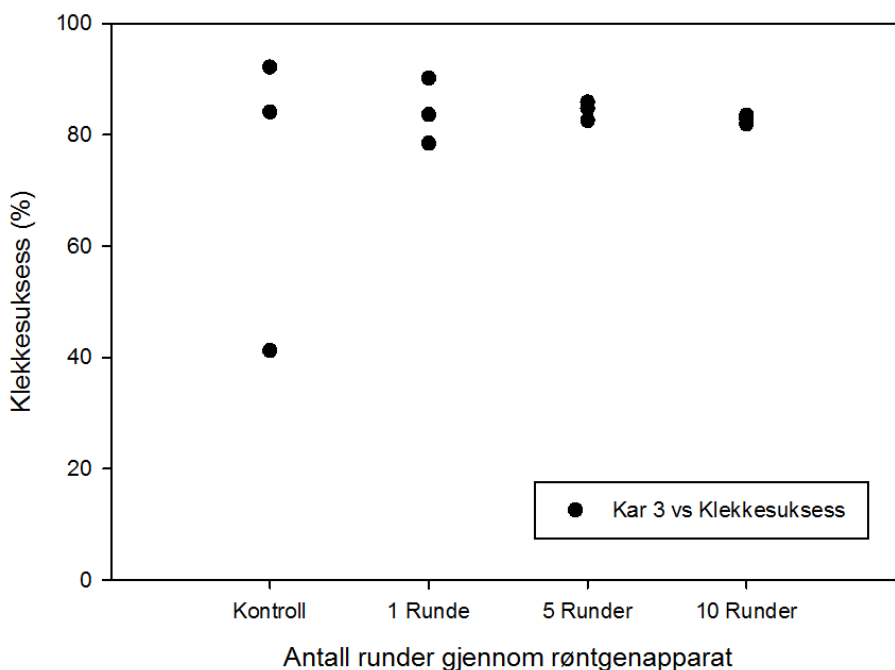
Figur. 16: Klekkesuksess for *A.tonsa*-egg kjørt gjennom røntgenmaskin for kar 1.

Fig. 17 viser klekkesuksessen som funksjon av antall runder gjennom røntgenapparatet, med egg fra kar 2. Klekkesuksessen er vist som enkeltforsøk for å vise variasjonen i enkelte inkubasjoner. Det var to klekketester som skiller seg ut fra de andre. Kontrollen viste to svært høyeverdier på 72,5 % og 86 %, som skiller seg ut fra det som ser ut å være "normalen", der trenden på klekkesuksessen viste ingen påvirkning fra røntgenstråler. Ser en bort ifra utliggerene viste de resterende klekketestene hadde et gjennomsnitt på 31 % \pm 2.3 SE klekkesuksess. Antallet i alle replikatene var høyt med et snitt på 80 nauplii og 131 uklekte egg. Klekketestene generelt varierer mindre enn klekkesuksessen fra kar 1. I klekketesten for 5 runder manglet en replikat (Se Vedlegg Tab. 9).



Figur. 17: Klekkesuksess for *A. tonsa*-egg fra kar 2 kjørt gjennom røntgenmaskin.

Fig. 18 viser klekkesuksessen som funksjon av antall runder i røntgenapparat, med egg fra kar 3. Variasjonen var mindre i forhold til de to første karene og variasjonen var størst i kontroll. Kontrollreplikatene hadde en verdi nede på 41 %, men trenden var som de andre karene at små doser røntgen ikke påvirker klekkesuksess. De resterende klekkesuksessene hadde et gjennomsnitt på $84.5 \% \pm 1.1$ SE klekkesuksess. Dette karet hadde den høyeste klekkesuksessen av de tre karene og replikatene hadde et gjennomsnitt på 134 nauplii og 40 uklekte egg.



Figur. 18: Klekkesuksess for *A.tonsa*-egg fra kar 3 kjørt gjennom røntgenmaskin.

Ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom klekkesuksess i de tre karene som funksjon av antall ganger prøvene ble kjørt gjennom et røntgenapparat i en ANOVA-test ($p = 0.62$).

4 Diskusjon

Denne oppgaven omfatter tre forsøk gjort på den calanoide copepoden *A. tonsa*. De to første forsøkene tok for seg klekkesuksess av *A. tonsa*-egg i ulike bølgelengde og intensitet til synlig lys og UVA. Det tredje forsøket så på effekten av svak røntgenstråling på eggenes klekkesuksess. For å bestemme påvirkningen på klekkesuksessen ble forsøkene gjort på ferske og lagrede egg over en 48 timers klekkeperiode. Forsøkene viste at verken bølgelengde, lysintensitet eller eksponering for røntgen hadde noen påvirkning på klekkesuksessen til levedyktige egg. Eggene kan klekkes i mørke eller lys og de kan sendes gjennom røntgenapparater på flyplasser uten at det påvirker andelen egg som klekkes.

