

Udvikling af saltvandtolerance hos snæblen
(*Coregonus oxyrhynchus*)



Cand. Scient. specialerapport

af

Dennis Søndergård Thomsen

Vejledere: Steffen S. Madsen & Mads Ejbye-Ernst

Biologisk Institut, Syddansk Universitet, Odense

September 2003

Forord:

Denne rapport markerer afslutningen på mit speciale på Syddansk Universitet, Odense.

I den forbindelse vil jeg gerne takke Steffen S. Madsen og Mads Ejbye-Ernst for god vejledning og hjælp.

En særlig tak til Knud Rasmussen for uvurderlig vejledning i forbindelse med opdræt af snæbelynglen samt levering af heltyngel.

Stor tak til laborant Jytte Hansen for hjælp med diverse analyser samt pasning af snæblerne og for altid at være klar på en tur til kantinen efter kage.

Tak til Frontlab-holdet, Lars, Rikke, Mads, Henrik, Tips, Karsten og Pia for en dejlig tid rig på underholdning.

Tak til Ribe Amt og de ansatte der har været til stor hjælp undervejs, især Allan R. Jensen og Hans Torslund.

Tak til Erik Tveskov og Sønderjyllands Amt for assistance i forbindelse med elfiskeri i Rudbøl Sø.

Tak til Christian "Højben" Nielsen for korrekturlæsning og mange gode fisketure.

Tak til Ulrik Nørum for hjælp i forbindelse med statistikken.

Tak til Christian Hvidt, Bioconsult for lån af driftnet.

Tak til Bent Nielsen og Claus Matzen for hjælp med fodring.

Tak til min familie for deres støtte, og især min søster for med mantraet "du skal lave noget" at hjælpe mig til at bevare fokus.

Forsidefoto: snæbellarve og snæbelyngel (Dennis Thomsen, 2002)

Indholdsfortegnelse:

Resume.....	6
Summary.....	7
1. Introduktion.....	8
1.1 Osmoregulering.....	8
1.2 Osmoregulering i FV.....	8
1.2.1 Gællen.....	8
1.2.2 Iontransport i FV.....	9
1.2.3 Tarmen.....	10
1.2.4 Nyren og urinblæren.....	10
1.3 Osmoregulering i SV.....	10
1.3.1 Gællen.....	11
1.3.2 Iontransport i SV.....	11
1.3.3 Tarmen.....	12
1.3.4 Nyren og urinblæren.....	12
1.4 Osmoregulering i larver/yngel.....	12
1.5 Osmoregulerende proteiner.....	13
1.6 Snæblen.....	14
1.6.1 Klassifikation.....	14
1.6.2 Livscyklus.....	15
1.6.3 Historie.....	17
1.6.4 Udbredelse.....	18
1.6.5 Årsager til tilbagegang.....	19
1.7 Vadehavet.....	21
1.8 Formål.....	22
2. Materialer og metoder.....	23
2.1 Opstilling Syddansk Universitet.....	23
2.2 Elfiskeri i Gl. Varde Å.....	24
2.3 Produktion af yngel.....	24
2.3.1 Pleje af æg og yngel.....	24
2.3.2 Fodring.....	27
2.4 Feltforsøg.....	27

2.4.1 Driftnet Hjortvad Å.....	27
2.4.2 Vidåen/Rudbøl Sø.....	28
2.5 Laboratorieforsøg.....	28
2.5.1 Salinitetstest.....	28
2.5.2 Akklimeringsforsøg.....	31
2.6 Drikkerate.....	32
2.7 Immunohistokemisk farvning.....	33
2.8 RNA/Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	35
2.8.1 Northern blotting (mRNA analyse).....	36
2.8.2 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktivitet.....	37
2.9 Vækst.....	39
2.10 Statistik.....	39
3. Resultater.....	40
3.1 Vækst.....	40
3.2 Salinitetstest.....	42
3.3 Akklimeringsforsøg.....	55
3.4 Immunohistokemi.....	59
3.5 Drikkerate.....	65
3.6 RNA.....	66
3.7 Gælle Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktivitet.....	67
3.8 Feltforsøg.....	68
4. Diskussion.....	70
4.1 Salinitetstest.....	70
4.1.2 Miljøforhold i salinitetstest.....	72
4.1.3 SV-tolerance i andre arter.....	74
4.2 Akklimering.....	76
4.3 Immunohistokemi.....	77
4.4 Drikkerate.....	79
4.5 RNA/ Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	81
4.6 Feltforsøg.....	82
4.7 Perspektivering.....	83
5. Konklusion.....	85

Referencer.....	87
Appendiks I Undersøgelsesområde Hjortvad Å.....	92
Appendiks II Undersøgelsesområde Rudbøl Sø.....	93

Resume:

Snæblen (*Coregonus oxyrhynchus*) er en laksefisk hjemmehørende i Vadehavet. Igennem tiden er bestanden formindsket som følge af forringede levevilkår, således at snæblen idag betragtes som en truet art. Den største del af bestanden findes i den danske del af Vadehavet, mens der kun findes en spredt bestand i den tyske og hollandske del af Vadehavet. Der er kun en begrænset viden om snæblen, og man ved især meget lidt om snæblens tidlige livsstadier. Da snæblen gyder i ferskvand og har sin primære opvækst i saltvand, er det vigtigt at vide hvorledes snæblens overgang til saltvand foregår, og især ynglens størrelse.

Formålet med dette speciale har været at følge udviklingen i saltvandstolerance fra de tidlige larvestadier over metamorfosen og ind i yngelstadiet. Til dette er anvendt en række metoder der tester snæblens hypoosmoregulatoriske formåen.

Direkte overførsel af 0-4, 15-19 og 32-35 dage gamle snæbellarver til forskellige saliniteter viste at disse ikke var istand til at overleve saliniteter på 25 og 30 ppt, mens der for 0-4 dage gamle larver var en høj overlevelse ved 18 ppt, dog udviste de overlevende tegn på krise. Der var generelt høj overlevelse i ferskvand (FV) og ved 10 ppt. Samtidigt blev der målt kropsvandindhold (BWC) 4 og 24 timer efter overførsel for at se om snæbellarverne aktivt var istand til at hypoosmoregulere. Det viste sig at larverne ikke var istand til regulere BWC indenfor det målte tidsrum ved høje saliniteter. Ved direkte overførsel af 150-170 dage gammel snæbelyngel viste det sig, at overlevelsen var markant forbedret op til 25 ppt. Snæblerne var på dette tidspunkt metamorfoserede og overgået til yngelstadiet, hvilket indikerer en størrelsesafhængig saltvandstolerance. Denne tolerance blev yderligere bekræftet af akklimeringsforsøg med snæbler på larve- og yngelstadiet, hvor saliniteten blev gradvist hævet over tid. Snæbler på yngelstadiet udviste en klart bedre overlevelse ved høje saliniteter samt en bedre formåen til at regulere BWC.

Direkte overførsel af helt (*Coregonus lavaretus*) på larve- og yngelstadiet viste en øget overlevelse i saltvand (SV) fra larve til yngelstadiet. Dog var overlevelsen mindre for helt i forhold til snæblen, hvilket indikerer at helten er tilpasset et mindre salint miljø.

Immunohistokemiske farvninger for Na^+, K^+ -ATPase viste en øget mængde af dette enzym som følge af udvikling af gælleapparatet jo større snæblerne blev i FV. Dette har muligvis øget evnen til hypoosmoregulering i SV.

Målinger af drikkeraten hos 180-200 dage gammel snæbelyngel vha. ^{51}Cr -EDTA teknik viste et uventet højt vandindtag i ferskvand, men viste også at ynglen kunne øge drikkeraten ved højere saliniteter.

Hos snæbelyngel (7-9 cm) skete der en gradvis stigning i Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten 2, 7 og 10 dage efter overførsel til SV (25 ppt). Stigningen var dog kun signifikant forskellig fra FV efter 10 dage og kun som følge af et uventet fald i aktiviteten i FV kontrol fisk.