4.1 Aksjonsspekter

Aksjonsspekteret viser tydelig at *A. tonsa* ikke påvirkes av ulike bølgelengder på lyset når de klekkes. Mørkeforsøkene ble inkludert i grafene for å vise at *A. tonsa*-egg klekker like godt i total mørke som når de belyses. Ulike bølgelengder over en 48 timers klekkeperiode er ikke en faktor for klekkesuksess. Selv om klekkesuksessen var lav etter en og tre måneders lagring, viser klekkestestene at bølgelengde ikke har noen påvirkning på lagrede egg over en 48 timers klekkeperiode.

Lys har vist seg å være viktig for atferden til mange ulike krepsdyr. Hos *Artemia* påvirker både bølgelengde og intensitet klekkesuksessen (Linden et al., 1985). *Artemia* klekker bedre med lys innenfor bølgelengdene fra 400 til 600 nm (Linden et al., 1985, 1986), noe som ikke kan observeres i forsøkene gjort på *A. tonsa* i min oppgave. Siden eggene til *A. tonsa* i kystsoner og estuarier legges i vannsøylen og synker, havner eggene ofte i mudder. Estuarier og kystsoner er områder med mer varierende lyspenetrasjon i vannsøylen som følge av høyere biologisk aktivitet og erosjon enn i åpne havområder. Lyspeabsorpsjonen kan være høy i store deler av året. Siden tilgjengelig lys for eggene kan være varierende er det naturlig at spesifikke bølgelengder ikke påvirker klekkesuksess.

Forsøkene med egg lagret i en måned mangler en replikat innenfor blå, rød, varm hvit og UV, og dette kan ha hatt en betydning for resultatene. Men da antall nauplii/egg var jevnt i antall mellom de ulike forsøkskammerene,

er dette lite sannsynlig. For å unngå noen form for lyspåvirkning ble alle lysforsøkene igangsatt i mørket. Denne prosedyren gjorde det vanskelig å se selve pipettetuppen og petriskålen der eggene skulle legges. At forsøket ble satt igang i mørket gjorde det umulig å si om egg hadde blitt med i petriskålen eller ikke. Et annet problem var at en del av eggene klumpet seg sammen. Når en ukjent mengde egg ble pipettert ut var det usikkert om det var klumper av egg eller ikke. Denne klumpingen ble og observert av Hagemann (2011) i sin studie på egg lagret i konstant lys. Bedre vask av eggene under høsting kunne redusert problemet. Eggene i min studie ble derimot ikke lagret i konstant lys. Når eggene skal telles etter endt klekking gjør denne klumpingen at det blir vanskelig å se om eggene er levedyktige eller ikke. For resultatene kan det ha latt seg løse ved å pipettere ut enkeltegg, men det er en tidskrevende prosess som blir vanskelig når det skal gjøres i mørket og med mange replikater. En kraftigere mekanisk omrøring av plastikkprøvebeholderene kunne ha løst opp disse grupperingene. Noen av replikatene var lave på antall dyr og egg, som trolig skyldes treg pipettering ut fra plasikkprøvebeholderene. Siden eggene synker vil andelen egg innenfor rekkevidden til pipetten minke over tid. Desto lengre en venter før en pipetterer, desto færre egg blir med i petriskålen.

Det faktum at eggene viste lav klekking etter en og tre måneder lagring kan bety at eggene ikke var rensset godt nok før lagring. Det biologiske materialet som ikke vaskes ut er med på å ernære bakterier som produserer H_2S , som er en svært giftig gass. Dette er en gass som lett kan gjenkjennes med lukt av ”råttent egg”. I forsøkene gjort på en og tre måneder lagrede egg var det en sterk eim av ”råttent egg” når beholderene ble åpnet og det kan tenkes at dette har tatt livet en stor andel av eggene. Ved økende lengde på lagringstiden sammen med eksponering for H_2S synker klekkesuksessen hos *A. tonsa* (Invidia et al., 2004; Nielsen et al., 2006).

Lite er kjent om utviklingen av pigmenter og til utviklingen av synet hos *A. tonsa*. I et forsøk gjort av Stearns and Forward (1984) viste de at voksne *A. tonsa* var sensitive for lys helt ned til $2.8pE * m^{-2} * s^{-1}$, med den sterkeste sensitiviteten for lys med bølgelengde mellom 453 og 620 nm. Dette var intensiteter mye lavere enn i mine forsøk, der selv det mørke kammeret hadde høyere verdier enn dette. Eggene kan da ha fått den ”dosen” de trenger av lys for å indusere klekking før forsøket startet. I den mørke beholderen var det en lysintensitet på $0,0016 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$, som tilsvarer

$1,6 \text{ nE} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ som er 10^3 høyere enn det Stearns and Forward (1984) målte sensitiviteten til. Dersom en og ser på spekteret fra diodene i Fig. 10 hadde de hvite diodene et stort spekter og dekket godt inn i det røde, litt over i infrarødt område (over 700 nm) og nesten helt ned til UV. De hvite diodene dekket da hele det sensitive området for voksne *A. tonsa*. Det var bare Rød (630 nm) og UV (400 nm) som lå utenfor det sensitive området Stearns and Forward (1984) så i sine forsøk. Hvis denne sensitiviteten hadde vært å finne i eggene til *A. tonsa* ville en mest sannsynlig sett større utslag på de røde klekkestestene, som var bølgelengdene Stearns and Forward (1984) noterte seg de største forskjellene til voksne *A. tonsa*. Fra et kultiveringsperspektiv vil ikke bølgelengde ha en innvikning på klekkesuksess. Andre miljøvariabler som vannets pH, salinitet, oksygen og temperatur vil ha større innflytelse.

Resultatene i intensitetsforsøkene ble og testet om bølgelengde har en effekt på klekkesuksess. Ved å gjøre en ANOVA ga det ikke signifikante forskjeller ($p = 0.44$). Dette er med på å støtte opp under resultatene rundt aksjonsspekteret at bølgelengde ikke påvirker klekkesuksess.

4.2 Intensitet

Intensitetsforsøkene viste at det ikke var noen forskjell på hvilken styrke en klekker eggene på fra $0,0016 - 16 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$ (Fig. 15). Siden diodene verken tålte høyere intensiteter eller klarte å levere et stabilt lys på lavere intensitet, ble ikke testvariansen stor på forsøkene som hadde belysning. Etersom forsøkene i mørket leverte like gode klekkesultater kan en anta like god klekking i hele intensitetsspennet $0,0016 - 16 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$. Med økende intensitet ble temperaturen inne i kammerene gradvis økende, og med dette forsøksoppsettet (Fig. 6) hadde det ikke fungert å gjøre forsøk ved høyere intensitet. Temperaturforskjellene i forsøket varierer imidlertid ikke nok til å kunne utgjøre en forskjell, og lå innenfor den ideelle klekketemperaturen hos *A. tonsa*. I forsøk presentert av andre har $23 - 25^\circ\text{C}$ vært temperaturene med best eggproduksjon og klekkesuksess (Castro-Longoria, 2003; Chinnery and Williams, 2004; Holste and Peck, 2006).

Generell innendørsbelysning er ikke særlig sterk med tanke på intensitet. Typiske verdier for et kontor er $5 - 10 \mu\text{E} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$, mens intensitetene

som ble testet i denne oppgaven er verdier typisk for dybder på 20-30 meter (Davis, 1993).

Selv om intensiteten hos UV (400 nm) og Rød (630 nm) bare var $5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ i forsøket med den høyeste intensiteten, var det ingen av bølgelengdene med høyere intensitet som skiller seg ut på $16 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$. Lite tyder da på at forskjeller skulle fremkommet av økt intensitet i Rød eller UV. Både Rød og UV ligger utenfor det Stearns and Forward (1984) målte den høyeste sensitiviteten for hos voksne *A. tonsa*. UV og rødt lys blir raskere absorbert i vannsøylen og vil være lite tilgjengelig på dypere vann (University, 2006). Derfor vil høy intensitet over lengre tid fra bølgelengdene som blir raskt absorbert i vannsøylen være en høyst usannsynlig miljøparameter for å indusere klekking i eggene.