Driftnetfiskeri i Hjortvad Å påviste ingen driftende snæbellarver omkring det forventede klækketidspunkt, mens elektrofiskeri i Rudbøl Sø d. 22/5 2002 resulterede i fangst af to stk. snæbelyngel på 37-41 mm.

Sammenholdt med tidligere observationer giver dette en indikation om, at snæbelynglen har en vis opholdstid i FV inden udtrækket til Vadehavet, og dette understøttes af laboratorieforsøgene, der indikerer en størrelsesafhængig saltvandstolerance, der nødvendiggør et ophold i FV indtil den rette størrelse opnås.

Summary: The development of salinity tolerance in Houting (*Coregonus oxyrhynchus*)

The Houting (*Coregonus oxyrhynchus*) is a salmonid teleost found in the Wadden Sea. Through time the population has been diminished as a result of poor habitat conditions, and the houting is now considered an endangered species. The larger part of the population is found in the Danish part of the Wadden Sea, while a smaller part is found in the German and Dutch part. Currently we have limited knowledge about the houting, and especially about the early life stages. Since the houting spawns in FW and spends the major part of its juvenile and adult life in SW, it is important to learn about the transition from FW to SW, especially concerning development of fry.

The purpose of this project has been to monitor the development of saltwater tolerance from the early larval stage through metamorphosis and into the fry stage. Accordingly, various methods have been used to test the hypoosmoregulatory capabilities.

Direct transfer of 0-4, 15-19 and 32-25 day old houting larvae to seawater (SW) of varying salinity showed, that larvae at these stages were unable to survive salinities of 18, 25 and 30 ppt, except 0-4 day old larvae which showed a relatively high survival in 18 ppt SW with some signs of crisis. Generally there was a high survival of larvae in FW and 10 ppt. At the same time the body water content (BWC) was measured 4 and 24 hours after transfer, to examine if the larvae were capable of active hypoosmoregulation. The results showed that the larvae did not have this capacity at high salinities within the time frame of the experiment.

Direct transfer of 150-170 day old metamorphosed houting fry showed an improved survival in SW up to 25 ppt. indicating a size-dependent saltwater tolerance. This tolerance was confirmed in acclimation experiments using larvae and fry, where the salinity was gradually raised over time. Houting at the fry stage showed a greater survival at high salinities than houting at the larval stage, and at the same time a better capability of regulating BWC. Direct transfer of river whitefish (*Coregonus lavaretus*) showed increased SW survival in fry compared to larvae, indicating a size-dependent saltwater tolerance. The survival was however lower compared to houting indicating an adaptation to a less saline environment.

Immunohistochemical staining using an Na^+, K^+ -ATPase enzyme antibody, showed an increase in the abundance of this enzyme as a result of gill development in fresh water (FW). This allows for a greater hypoosmoregulatory capability.

Measurements of drinking in 180-200 day old houting fry using ^{51}Cr -EDTA technique resulted in an unexpected high rate of drinking in FW acclimated fry, but it also showed that the fry were able to increase drinking in SW at salinities of 18 and 25 ppt.

There was an increase in the level of gill Na^+, K^+ -ATPase activity in houting fry (7-9 cm) 2, 7 and 10 days after transfer to SW (25 ppt). The activity was only significantly different after 10 days and only as a result of an unexpected drop in FW control fish activity.

Driftnet fishing in River Hjortvad did not result in the catch of houting larvae around the expected time of hatching, while electrofishing in Rudbøl Lake 22/5-2002 resulted in the catch of 2 houting fry with sizes of 37 and 41 mm.

In summary, the field observations suggest that houting have a period of FW dwelling at the fry stage before migrating to the Wadden Sea. This is supported by the laboratory experiments which indicate that development of saltwater tolerance is size-dependent. Thus, despite earlier suggestions of larval drifting into the ocean, a certain time period in FW seems important for the fry in order to develop an increased capacity to acclimate to saltwater conditions

1. Introduktion

1.1 Osmoregulering:

Osmoregulering i fisk er et emne, der har været genstand for megen forskning igennem tiden. Mange arter er velundersøgte, og man har opnået stor indsigt i de mekanismer, der styrer reguleringen. Der er dog ret store forskelle imellem arternes strategier, og der er en række arter, som ikke er undersøgte. Denne manglende viden er ofte et problem, når der skal træffes foranstaltninger til gavn for de enkelte arter.

Fisk tilhørende familien *Salmonidae* gyder alle i ferskvand, og flere arter fra denne familie er anadrome, hvilket vil sige, at de veksler mellem at leve i ferskvand (FV) og saltvand (SV) i løbet af deres livscyklus. Alle teleoster har en osmolalitet i deres extracellulære kropsvæsker på ca. 300-350 mOsmol/kg, mens osmolaliteten i FV er 5-20 mOsmol/kg og ca. 1000 mOsmol/kg i SW. Denne forskel stiller store krav til fisk, og deres evne til at osmoregulere, når de skifter mellem de to miljøer. Til at osmoregulere benyttes flere specialiserede organer: gællen, tarmen, nyren og urinblæren.

1.2 Osmoregulering i FV:

Fisk i FV er hypertoniske i forhold til det omkringliggende miljø. Derfor vil vand trænge ind i fisken ved osmose, mens ioner passivt tabes over kropsoverfladen, primært gællerne, og gennem urinen. Dette modvirkes ved at producere en stor mængde fortyndet urin, og aktivt optage ioner over gællen og gennem tarmen (Marshall, 2002).

1.2.1 Gællen:

Gællen er i direkte kontakt med det omgivende miljø, samtidigt med at epitelet har en stor overflade som er permeabel for vand og ioner, og derfor er dette organ en vigtig brik i osmoreguleringen. Gællen er opbygget af 8 gællebuer, 4 i hver side, hvorpå der sidder filamenter og på disse sidder lameller. Gælleepitheliet i FV fisk består af fire celletyper: Pavement-celler (PC), α - og β -chloridceller (CC) og mucusceller (Laurent & Dunel, 1980; Pisam et al., 1987; Pisam & Rambourg, 1991). PC er forbundet til andre PC eller CC ved hjælp af "tight junctions", som ikke tillader

ioner at passere, og spiller en rolle i iontransporten (Marshall, 2002). PC indeholder få mitochondrier i forhold til CC.

CC er blevet identificeret som det sted, hvor salt sekretion i SV (Foskett & Scheffey, 1982), og menes også at spille en rolle i saltoptag i FV (Pisam & Rambourg, 1991).

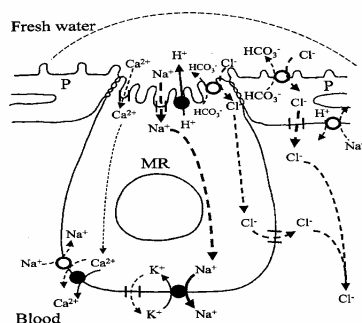
Begge typer CC indeholder et relativt højt antal mitochondrier, og har et veludviklet tubular-system. Tubular-systemet er mere udtalt i α -CC, men for begge typer gælder, at den apicale membran kun er svagt foldet. De to typer CC har forskelligt udseende og placering (Pisam & Rambourg, 1991). α -CC er blege og aflange, og er lokaliseret ved basis af lamellerne. β -CC er mørkere og ægformede, og de er placeret på filamenterne mellem lamellerne. β -CC findes kun i fisk der opholder sig i FV (Pisam & Rambourg, 1991).

Mucusceller findes hovedsageligt på for- og bagkanten af filamenterne, og kun i lavt antal, hvis nogen, på lamellerne (Laurent & Hebibi, 1989).

1.2.2 Iontransport i FV-gællen:

Tidligere ansås Cl^- , HCO_3^- og Na^+ , H^+ exchangers at være medvirkende i optagelsen af natriumchlorid, men senere studier har vist, at en apikal H^+ -ATPase driver det apicale optag (Avella & Bornancin, 1989; Marshall, 2002). Denne pumpe tillader, at natrium trænger ind i cellen gennem apicale natriumkanaler, mens H^+ pumpes ud af cellen. Natrium bliver så pumpet ud af cellen af Na^+ , K^+ -ATPase, der er placeret basolateralt i cellen. Chlorid kommer ind i cellen via Cl^- , HCO_3^- -exchangeren, og diffunderer ud af cellen gennem basolateralt placerede Cl^- -kanaler (fig.1.2.1).