Lysintensitet er vist å ha en innvirkning på klekkesuksess hos *Artemia* (Linden et al., 1985), men i forsøkene gjort på *A. tonsa* ser det ikke slik ut (Fig. 15). Linden et al. (1985, 1986) så store forskjeller i klekkesuksess fra $0 - 5 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$, ved at *Artemia* klekket like godt på lav intensitet over lengre periode som høy intensitet over en kort periode. I mine forsøket ble bare en 48 timers klekkesuksess evaluert, der ingen forskjeller ble observert. Ettersom den mørke replikaten ga like god klekkesuksess med $0,0016 \mu E * m^{-2} * s^{-1}$ over 48 timer er ikke lysintensitet er en miljøvariabel en trenger å ta hensyn til i intensiv kultivering av *A. tonsa*. Hvis et glimt fra en bølgelengde innen synlig lys er det som skal til for å indusere klekking kan dette oppnås selv i mørket.

4.3 Røntgen

Tanken bak røntgenforsøket var å se om røntgenbølgene som gjennomlyser bagage på flyplasser tar livet av *A. tonsa*-egg. Apparatene har en veldig lav strålingsdose ($1.8 \mu Sv$) og eggene blir bestrålt i bare noen sekunder av gangen. En flytur vil gi høyere strålingsdoser enn røntgenapparatet, der en reise fra Paris til Washington vil gi en ståligsdose på omkring $43 \mu Sv$ (Lantos et al., 2001)

Fig.16 - 18 viser at kontrollreplikaten var prøvene som sprikte mest i prosentvis klekkesuksess. Siden disse eggene ikke var med på transporten (1 time biltur) og ikke ble håndtert på samme måte, har de ikke fått den samme

mekaniske omrøringen som gruppene utsatt for røntgen. Kontrollgruppen som sto igjen i kjøleskapet på NTNU burde også vært med på transporten (1 time biltur) til Værnes for at eggene skulle ha hatt samme behandling. Eggene som var med til Værnes kan og ha blitt eksponert for høyere temperatur i forhold til de som sto igjen i kjøleskapet (kontroll). Det ble ikke målt temperatur i beholderen til eggene fraktet til Værnes. I studien gjort av Hagemann (2011) var korte intervaller (12 - 24 timer) med høyere temperaturer (17°C) under lagring ikke utslagsgivende for klekkesuksessen. En times eksponering med forhøyet temperatur i mitt forsøk har da mest sannsynlig ikke vært utslagsgivende.

Klekkesuksessen i kar 2 (Fig. 16) var betydelig lavere enn kar 1 og 3 og var omtrent 30 - 40% lavere enn kar 1 (Fig. 15) og kar 3 (Fig. 17). Det kan fortelle oss at forholdene ikke var optimale for copepodene i kar 2. I et forsøk gjort av Peck et al. (2008) så de signifikante forskjeller på klekkesuksessen i egg lagt under ulike lysperioder av voksne *A. tonsa*. Desto lengre lysperioden var for de voksne dyrene desto bedre var klekkesuksessen for eggene og indikerte at dvale kunne induseres i eggene ved å manipulere lyforholdene til voksne *A. tonsa*. I denne oppgaven ble de voksne dyrene eksponert for konstant belysning (24 timers lysperiode) og en kan da forvente bare SE (subetaneous egg). Det kan ha vært problemer med fôrtilgang for de voksne *A. tonsa* dyrene i karet, som er kjent fra andre studier å produsere DHE (delayed hatching eggs) ved lav fortilgang (Drillet et al., 2011). Med en forlenget klekkeperiode kunne det vært undersøkt om eggene var DHE eller om de ikke var levedyktige. I klekkeforsøkene på ferske egg i denne oppgaven lå klekkesuksessen på 70-90 %, noe en skal kunne forvente fra subitaneous egg ut fra arbeid gjort av andre (Nielsen et al., 2006; Peck and Holste, 2006; Peck et al., 2008; Zhang et al., 2014).

I forsøk gjort på voksne *Artemia* viser dyrene en sterkt tåleevne for ioniserende stråler som røntgen (Grosch and Erdman, 1955). Insekter er en annen gruppe der mange av ordnene er svært resistente mot røntgenstråling (Koval, 1983). Uklekte *A. tonsa* er beskyttet av et sterkt skall (chorion). Dette ytre skallet kan være med på å beskytte copepodene under ioniserende stråling. Det ytre skallet har mange små utstikkene pigger (Marcus, 1990; Belmonte, 1998), som kan være sårbare punkter for mekanisk omrøring, men tendens til mekanisk påkjenning kunne leses ut fra klekkesuksessen i mine forsøk.