Modellen involverer både CC og PC.



Figur 1.2.1: (Fra Marshall, 2002). Iontransport i gællen i FV.

Både CC på lamellerne (Uchida et al., 1996; Seidelin et al., 2000) og filamenterne (Pisam et al., 1987, 1991) menes at være involveret i ionoptagelsen.

1.2.3 Tarmen:

Tarmen er opdelt i en for/midt- og bag-tarm, som er adskilt af en lukkemuskel. På for/midt-tarmen i laksefisk sidder et antal blindsække, de pyloriske sække (Boge et al., 1988). Nielsen et al., (1999) fandt at de pyloriske sække havde betydning for bækørreders (*Salmo trutta*) osmoregulering ved overførsel til saltvand. I FV har tarmepithelet meget lav permeabilitet for vand, og optagelsen af NaCl sker uden vandoptag (Boeuf, 1993). For de fleste undersøgte fisk er den orale vandindtagelse (drikning) meget lav i FV. Dog er der eksempler på, at tidlige udviklingsstadier (larver) har et betydeligt højere vandindtag (Tytler, 1990; Fuentes & Eddy, 1997). Betydningen af dette er ukendt.

1.2.4 Nyren og urinblæren:

Nyrens tubuli i FV teleoster består af et proximalt segment I og II, et intermediært segment, distalt segment og et samlør. Denne opbygning muliggør, at næsten alt NaCl absorberes, specielt i det næsten "vandtætte" distale segment (Karnaky, 1998). Nyren fungerer ultrafiltratorisk, som hos alle andre hvirveldyr og producerer i FV en meget hypotonisk urin. Nyren har en høj glomerulær filtrationsrate (GFR) på ca. 400 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{h}$ (Boeuf, 1993), og den dannede urin har en osmolalitet på ca. 20 mOsmol/kg. FV fisk udskiller en stor mængde urin, og mængden (ca. 300 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{h}$) er kun lidt lavere end GFR (Evans, 1993). Urinblæren er relativt impermeabel for vand, hvilket betyder at den reabsorberede væske er hyperosmotisk i forhold til urinen og dette medvirker til at tilbageholde salte og udskille vand (Evans, 1993).

1.3 Osmoregulering i SV:

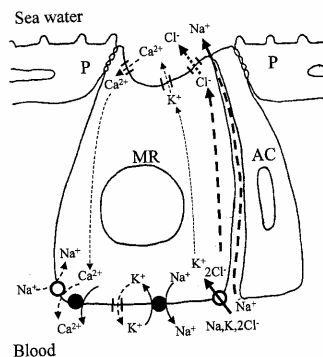
Benfisk der lever i SV er hypotone i forhold til det omgivende miljø. Derfor vil de passivt tabe vand over gællerne, mens NaCl vil trænge ind. Dette modvirker fisken ved at drikke SV og aktivt at udskille ioner via nyren og over gællerne (Karnaky, 1998).

1.3.1 Gællen:

Fisk vil ved SV akklimering udvikle accesory-celler (AC) i filamenterne, som er forbundet til CC ved "leaky junctions", hvilket gør gællen mere permeabel for vand og ioner (Pisam & Rambourg, 1991). Samtidigt øges volumen og den apikale kontaktflade af CC (Pisam et al., 1987; Pisam et al., 1988; Uchida et al., 1996; Shikano & Fujio, 1998). I nogle arter ses desuden en forøgning i antallet af CC (Laurent & Dunel, 1980; Laurent & Hebibi, 1989), mens Pisam et al., (1987), Uchida et al., (1996) og Shikano & Fujio (1998) ikke observerer en stigning. Både i den apikale og basolaterale membran øges foldningen, og i den sidste bliver det tubulære system mere udtalt (Pisam & Rambourg, 1991), hvilket tilsammen øger arealet. Desuden degenerer β -CC i SV så kun α -CC er tilbage efter et tidsrum (Pisam & Rambourg, 1991; Shikano & Fujio, 1998). Desuden har Uchida et al., (1996), og Seidelin et al., (2000) vist at CC forsvinder fra de lamellerne i henholdsvis pukkellaks (*Oncorhynchus keta*) og bækørred (*Salmo trutta*) efter akklimering til SV.

1.3.2 Iontransport i SV-gællen:

NaCl-sekretion i SV involverer en basolateralt placeret Na^+, K^+ -ATPase som drivkraft. Denne etablerer en gradient af Na^+ ind i cellen som udnyttes af en basolateral $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -cotransporter (NKCC) til sekundært at transportere Cl^- -ioner mod en gradient ind i cytosolet. Derfra transporteres Cl^- videre ned af sin elektrokemiske gradient ud i havvandet via CFTR anion kanaler lokaliseret i den apicale membran. Na^+ -sekretionen følger passivt Cl^- -sekretionen ned af sin elektrokemiske gradient gennem paracellulære kanaler skabt af accessoryceller (Marshall, 2002; fig. 1.3.1).



Figur 1.3.1. (Fra Marshall, 2002). Iontransport i gællen i SV.

1.3.3 Tarmen:

Benfisk i SV drikker aktivt vand, for at kompensere for det passive tab af vand over gællerne. Da tarmepithelet i SV er permeabelt for vand kan vand optages ved en mekanisme, hvorved NaCl optages aktivt og vand følger passivt efter (Karnaky, 1998). Dog optages ca. 50 % af NaCl allerede i svælg-regionen ved passiv diffusion, og det optagne NaCl udskilles i gællerne (Evans, 1993). For fisk der kan omstille sig mellem forskellige saltholdigheder begynder fisken tidligt i akklimeringsforløbet at drikke vand. I takt hermed ændres strukturen og biokemien af tarmepithelet, så det kan absorbere vand vha. pumpning af salt (Boeuf, 1993).

1.3.4 Nyren og urinblæren:

Nyren i marine benfisk er ofte noget reduceret i forhold til FV arter. Antallet af glomeruli er tit reduceret, og i enkelte arter mangler glomeruli og den distale tubule helt (Evans, 1993). I følge Boeuf (1993) sker der en væsentlig ændring i nyrens anatomi hos smoltificerende laksefisk. Dette bevirker, at SV fisk producerer en begrænset mængde urin som er relativt koncentreret, hvilket reducerer tab af vand. Dette skyldes, at vandpermeabiliteten i de distale tubuli, samlerør og urinblæreepithelet er større end i FV (Evans, 1993). Urinblæren er mere permeabel for vand sammenlignet med fisk i FV, hvilket betyder at reabsorberet væske er isoosmotisk, og derved formindskes vandtabet (Evans, 1993).

1.4 Osmoregulering i larver/ungel:

Fiskelarvers evne til at overleve ændringer i salinitet, afhænger af to faktorer: Evnen til at tolerere ændringer i den interne osmotiske koncentration, i hvert fald i en periode, og en evne til at regulere den indre osmotiske koncentration til det normale niveau (Holliday, 1969). Efter klækning udgøres huden af et tyndt tolags ephitelium (Jones et al., 1966 cf Holliday, 1969), og der sker ion- og osmotisk transport over denne som følge af den omgivende salinitet. Samtidigt er de osmoregulerende organer såsom gællen, tarmen, og nyren, kun svagt udviklede. Derfor er huden det primære osmoregulatoriske site hos larver, og huden spiller ligeledes en vigtig rolle i respirationen (Alderdice, 1988).

På larvestadiet udgør epilet der dækker kroppen og blommesækken den største part af overfladen og der ses ofte chloridceller i epitelet (Hwang & Hirano, 1995; Kaneko et al., 1995; Shiraishi et al., 1997; Hiroi et al., 1998). Der ses ofte et respons i chloridcellerne ved overførsel af larver fra FV til SV, der ligner det der ses i gællernes chloridceller i større fisk jf. 1.3.1 (Kaneko et al., 1995; Shiraishi et al., 1997), hvilket indikerer at chloridceller i huden spiller en rolle i osmoreguleringen.

Ud over den ringe udvikling af de osmoregulatoriske organer er larvers overflade/volume forhold væsentlig større end i større fisk, hvilket sammenholdt med en mere permeabel hud gør larverne mere følsomme overfor ændringer i saliniteten. Senere udvikles de osmoregulatoriske organer samtidigt med at hudens struktur ændres, og den bliver mindre permeabel for vand- og iontransport (Holliday, 1969). Denne ændring ses ofte som følge af metamorfose, der beskrives som en hurtig og væsentlig fysiologisk og morfologisk ændring af larven (Holliday, 1969).

1.5 Osmoregulerende proteiner:

Et antal proteiner spiller en rolle i osmoreguleringen, og to af de proteiner der spiller en vigtig rolle ved overgangen fra FV til SV er Na^+, K^+ -ATPase (NKA) og $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC). Andre vigtige proteiner er CFTR proteinet som er en chlorid kanal i den apicale membran samt H^+ -ATPase som driver optag af natriumchlorid i FV.

NKA består af to subunits, en α (112 kd) og en β (35 kd), som sidder placeret i plasmamembranen som en $\alpha_2\beta_2$ -tetramer (Stryer, 1995). På α -subuniten findes bindingssites for Na^+ , K^+ og ATP og denne subunit er ansvarlig for den katalytiske aktivitet. β -subuniten stabiliserer enzymet, og sørger for den rigtige placering i forhold til plasmamembranen (Geering, 2001). NKA pumper 3 Na^+ ud af cellen, og 2 K^+ ind per ATP-molekyle, hvilket er med til at skabe den gradient der muliggør iontransport.

NKCC er et glycoprotein der udfører kation-chlorid transport over plasmamembranen (Hass, 1994). Der findes to isoformer, NKCC1 som er sekretorisk og NKCC2 som er absorberende, og begge typer transporterer 1 Na^+ , 1 K^+ og 2 Cl^- .

NKCC er i gællen forbundet med ekskretion af NaCl, og derfor ses der ofte en stigning i proteinmængden under akklimering til SV ligesom mængden og aktiviteten af NKA stiger herunder (Marshall, 2002).

1.6 Snæblen

1.6.1 Klassifikation:

Snæblen (*Coregonus oxyrhynchus* L.), er en laksefisk som tilhører heltfamilien. Den er klassificeret som: Klasse: Pisces

Orden: Salmoniformes

Familie: Salmonidae

Slægt: *Coregonus*

Art: *Coregonus oxyrhynchus*.



Figur 1.6.1. Snæbel (*Coregonus oxyrhynchus*) fanget under elfiskeri i Gl. Varde Å november 2002 (Foto: Dennis Thomsen, 2002).

Der har igennem tiden været en del diskussion om, hvorledes snæblen skulle klassificeres, ikke mindst fordi den er nært beslægtet med helten (*Coregonus lavaretus* L.). Snæblen adskiller sig morfologisk fra helten ved ikke at have samme antal gællegitterstave (Himberg & Lethonen, 1995), og at den har en forlænget snude (Ribe & Sønderjyllands Amt, 1999). Desuden er snæblen mere tolerant overfor høje saliniteter (Jensen et al., 1999). Undersøgelser af Hansen et al., (1998) på mitochondrielt DNA og mikrosatelliter fra helt og snæbel leder dem frem til, at helten og snæblen er en og samme art, og at snæblen også bør betegnes som *Coregonus lavaretus*. Der findes også betegnelser som Nordsøsnæbel (Grøn et al., 1988) og Rhinsnæbel (Redeke, 1934).

Helten (*Coregonus lavaretus*) er mere udbredt i Danmark end snæblen, og den findes hovedsageligt i Jylland, blandt andet i Ringkøbing Fjord, Nissum Fjord,

Randers Fjord samt Limfjorden og i de dertil hørende vandsystemer. Helten gyder ligesom snæblen i ferskvand, men vokser op i de mere brakke fjorde (McDowall, 1988). Der findes dog helt, som opholder sig i FV gennem hele deres livscyklus.

1.6.2 Livscyklus:

Snæblen er en anadrom laksefisk, der gyder i ferskvand, og trækker til havs, hvor den har sin opvækst. Gydningen foregår i en periode fra sidst i november til midt i december. Snæbelhunner indeholder ca. 20-30000 æg pr. kg kropsvægt, som de gyder frit i vandet. Æggene er relativt små sammenlignet med laks og ørred. Laks gyder ca. 5000 æg pr. kg kropsvægt og ørred ca. 1500 stk (Muus & Dahlstrøm, 1990). Snæblerne foretrækker vandløb med en bundbredde over 4-5 m med god strøm, vandplanter og sten. Æggene er klæbrige og fæstner til vegetationen eller bunden. Æggene kræver ca. 400 daggrader (laks ca. 440 og ørred ca. 410, Muus & Dahlstrøm, 1990) og klækker i marts-april måned, og snæbellarverne måler på klækketidspunktet 10-12 mm. Der er tvivl om hvorvidt larverne drifter passivt med strømmen mod havet, eller om de opholder sig en tid i vandløbet inden udtrækket til havet. Under elfiskeri om vinteren i den nedre del af Ribe Å, har Ribe Amt observeret juvenile snæbler med en længde på ca. 15-20 cm (Jensen, 2002, pers. komm.) I Holland er juvenile snæbler fundet i de nedre dele af Rhinen og Meuse (Kranenbarg et al., 2002). Snæblerne blev fundet i nogle af de eustarier floderne danner i udløbene, og var hovedsageligt mindre end 30 cm. Det største antal blev fundet fra maj til juli måned. Dette tyder på en længere opholdstid i vandløbet inden overgang til SV eller også veksler snæblen af ukendte årsager mellem FV og SV udenfor gydeperioden. Snæblen bliver for hannernes vedkommende kønsmodne som 2-årige, men gyder oftest først som 3-årige. Hunnerne er 3-4 år gamle, når de bliver kønsmodne, men de fleste gyder først som 4-årige. Som regel er der flest hanner på gydepladserne, hvilket skyldes, at hannerne bliver tidligere kønsmodne end hunnerne og derved er repræsenteret med flere årgange. Efter gydningen vender snæblerne tilbage til Vadehavet, formentlig i marts-april måned da elektrofiskeri har påvist snæbler i vandløbene på dette tidspunkt (Jensen et al., 2003). Ynglen er planktivor, hvilket også gælder voksne individer, men den supplerer desuden kosten med muslinger, orme og mindre fisk (Scheffel, 1999).

Den største usikkerhed vedrørende snæblens livscyklus, er hvad der sker med ynglen efter klækning. Drifter larverne til havs umiddelbart efter klækning, har de en opvækstperiode i vandløbet eller bliver enkelte individer i vandløbet? Kun få arter af salmonider søger til havs relativt kort tid efter klækning. Ketalaks (*Oncorhynchus keta*) og pukkellaks (*Oncorhynchus gorbusha*) drifter til havs umiddelbart efter deres blommesæk er opbrugt (Weisbart, 1968; Iwata et al., 1982; Hasegawa, 1987), og ketalaksen har f.eks. en størrelse på 35-45 mm (Clarke & Hirano, 1995), mens pukkellaksen allerede har anlagt sølvfarvede skæl, når den kommer fri af gruset (Hoar, 1988). En oftere set strategi hos salmonider går under betegnelsen "smoltifikation". Ordet dækker over en række ændringer i fysiologi, morfologi og adfærd forud for havvandringen (Boeuf, 1993). Smoltifikation ses f.eks. hos ørred (*Salmo trutta*), Atlanterhavslaks (*Salmo salar*), og Stillehavslaks (*Oncorhynchus kisutch*, *O. nerka*, *O. tshawytscha*). Yngel af disse arter opholder sig 1-2 år, eller længere, i FV (parr-stadiet) indtil de når en vis størrelse, hvorefter de forvandles til det saltvandtolerante stadie (smolt) og vandrer nedstrøms til havet (Hoar 1988, Boeuf, 1993). Forud for vandringen ændres deres kroppsform til at være slankere og mere torpedoformet, og de bliver sølvfarvede. Desuden "forberedes" havvandringen ved udvikling af hypo-osmoregulatoriske mekanismer således, at FV-smolt er istand til at osmoregulere så snart de når SV. Blandt disse mekanismer bruges aktiviteten af gælle Na^+ , K^+ -ATPase ofte som et mål for "graden" af smoltifikation (Boeuf, 1993). Na^+ , K^+ -ATPase aktiviteten stiger under smoltifikationen i FV, og niveauet ligger væsentligt højere end i individer, der ikke smoltificerer. For nogle arter ses der en yderligere stigning i aktiviteten efter overgangen til SV (Hoar, 1988). Denne stigning i SV tolerance ses kun i et snævert tidsrum, og hvis der ikke sker en overgang til SV mister fisken sin hypo-osmoregulerende evne igen (Hoar, 1988). Dette ses også hos ketalaks og pukkellaks, hvor tolerancen daler ved en vægt over 2 g (Clarke & Hirano, 1995).