4.4 Konklusjon og anbefalinger for videre arbeid

De ferske eggene klekker godt i mørke og under ulike bølgelengder av synlig lys. Egg som enten var lagret i en eller tre måneder hadde en unormalt lav klekkesuksess. Derimot viste resultatene fra klekkeforsøkene i mørket, over ulike bølgelengder og intensiteter av synlig lys, ingen forskjell. Dette viser at *A. tonsa*-egg er uavhengig av lys for å indusere klekking. *A. tonsa*-egg ble utsatt for korte små doser røntgenstråler uten at det gir utslag på klekkingen. Eggene kan uten negative effekt på klekkesuksess sendes gjennom sikkerhetskontroller på flyplasser.

Hvis det er ønske om å redusere klekketiden kan de samme forsøkene med bølgelengde og intensitetsforsøk gjøres over kortere tidsperioder. En klekketidsstudie for å evaluere om bølgelengde og intensitet påvirker tiden det tar for å klekke eggene kan være av interesse.

Det har vært mange studier rundt hvordan en skal lagre *A. tonsa* når det gjelder temperatur og salinitet for å få best klekkesuksess etter endt lagring. I intensiv kultivering er det viktig å kunne ha en stabil klekking når det er behov for egg. Ut ifra klekkesuksessen i denne studien trenger en mer informasjon om hvordan en skal lagre eggene. Studier rundt lagringsbeholdere, tetthet og vasking av egg er nødvendig for å stabilisere klekkingen.

For å være sikre på at frakt av egg ikke har en effekt på klekkesuksess kan studier rundt eksponering for røntgen for så å lagre eggene utføres. Siden selve flyturen har større strålingsdoser enn sikkerhetskontollen, kan studier på effekt av flytur være interessant. Det er og en fysisk påvirkning på eggene ved frakt som kan være med på å skade eggene under frakt. Forsøk med mekanisk påvirkning kan da undersøkes.

I arbeidet med denne masteren ble og et større forsøk rundt redokspotensial i vannet forsøkt. Dette ble ikke inkludert, men siden eggene akkumuleres i mudder på bunnen når de synker ned blir det en brå overgang til lavere oksygen og redoks. I mudderet er redokspotensialet veldig lavt (typisk -200 til -400 mV). I beholderene eggene lagres i synker og redokspotensialet raskt når oksygenet er brukt opp og H_2S tar over. Studier rundt redoks og H_2S kan være noe å se nærmere på.

Referanser

- Adamczewski, I. (1965). Ionization and conductivity of liquid dielectric.
- Aglintzev, K. (1961). Ionizing radiation dosimetr.
- Bellantoni, D. C. and W. T. Peterson (1987). Temporal variability in egg production rates of *acartia tonsa dana* in long island sound. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107(3), 199–208.
- Belmonte, G. (1998). The egg morphology of 7 acartiidae species: a preliminary survey of the ootaxonomy of calanoids. *Journal of Marine Systems* 15(1–4), 35 – 39.
- Båmstedt, U. (1986). Chemical composition and energy content. *The biological chemistry of marine copepods*. Clarendon Press, Oxford, 1–58.
- Castro-Longoria, E. (2003). Egg production and hatching success of four acartia species under different temperature and salinity regimes. *Journal of Crustacean Biology* 23(2), 289–299.
- Chen, F. and N. H. Marcus (1997). Subitaneous, diapause, and delayed-hatching eggs of planktonic copepods from the northern gulf of mexico: morphology and hatching success. *Marine Biology* 127(4), 587–597.
- Chinnery, F. E. and J. A. Williams (2004). The influence of temperature and salinity on acartia (copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine biology* 145(4), 733–738. Date revised - 2006-01-01 SuppNotes - Physical medium: Printed matter Last updated - 2011-12-13 SubjectsTermNotLitGenreText - *Acartia bifilosa*; *Acartia clausi*; *Acartia discaudata*; *Acartia tonsa*; ANE, British Isles, England, Hampshire, Southampton; Temperature effects; Salinity effects; Survival; Nauplii; Seasonal variations; Hatching; Statistical analysis; Oogenesis; Experimental research; Marine.
- Ciborowski, S. (1962). Radiation chemistry of non organic compounds.
- Conceição, L. E. C., M. Yúfera, P. Makridis, S. Morais, and M. T. Dinis (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research* 41(5), 613–640.