Der er kun udført få forsøg på at måle snæbellarvers salttolerance. Forsøg udført af Kjær & Juhl (1990) giver en indikation om, at larverne skal nå en vis størrelse, før de bliver i stand til at tolerere saliniteter i nærheden af dem de møder i Vadehavet. Forsøg med andre coregonidlarver af Jäger et al., (1981) (*Coregonus albula*,

Coregonus lavaretus) og Nesterenko (1975) (*Coregonus peled*) viser, at der er ringe tolerance, men at denne stiger med alderen.

1.6.3 Historie:

Snæblen var i starten af 1900-tallet almindeligt forekommende i hele Vadehavet. I løbet af århundredet blev den mere og mere sjælden i både Tyskland, Holland og Danmark. I Danmark blev der i 1978-80 foretaget undersøgelser med det formål at belyse udbredelsen af snæblen (Jensen et al., 1999). Resultatet af undersøgelsen var, at der kun fandtes en bestand af en vis størrelse i Vidåen, mens den kun fandtes sporadisk i andre sydvestjyske vandløb. Dette førte til at der i 1981 blev besluttet af Sønderjyllands Amtsråd at der skulle iværksættes en redningsaktion. Dette blev fulgt op af en totalfredning af snæblen i 1983. Snæblen blev omfattet af EF's habitatdirektiv i 1992, som en prioriteret art. På den danske rødliste har snæblen status som en sjælden art (Stoltze & Pihl, 1998). Da Danmark er hjemsted for den største del af den samlede bestand er snæblen også på gullisten som en national ansvarsart (Stoltze, 1998). I 1987 indgik Sønderjylland Amt og Ribe Amt et samarbejde om en ophjælpning af bestanden gennem udsætninger og forbedringer af det fysiske miljø i vandløbene (Grøn et al., 1988). Dette medførte, at der fra 1987-92 blev udsat 1,7 millioner styk snæbelyngel (3-5 cm) i Varde Å, Sneum Å, Kongeå, Ribe Å, Brede Å og Vidå (Jensen et al., 1999). Samtidigt blev der udført forbedringer i vandløbene, såsom fjernelse af spærringer og mindre hårdhændet vedligeholdelse, hvilket forbedrede gydeforholdene. Disse tiltag medførte at der blev skabt store bestande i alle vandløb i den første halvdel af 1990'erne, men kun i Vidåen blev der etableret en stor reproducerende bestand med god tilgang af ungfisk. Dog blev der også skabt selvreproducerende bestande i Ribe Å, Varde Å og Brede Å, men bestandene er for nedadgående (Jensen et al., 1999).

1.6.4 Udbredelse:

Snæbelen var tidligere udbredt i hele den tyske, hollandske og danske del af Vadehavet. I løbet af 1920'erne forsvandt den fra tyske og hollandske floder (Jensen et al., 1999), mens undersøgelser i 1978-80 viste, at der kun var en bestand tilbage i Vidåen (Grøn et al., 1988). Som følge af udsætninger fra 1987-92 genskabtes der bestande i flere af de sydvestjyske vandløb, men det vurderes, at der kun er selvreproducerende bestande i Vidåen, Brede Å, Ribe Å og Varde Å. I Vadehavsundersøgelsen fra 1997 vurderedes den totale gydebestand til at være ca. 8700 stk (Ejbye-Ernst & Nielsen, 1997), mens den i den sidste opgørelse fra 2000 (fig.1.6.2), anslås til at være 6000-7000 gydefisk, hvoraf de ca. 4000 er tilknyttet Vidåen (Jensen et al., 2003).



Figur 1.6.2: (Fra Jensen et al., 2003). Estimerede gydebestand af snæbel år 2000.

1.6.5 Årsager til tilbagegang:

På grund af vandløbsvelliageholdelsen, som har været relativt hårdhændet for at sikre en tilstrækkelig afledning af vand, er gydemulighederne for snæblen blevet stærkt forringet op igennem århundredet. Da snæblen gyder æg frit i vandet, er det vigtigt at der er substrat, som de kan fæstne på. Hvis grøden er skåret, og stenene gravet op fra bunden er der kun sand tilbage, og det fæstner æggene dårligt på.

Med den reviderede vandløbslov fra 1983, blev det muligt at vedligeholde vandløbene med et vist miljøhensyn, som muliggør en mere skånsom grødeslåning ligesom der blev mulighed for vandløbsrestaurering. Dette har både Ribe og Sønderjyllands Amt benyttet sig af på flere vandløbsstrækninger (Jensen et. al, 1999).

Af ukendte grunde mangler snæblen evnen til at passere mindre opstemninger og fisketrapper, som ørreder og laks er i stand til. Snæblen kan kun passere stryg med stor vandføring (Jensen et al., 1999), og da der i de fleste vandløb findes forhindringer i form af opstemninger og fisketrapper, er snæblen afskåret fra store potentielle gydeområder (fig. 1.6.3).



Figur 1.6.3: (Fra Ejbye-Ernst & Nielsen, 1997). Områder tilgængelige for snæblen.

Vadehavsundersøgelsen (Ejbye-Ernst & Nielsen, 1997) viste, at snæblen har klaret sig bedst i de vandsystemer, hvor der er få opstemninger. Ribe og Sønderjyllands Amter har siden gjort en stor indsats for at forbedre passageforholdene, og har derved skabt adgang til større gydeområder.

Forurening med spildevand fra renseanlæg og dambrug er faldet betydeligt i de seneste år, og den væsentligste årsag til spildevandsbelastning i Sydvestjylland er nu spredt bebyggelse som påvirker ca. 20 % af vandløbene i Ribe og Sønderjyllands Amter (Ejbye-Ernst & Nielsen, 1997). Desuden vurderes det, at der også er en vis belastning fra dambrug, ligesom okkerforurening er en faktor flere steder.

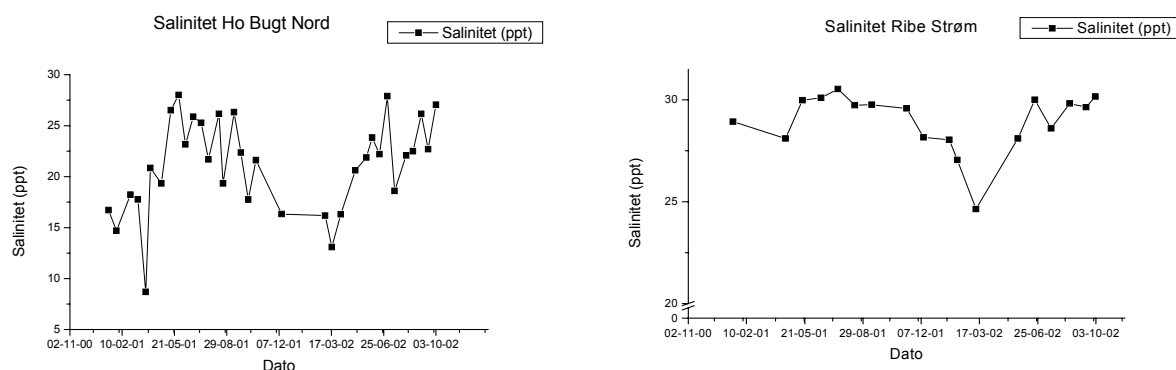
Dambrug kan også indvirke på ynglens bevægelse ned gennem vandløbet, idet larver ofte vil føres ind i selve dambruget, hvor de går til grunde (Jensen et al., 2003). På grund af kanalisering af vandløbene og regulering med sluser, hvilket har betydet at vinteroversvømmelser af lavtliggende engarealer er begrænset væsentligt, er ynglens opvækstmuligheder blevet begrænset (Jensen et al., 1999).

I Vadehavet drives der kommercielt fiskeri, og en vis mængde snæbler fanges hvert år. I følge Ejbye-Ernst & Nielsen, (1997) var den årlige fangst af snæbel ca. 3400 fisk, hvoraf 2600 var i deres første leveår. Da snæblen er fredet skal de genudsættes, men det vurderes at en væsentlig del af snæblerne dør på grund af ophold i fangstredskaberne.

1.7 Vadehavet:

Snæbilen har sin primære opvækst i Vadehavet, og betegnes som en estuarin art (McDowall, 1988). Den trækker sjældent længere til havs, og skal derfor være istand til at tolerere de omskiftelige forhold i Vadehavet.

Vadehavet strækker sig fra Ho Bugt i Danmark til Den Helder i Holland. Den danske del udgør ca. 850 km² (Sørensen, 1995). Det er et lavvandet havområde gennemskåret af dybe render, og på grund af tidevandet tørlægges store områder to gange i døgnet. Da flere vandløb og floder har udløb i Vadehavet, og det grænser op til Nordsøen, er der store forskelle i saltholdigheden. Tidevandet og vinden spiller desuden en vigtig rolle på saltholdigheden, der ligger på mellem 16 og 34 promille, med store regionale udsving (Veenstra, 1976). To eksempler på sådanne udsving er fra Ho Bugt, hvor Varde Å har sit udløb, og Ribe Strøm der ligger tæt på Ribe Å. I Ho Bugt svinger saltholdigheden fra ca. 8 til 30 promille, mens den ligger på ca. 25-30 promille ved Ribe (fig. 1.7.1).



Figur 1.7.1. Saliniteten i Ho Bugt og Ribe Strøm fra foråret 2001 til efteråret 2002. Bemærk den brudte x-akse på Ribe Strøm grafen. (Data fra Ribe Amt).

Disse målinger repræsenterer kun et øjebliksbillede af forholdene, men viser med stor tydelighed, at snæbilen skal være forberedt på store udsving i saliniteten.

Igennem flere århundreder er der foregået landindvinding i Vadehavsområdet, med det formål at skaffe arealer til dyrkning og husdyrhold (Sørensen, 1995). Samtidigt har man villet beskytte sig mod stormfloder og oversvømmelser, hvilket har ført til

opførslen af diger og sluser. Med disse foranstaltninger forhindres vand i at strømme ind i landet både ved stormflod og ekstremt højvande. Da samtidigt næsten alle vandløb i regionen er kanaliserede ses der sjældent oversvømmelser af engarealer op til vandløbene. Kun Varde Å's udløb er ikke beskyttet af diger og en sluse, så ved stormflod og ekstremt højvande kan vandet trænge flere kilometer op i ådalen og overvømme store arealer (Tougaard et al., 1981).

1.8 Formål:

På trods af de mange tiltag for at ophjælpe snæbelbestanden er den støt faldende og snæblen anses som en truet art. Da man kun har en begrænset viden om snæblens yngelstadie vil dette speciale sigte på at undersøge hvornår saltvandtolerancen udvikles hos snæblen. Kan ynglen tolerere de høje saliniteter i Vadehavet lige efter klækning, eller har den brug for et længere ophold i ferskvand eller brakvand, hvor mekanismerne til osmoregulering udvikles. Sådant en viden vil være af stor værdi i forbindelse med en ophjælpning af bestanden. Derudover er det grundlæggende interessant at karakterisere denne del snæblens biologi, ikke mindst i relation til dens slægtskab med helt og som medlem af laksefamilien med en vis diversitet i denne udvikling. Speciale vil kombinere feltundersøgelser af forekomsten af snæbel med laboratorieundersøgelser af snæblens saltvandtolerance. I specialet vil blive anvendt metoder spændende fra analyser af overlevelsens afhængighed af saltholdighed, tid og udviklingsstadie til undersøgelser af osmoregulatoriske parametre, iontransport proteiner på både protein og mRNA niveau.

2. Materialer og metoder

Første del af arbejdet tilstræber at fremskaffe og udklække befrugtede æg fra vildtfangede snæbler. I de egentlige undersøgelser vil der blive målt en række osmoregulatoriske parametre fra snæbler på forskellige udviklingstrin før og efter overførsel til vand af forskellig salinitet. Snæblerne vil både blive direkte overført og blive udsat for gradvist stigende salinitet. De parametre der måles på er overlevelse, kropsvandindhold (BWC), drikkerate, og gælle- Na^+ , K^+ -ATPase aktivitet. Desuden vil der blive udført indledende immunohistokemisk farvning på vævsnit af gællen for at se på tilstedeværelsen og udviklingen af de to vigtige iontransport proteiner, Na^+ , K^+ -ATPasen og Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransportereren. Yderligere vil niveauet af mRNA for Na^+ , K^+ -ATPasen og Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransportereren i gællen blive undersøgt. Enkelte af disse parametre vil også måles hos helten for at sammenligne udviklingen af saltvandtolerance i de to nært beslægtede arter.

Sideløbende udføres der feltforsøg i Hjortvad Å for, at se om larverne drifter med strømmen efter klækning. Der fiskes med driftnet opstrøms og nedstrøms et stillestående parti af åen, der har karakter af en sø. Det vil kunne give et billede af om larverne tager ophold i det stillestående vand. Senere udføres elektrofiskeri i Rudbøl Sø, som er en del af Vidåen, for at undersøge om der er individer, som har taget ophold i systemet.

2.1 Opstilling Syddansk Universitet:

Snæbler opdrættes ikke i Danmark, så da forudsætningen for hele specialearbejdet var fremskaffelse af snæbelyngel, ansøgte Mads Ejbye-Ernst, Ribe Amt, Fiskeridirektoratet om tilladelse til strygning af vilde moderfisk i efteråret 2001.

Snæbelæggene blev opbevaret i et kølerum på Biologisk Institut ved en temperatur på $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$ og en døgnrytme på 12L:12M i gennem hele perioden.

Æggene blev opbevaret i plasticbaljer (10 L) som blev vasket i varmt vand indeholdende NaOH for at eliminere eventuelle phtalater der kunne skade æggene (Rasmussen, 2001, pers. komm.). Dagen inden æggene ankom blev der fyldt 7-8 liter hanevand i hver balje som blev kraftigt gennemluftet for at undgå et for højt indhold af CO_2 .

2.2 Elfiskeri i Gl. Varde Å:

Æggene blev indsamlet fra moderfisk fanget den 29/11-01 ved elektrofiskeri i Gl. Varde Å på strækningen fra Sig Dambrug til Karlsgårdeværket. Elektrofiskeriet blev udført af biologer fra Ribe Amt. Der blev indfanget 27 snæbler, som blev opbevaret i en glasfiberbalje som blev beluftet med ren ilt. Der var ingen fuldmodne hunner, men en næsten moden hunnfisk på 40 cm blev strøget, og de strøgne æg blev befrugtet med mælk fra tre hanner af varierende størrelse. Befrugtningen blev udført af biolog Knud Rasmussen, Viborg Amt. De befrugtede æg blev pakket i 6 liters plasticposer fyldt med vand fra åen, som var ca. 4°C. Poserne blev placeret i en plasticspand, og kørt til Odense Universitet. På universitetet blev spanden med æg placeret i det klagjorte kølerum, indtil vandet i poserne nåede en temperatur på 4°C. Herefter blev æggene fordelt i plasticbaljerne således, at de lå i et lag, og berørte hinanden mindst muligt (fig. 2.2.1). Da æggene var meget klæbrige i starten, blev de holdt adskilt ved hjælp af en gåsefjer. Dette punkt var af stor vigtighed for at undgå skimmelsvamp. Den 4/12-01 blev æggene fra endnu en snæbel opsamlet fra Gl. Varde Å og befrugtet af biologer fra Ribe Amt, og æggene blev overført til Universitetet. Æggene blev placeret adskilt fra de første.