- Dam, H., W. Peterson, and D. Bellantoni (1994). Seasonal feeding and fecundity of the calanoid copepod *acartia tonsa* in long island sound: is omnivory important to egg production? *Hydrobiologia* 292-293(1), 191–199.
- Davis, C. S. (1993). Laboratory rearing of marine calanoid copepods. *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 71(2), 119–133.
- Doi, M., J. Toledo, M. Golez, M. de los Santos, and A. Ohno (1997). Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiologia* 358(1-3), 259–263.
- Drillet, G. (2010). Copepods and their resting eggs, a potential source of nauplii for aquaculture.
- Drillet, G., B. W. Hansen, and T. Kiørboe (2011). Resting egg production induced by food limitation in the calanoid copepod *acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography* 56(6), 2064.
- Evjemo, J. and Y. Olsen (1997). Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. *Hydrobiologia* 358(1-3), 159–162.
- Evjemo, J. O., K. I. Reitan, and Y. Olsen (2003). Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*hippoglossus hippoglossus* l.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227(1), 191–210.
- Grosch, D. S. and H. E. Erdman (1955). X-ray effects on adult artemia. *The Biological Bulletin* 108(3), 277–282.
- Hagemann, A. (2011). Cold storage of eggs of *acartia tonsa* dana: effects of light, salinity and short-term temperature elevation on 48-h egg hatching success.
- Hamre, K. (2006). Nutrition in cod (*gadus morhua*) larvae and juveniles. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 63(2), 267–274.
- Heinle, D. (1966). Production of a calanoid copepod, *acartia tonsa*, in the patuxent river estuary. *Chesapeake Science* 7(2), 59–74.

- Holste, L. and M. Peck (2006). The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of baltic acartia tonsa (copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Marine Biology* 148(5), 1061–1070.
- Imslund, A. K., A. Foss, R. Koedijk, A. Folkvord, S. O. Stefansson, and T. M. Jonassen (2006). Short- and long-term differences in growth, feed conversion efficiency and deformities in juvenile atlantic cod (gadus morhua) started on rotifers or zooplankton. *Aquaculture Research* 37(10), 1015–1027.
- Invidia, M., S. Sei, and G. Gorbi (2004). Survival of the copepod acartia tonsa following egg exposure to near anoxia and to sulfide at different ph values. *Marine Ecology Progress Series* 276(1), 187–196.
- Jaeger, R. G. and H. Behnken (1959). *Dosimetrie und Strahlenschutz: physikalische und technische Daten*. Thieme.
- Karanas, J. J., H. Van Dyke, and R. C. Worrest (1979). Midultraviolet (uv-b) sensitivity of acartia clausii giesbrecht (copepoda). *Limnol. Oceanogr* 24(6), 1104–1116.
- Karanas, J. J., R. C. Worrest, and H. Dyke (1981). Impact of uv-b radiation on the fecundity of the copepod acartia clausii. *Marine Biology* 65(2), 125–133.
- Katajisto, T. (2006). Benthic resting eggs in the life cycles of calanoid copepods in the northern baltic sea. *biologia* 320, 153–159.
- Kioerboe, T., P. Munk, and J. G. Stoettrup (1985). First feeding by larval herring clupea harengus l. *Dana. Charlottenlund* 5, 95–107.
- Koval, T. M. (1983). Intrinsic resistance to the lethal effects of x-irradiation in insect and arachnid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(15), 4752–4755.
- Lantos, P., N. Fuller, and J. Bottollier-Depois (2001). Monitoring radiation doses received by air crews. In *Proceedings of ICRC*, Volume 2001.
- Linden, A., I. Vankerckhoven, R. Caubergs, and W. Decler (1986). Action spectroscopy of light-induced hatching of artemia cysts (branchiopoda: Crustacea). *Marine Biology* 91(2), 239–243.

- Linden, A. D., R. Blust, and W. Declair (1985). The influence of light on the hatching of artemia cysts (anostraca: Branchiopoda: Crustacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 92(2-3), 207–214.
- Madronich, S., R. L. McKenzie, and M. M. Caldwell (1995). Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio* 24(3), 143–52.
- Marcus, N. H. (1990). Calanoid copepod, cladoceran, and rotifer eggs in sea-bottom sediments of northern californian coastal waters: Identification, occurrence and hatching. *Marine Biology* 105(3), 413–418.
- Mauchline, J. (1998). *Advances in marine biology*. Academic Press.
- Miller, C. B., J. K. Johnson, and D. R. Heinle (1977). Growth rules in the marine copepod genus acartia.
- Montecino, V. and G. Pizarro (1995). Phytoplankton acclimation and spectral penetration of uv irradiance off the central chilean coast. *Oceanographic Literature Review* 42(12).
- Naganuma, T., T. Inoue, and S. Uye (1997). Photoreactivation of uv-induced damage to embryos of a planktonic copepod. *Journal of Plankton Research* 19(6), 783–787.
- Nielsen, P., J. Mortensen, B. Vismann, and B. W. Hansen (2006). Physiological tolerance of marine calanoid copepod eggs to sulphide. *MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES-* 328, 171.
- Næss, T. and . Lie (1998). A sensitive period during first feeding for the determination of pigmentation pattern in atlantic halibut, hippoglossus hippoglossus l., juveniles: the role of diet. *Aquaculture Research* 29(12), 925–934.
- Payne, M. F. and R. J. Rippingale (2000). Rearing west australian seahorse, hippocampus subelongatus, juveniles on copepod nauplii and enriched artemia. *Aquaculture* 188(3–4), 353–361.
- Peck, M. A., B. Ewest, L. Holste, P. Kanstinger, and M. Martin (2008). Impacts of light regime on egg harvests and 48-h egg hatching success of *i* acartia tonsa*i* (copepoda: Calanoida) within intensive culture. *Aquaculture* 275(1), 102–107.