Figur 2.2.1. Opstilling i kølerum på Syddansk Universitet (Foto: Dennis Thomsen, 2001).

2.3 Produktion af yngel

2.3.1 Pasning af æg og yngel:

Æggene blev så vidt muligt tilset dagligt, og døde æg blev fjernet fra bakkerne ved

hjælp af en plasticpipette (3ml), hvor spidsen var klippet af således, at æggene kunne suges op. Døde æg kunne genkendes på, at de blev hvidlige på grund af koaguleret protein.

Vandet i baljerne blev skiftet med 2-3 dages mellemrum, og baljerne skiftedes løbende på grund af belægnings. Vandet blev tappet i 10 L plasticspande og beluftet minimum 24 timer før det skulle bruges. Efter en uge registreredes en relativt stor dødelighed blandt æggene, og den 11/12-01 blev vandet fra hanen udskiftet med vand fra Lindved Å. Lindved Å er et ørredførende tilløb til Odense Å, så det blev vurderet som værende egnet til yngelopdræt. Dette bevirkede at dødeligheden faldt markant omkring den 18/12 fra ca. 20-30 æg om dagen til 5-10 æg. Vandet fra Lindved Å blev hentet i 10 L plasticspande, og opbevaret til det havde kølerummets temperatur. Vandet blev dog højst opbevaret i 48 timer, inden det blev brugt. Ved hvert vandskift blev der udskiftet mellem 25 og 50 % af vandet. Ved vandskift blev æggene samlet i et net og midlertidigt placeret i en anden balje, mens den ønskede vandmængde blev udskiftet. Baljerne blev løbende rengjort på grund af belægnings. På trods af at køleanlægget brød sammen tre gange, oversteg temperaturen ikke på noget tidspunkt de 10°C, som er den højeste temperatur æggene kan tåle (Rasmussen, 2001, pers. komm.).

De første æg klækkede den 30/1-02 (8 stk), og derefter skete der en løbende klækning. Antallet af resterende æg blev opgjort den 4/2-02 til 5955 stk. Hovedparten af æggene klækkede i perioden 27/2-12/3-02. Efter endt klækning d. 16/3-02 var der ca. 5500 snæbler til rådighed. Æggene der klækkede fra den 4-12/3 blev inden klækning stimuleret med lys fra en arkitektlampe, som blev placeret direkte over baljerne. Dette blev gjort for at minimere spredningen af klækketidspunktet. Larverne blev inddelt i grupper: 30/1-6/2, 7/2-20/2, 21/2-26/2, 27/2-3/3, 4/3-7/3, 8/3-12/3 og 13/3-16/3. Dette skulle sikre, at der ikke var for stor forskel på larverne, når de skulle indgå i forsøg. Denne opdeling varede indtil ultimo april, hvor det af praktiske hensyn var nemmere at blande grupperne. Larverne var fritsvømmende fra starten, og blev overført til plasticakvarier. Akvarierne (LxBxH (cm): 32,5x22x20,5 eller 33,5x20,5x19,5) blev påfyldt ca. 10 L vand fra Lindved Å og gennemluftet inden brug. Hvert akvarie blev beluftet med en luftsten uden at skabe så meget turbulens, at snæblerne blev bragt ud af position. Iltkoncentrationen blev

kontrolleret med jævne mellemrum ved hjælp af en transportabel iltelektrode (YSI 85, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA), og mætningsprocenten blev holdt på minimum 70 %. Det blev tilstræbt at holde antallet af snæbler på ca. 200 styk pr. 10 L, men på grund af pladsmangel var der i en periode op mod 400 styk pr. 10 L.

Temperaturen blev efter klækningen holdt på $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$ i kølerummet, mens gruppen 7/2-20/2 blev overført til Biologisk Instituts akvarierum, hvor temperaturen var $15,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Denne gruppe blev ramt af et svampeangreb og gik tabt.

Vandet i akvarierne blev skiftet 2-3 gange om ugen, og ca. 25-100% af vandvolumen blev skiftet. Akvarierne blev løbende udskiftet på grund af belægninger. De blev rengjort med 96% ethanol og vand. Døde snæbler blev fjernet og talt så hurtigt som muligt for at undgå forurening af akvarierne.

Temperaturen blev løbende hævet fra udgangstemperaturen $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$:

15/2-02: $5,0 \pm 1^\circ\text{C}$

30/4-02: $7,0 \pm 1^\circ\text{C}$

13/5-02: $8,0 \pm 1^\circ\text{C}$

14/5-02: $9,0 \pm 1^\circ\text{C}$

15/5-02: $10,0 \pm 1^\circ\text{C}$

16/7-02: $12,0 \pm 1^\circ\text{C}$

17/7-02: $13,0 \pm 1^\circ\text{C}$

For at teste om det var muligt at anvende vand fra hanen i stedet for åvand, og derved få mulighed for at overføre snæblerne til større kar i kælderen, blev tre akvarier skiftet over på hanevand den 9/7-02. Da dette ikke havde nogen effekt på dødeligheden, blev alle akvarier skiftet over på hanevand den 27/8-02. Vandet blev tappet >24 timer før brug, og kraftigt gennemluftet.

Den 4/9-02 blev ca. halvdelen af snæblerne overført til et kar i kælderen med ca. 330 L vand, som havde en temperatur på $15,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Døgnrytmen i akvarierummet var 12L:12M. Da det ikke medførte nogen problemer blev resten af snæblerne, på nær dem der havde været brugt i forsøg, overført til et kar med samme specifikationer som det første. Snæbler der havde været brugt i forsøg blev overført til et tredje kar i starten af december 2002.

Karrene i kælderens var af glasfiber og kunne rumme ca. 400 L vand. Der var et kontinuerligt flow af hanevand igennem karrene. Hvert kar blev beluftet med atmosfærisk luft.

2.3.2 Fodring:

Snæbllerne blev fra start fodret med saltkrebs (*Artemia salinas*). Saltkrebsene (Eldorado, Haderslev, DK) blev klækket i 1,5 L sodavandsflasker ved stuetemperatur. Flaskerne blev tilsat ca. 1,4 L hanevand og 18-20 g NaCl (Red Sea Salt, Verneuil Sur Avre, Frankrig), hvilket giver en promille på 13-15 ppt samt 2,5-3,5 g tørrede saltkrebsæg. I bunden af flaskerne var der placeret en iltsten der sørgede for kraftig omrøring, mens æggene klækkede. Klækketiden var mellem 24 og 48 timer. Efter klækningen blev flaskens indholdt overført til en 10 L plasticbalje med et flamingolåg, hvori der var skåret et hul med en diameter på ca. 10 cm. Over dette hul blev der placeret en arkitektlampe, og lyset bevirkede at saltkrebsene samlede sig således at æggeskallerne kunne undgås når saltkrebsene skulle suges op. I starten var kun to flasker i brug, og saltkrebsene kunne suges op med plasticpipetter (3ml), men som mængden løbende blev øget til slutteligt 8 flasker, blev saltkrebsene dekanteret over i et fintmasket net ved hjælp af en plasticslange. Her blev saltkrebsene skyllet i ferskvand og suget op i 50 ml sprøjter. Da saltkrebsene blev skyllet, og vandet ofte blev udskiftet medførte fodringen at saliniteten ikke steg til over 0,5 promille hos snæbllerne. Dette blev jævnligt kontrolleret ved hjælp af en salinitetsmåler (YSI 85, YSI Incorporated). Der blev fodret 2-3 gange om dagen.