- Peck, M. A. and L. Holste (2006). Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *acartia tonsa* (calanoida: Copepoda): Optimizing intensive cultures. *Aquaculture* 255(1-4), 341–350. Date revised - 2006-09-01 Last updated - 2011-12-13 SubjectsTermNotLitGenreText - Calanoida; Acartia tonsa; Photoperiods; Salinity effects; Intensive culture; Stocking density; Marine crustaceans; Fecundity; Breeding success; Crustacean culture; Food organisms; Fish culture; Marine.
- Popov, N.I., F. K. and V. Orlov (1979). Sea water.
- Rainuzzo, J. R., K. I. Reitan, and L. Jørgensen (1992). Comparative study on the fatty acid and lipid composition of four marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 103(1), 21–26.
- Rainuzzo, J. R., K. I. Reitan, and Y. Olsen (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155(1-4), 105–118.
- Saito, H. and S. Taguchi (2003). Influence of uvb radiation on hatching success of marine copepod *paracalanus parvus* s. l. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 282(1–2), 135–147.
- Sargent, J., L. McEvoy, and J. Bell (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155(1), 117–127.
- Segelstein, D. J. (1981). *The complex refractive index of water*. Ph. D. thesis.
- Shields, R. J., J. G. Bell, F. S. Luizi, B. Gara, N. R. Bromage, and J. R. Sargent (1999). Natural copepods are superior to enriched artemia nauplii as feed for halibut larvae (*hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *The Journal of nutrition* 129(6), 1186–1194.
- Sorgeloos, P., P. Dhert, and P. Candreva (2001). Use of the brine shrimp, *artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200(1–2), 147–159.

- Stearns, D. E. and J. Forward, R. B. (1984). Photosensitivity of the calanoid copepod *acartia tonsa*. *Marine Biology* 82(1), 85–89.
- Støttrup, J. and L. McEvoy (2008). *Live feeds in marine aquaculture*. John Wiley and Sons.
- Støttrup, J. and N. Norsker (1997). Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture* 155(1), 231–247.
- Støttrup, J. G. (2000). The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research* 31(8-9), 703–711.
- Støttrup, J. G., K. Richardson, E. Kirkegaard, and N. J. Pihl (1986). The cultivation of *acartia tonsa* dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture* 52(2), 87–96.
- Sullivan, B. K., J. H. Costello, and D. Van Keuren (2007). Seasonality of the copepods *acartia hudsonica* and *acartia tonsa* in Narragansett Bay, RI, USA during a period of climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73(1), 259–267.
- University, M. (2006). *Optical Propagation in Linear Media : Atmospheric Gases and Particles, Solid-State Components, and Water: Atmospheric Gases and Particles, Solid-State Components, and Water*. Oxford University Press, USA.
- Uye, S.-i. (1985). Resting egg production as a life history strategy of marine planktonic copepods. *Bulletin of Marine Science* 37(2), 440–449.
- Van der Linden, A., I. Vankerckhoven, R. Caubergs, and W. Declair (1986). Action spectroscopy of light-induced hatching of *artemia* cysts (branchiopoda: Crustacea). *Marine Biology* 91(2), 239–243.
- Wozniak, B. and J. Dera (2007). *Light absorption in sea water*, Volume 33. Springer.
- Zhang, J., A. Ianora, C. Wu, D. Pellegrini, F. Esposito, and I. Buttino (2014). How to increase productivity of the copepod *acartia tonsa* (dana): effects of population density and food concentration. *Aquaculture Research*.

5 Vedlegg

Tabell. 7: Viser klekkesusess for aksjonsspekterforsøket med klekkesuksess, STDEV, SE for hver farge

FARGE	Spekter(nm)	Ferske egg	STDEV	SE	1 Måned	STDEV	SE	3 Måneder	STDEV	SE	
Svart	0	87.88	4.9771	2.87353	46.03	5.711	3.297247	14.36	2.751	1.588291	
	350										
	355										
	360										
	365										
	370										
	375										
	380										
	385										
	390										
395											
UV	400	87.72	4.0493	2.337864	39.84	12.268	7.082933	19.14	2.6819	1.548396	
	405										
	410										
	415										
	420										
	425										
	430										
	435										
	440										
	445										
450											
455											
460											
Blå	465	88.92	7.0663	4.07973	45.05	0	0	16.62	1.3688	0.790277	
	470										
	475										
	480										
	485										
	490										
	495										
	500										
	505										
	510										
515											
520											
525											
Grønn	530	89.71	1.3095	0.75604	48.68	3.5716	2.062064	19.75	8.4054	4.85286	
	535										
Kald Hvit	540	92	0.923	0.532894	47.31	0.8127	0.469213	15.22	2.393	1.381599	
	545										
550											
555											
560											
565											
570											
575											
580											
585											
590											
595											
Varm Hvit	600	90.32	0.9664	0.557951	40.22	8.3212	4.804247	17.15	1.3135	0.75835	
	605										
	610										
	615										
	620										
	625										
Rød	630	92.56	0.9088	0.524696	42.59	10.0362	5.794403	13.91	2.9969	1.730261	
	635										
	640										
	645										
	650										

Tabell. 8: Viser klekkesusess for intensitetsforsøket med klekkesuksess, STDEV og SE for hver farge

	Spekter	µE	STDEV	SE	5 µE	STDEV	SE	16/5 µE	STDEV	SE
Svart	0	46.02564	5.710999	3.2972467	43.65672	6.043946	3.489474	35.33191	8.335877	4.812721
	350									
	355									
	360									
	365									
	370									
	375									
	380									
	385									
	390									
	395									
UV	400	39.84375	12.26805	7.0829604	39.23445	5.727508	3.306779	43.43434	5.120187	2.956141
	405									
	410									
	415									
	420									
	425									
	430									
	435									
	440									
	445									
	450									
	455									
	460									
Blå	465	45.05495	0	0	35.80247	2.931165	1.692309	36	25.16611	14.52966
	470									
	475									
	480									
	485									
	490									
	495									
	500									
	505									
	510									
	515									
	520									
	525									
Grønn	530	48.67925	3.571624	2.0620778	39.17526	4.817969	2.781656	44.44444	40.4061	23.32847
	535									
Kald Hvit	540	47.31495	0.812651	0.4691844	56.75676	1.654051	0.954967	38.65546	1.581332	0.912983
	545									
	550									
	555									
	560									
	565									
	570									
	575									
	580									
	585									
	590									
	595									
Varm Hvit	600	40.21739	8.32118	4.8042355	39.74895	1.99944	1.154377	47.7707	3.556183	2.053163
	605									
	610									
	615									
	620									
	625									
Rød	630	42.59259	10.03618	5.7943929	45.43568	4.802624	2.772796	45.68966	4.861359	2.806707
	635									
	640									
	645									
	650									
	655									

Tabell. 9: Viser klekkesusess for røntgenforsøket med klekkesuksess, nauplii, uklekte egg for de ulike karene og behandlingene

Prøve	Kar 1			Kar2			Kar 3		
	Nauplii	Egg	Klekkesuksess	Nauplii	Egg	Klekkesuksess	Nauplii	Egg	Klekkesuksess
Kontroll	72	22	76.5957	103	39	72.5352	151	215	41.2568
Kontroll	101	142	41.5638	85	14	85.8586	122	23	84.1379
Kontroll	94	35	72.8682	82	154	34.7458	59	5	92.1875
1 Runde	172	41	80.7512	101	170	37.2694	230	25	90.1961
1 Runde	105	38	73.4266	70	128	35.3535	95	26	78.5124
1 Runde	66	36	64.7059	23	73	23.9583	92	18	83.6364
5 Runder	93	16	85.3211	164	274	37.4429	166	35	82.5871
5 Runder	77	44	63.6364	X	X	X	273	49	84.7826
5 Runder	76	21	78.3505	45	115	28.125	67	11	85.8974
10 Runder	89	46	65.9259	140	220	38.8889	132	26	83.5443
10 Runder	67	46	59.292	36	140	20.4545	109	24	81.9549
10 Runder	121	44	73.3333	37	117	24.026	116	24	82.8571