2.4 Feltforsøg

2.4.1 Driftnet Hjortvad Å:

For at undersøge om snæbellarverne drifter nedstrøms umiddelbart efter klækning, udførtes 10 befiskninger med driftnet i Hjortvad Å fra den 11/2-02 til den 25/3-02. Klækketidspunktet blev estimeret ud fra vandtemperaturen som blev registreret ved hjælp af en datalogger placeret et stykke opstrøms sandfanget.

Hjortvad Å er en del af Ribe Å-systemet og løber til Ribe Å umiddelbart opstrøms Ringvejen i Ribe. Der blev udsat et driftnet fra Rådmand Vejles Bro, og et fra

Træbroen ved Ribe Seminarium (Appendiks 1). Imellem de to broer findes et stort sandfang, der har karakter af en sø. Sandfanget ligger ca. 2,5 km fra udløbet i Ribe Å.

Driftnettene der blev anvendt, var venligst udlånt af Christian Hvidt, Bio-Consult A/S, og bestod af en netpose af nylon med en længde på 3,5 m, som var fastgjort på en metalramme. Åbningen var 0,5 m² (0,5m*1m), og maskestørrelsen var 1,0 mm. Nettene blev fastgjort til broerne ved hjælp af nylonreb, der var bundet til ringe i netrammens fire hjørner. Nettene blev placeret i åens hovedstrøm således, at den øverste kant var lige under overfladen, hvilket betød at nettene stak 0,5m ned under vandet. Nettene fiskede i to timer pr. gang enten formiddag eller eftermiddag, og indholdet blev efter endt befiskning hældt over i 10 L plasticspande, og fyldt med vand fra åen. Det opsamlede materiale blev undersøgt umiddelbart efter hjemkomst til universitetet, hvilket overflødiggjorde konservering. På grund af høj vandstand blev store mængder materiale opsamlet i nettene og kun ca. 50% blev gennemset. Gennemgangen af materialet foregik ved, at tage en lille håndfuld materiale og overføre det til en hvid plasticbalje, som fyldtes med vand, og så kigge det igennem for larver. Denne procedure blev gentaget til den ønskede mængde var undersøgt.

2.4.2 Vidåen/Rudbøl Sø:

For at undersøge om snæbelynglen bliver i vandløbet i et tidsrum efter klækningen, blev der udført elektrofiskeri i Rudbøl Sø (Appendiks 2) den 22/5-02 fra kl. 09.30-14.00. På dagen skinnede solen, og der var ret blæsende, hvilket betød der var en del bølger, hvilket forringede sigtbarheden i dele af søen. Vandtemperaturen var 17,0°C. Dette fiskeri blev udført med hjælp fra biolog Erik Tveskov fra Sønderjyllands Amt. Elfiskeriet foregik fra båd og hovedsageligt i bredzonen af søen, samt et stykke opstrøms og nedstrøms søen.

2.5 Laboratorieforsøg

2.5.1 Salinitetstest:

Salinitetstestene bestod af tre dele. Et overlevelsesforsøg, et kropvandindholds-forsøg (BWC) og et histologiforsøg. Alle salinitetstestene blev udført i det samme

kølerum, som snæbterne befandt sig i. Alt saltvand til forsøg udført i dette speciale blev lavet ud fra vand fra Lindved Å eller hanevand (RNA/Na⁺,K⁺-ATPase forsøget og akklimeringsforsøget den 27/11-02) tilsat Coral Reef Red Sea Salt, som havde en ionsammensætning meget lig vand fra Nordsøen (Pers. komm. Cliff Rankin). Saltvandet blev minimum forberedt 24 h før forsøgenes start for at være sikker på at saltet var ordentligt opløst, og saliniteten blev kontrolleret og justeret med salinitetsmåler (YSI 85, YSI Incorporated), og osmometer (Wescor 5500 Vapour pressure osmometer, Logan, USA). Ferskvandet der blev brugt til forsøg var fra Lindved Å, bortset fra RNA/Na⁺,K⁺-ATPase forsøg og akklimeringsforsøget den 27/11-02 som var hanevand.

For at fastslå størrelsen på de snæbler der indgik i salinitetstestene blev der udtaget 10 tilfældige snæbler fra samme aldersgruppe som dem der skulle indgå i forsøgene. Snæbterne blev aflivet, duppet på papir og målt med lineal og vejjet.

Overlevelsesforsøg: Til overlevelsesforsøgene blev der anvendt de samme akvarier som snæbterne gik i. Der blev afmålt 10 L vand i hvert akvarie. Følgende grupper indgik i forsøgene: En ferskvandskontrolgruppe (FV), en 10 promille-gruppe (10ppt), en 18ppt, en 25ppt og en 30ppt.

Snæbterne blev ikke fodret i 24 timer før forsøgsstart. De blev fanget i et akvarienet umiddelbart før forsøgsstart og overført til de respektive akvarier. Derefter registreredes antallet af døde fisk efter 1, 2, 3, 4, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 og 168 timer i de enkelte grupper. Tilstanden af de overlevende snæbler i de enkelte grupper blev også vurderet. Der blev ikke skiftet vand i de 7 dage forsøget varede, da det vurderedes at forureningen ikke ville blive kritisk, ligesom det ville øge fiskenes stressniveau. Snæbterne blev tidligst fodret 6 timer efter overførsel.

Vandindholdsforsøg (BWC): Vandindholdsforsøgene blev udført i akvarier påfyldt 5 L vand (LxBxH (cm): 32,5x17,5x18,5 eller 25x15,5x15). Snæbterne blev ikke fodret fra 24 timer før forsøgsstart og gennem forsøget. De blev fanget med akvarienet umiddelbart før forsøgsstart og overført til de respektive akvarier. Der blev anvendt samme saliniteter som i overlevelsesforsøgene. Der blev overført 30 snæbler til hver salinitet, hvoraf de 20 skulle bruges til BWC og 8 til histologi.

Efter 4 og 24 timer blev der udtaget 10 snæbler fra hver gruppe. Snæblerne blev overført til et bægerglas (1L) med vand af samme salinitet og overført til laboratoriet. Her blev hver enkelt snæbel fanget med pincet, og aflivet ved at en dissektionsnål blev ført gennem hovedet. Herefter blev snæblen forsigtigt duppet med et stykke filterpapir for at fjerne vand fra overfladen. Snæblen overførtes til et stykke forvejet staniol og vejtes til nærmeste 0,1 mg. Derefter blev snæblerne tørret ved ca. 100°C i 24 timer og vejtes igen. Vandindholdet blev beregnet i procent af vådvægten.

Immunohistokemi forsøg: Snæblerne til histologi gik sammen med de snæbler der skulle bruges til BWC. 8 snæbler fra hver salinitet blev efter 48 timer udtaget til histologi. Fiskene blev med net overført til bægerglas (1L) med samme vandtype som de kom fra, og overført til laboratoriet. Her blev de aflivet og overført til plasticbægre indeholdende paraformaldehydfixativ (Paraformaldehyd 4%, NaCl 0,9%, NaH₂PO₄ monohydrat 5 mM), og placeret i køleskab ved ca. 4°C. Efter 24 timer blev paraformaldehydfixativet udskiftet med 70% ethanol, som igen blev udskiftet efter 48 timer. Snæblerne blev opbevaret i køleskab til senere brug.

Salinitetstest I: 0-4 dage gamle snæbler blev udtaget fra gruppen der klækkede den 4-7/3-02. Forsøget kørte fra den 7/3-02 til den 14/3-02. Vandtemperaturen var 5,0 ±1°C, og der var 80 snæbler i hver gruppe. Gennemsnitsvægten var 7,5 mg og gennemsnitslængden 12,1 mm.

Salinitetstest II: 15-19 dage gamle snæbler blev udtaget fra gruppen der klækkede den 27/2-3/3-02. Forsøget kørte fra den 18/3-02 til den 25/3-02. Vandtemperaturen var 5,0 ±1°C, og der var 80 snæbler i hver gruppe. Gennemsnitsvægten var 7,9 mg og gennemsnitslængden 12,6 mm.

Salinitetstest III: 32-35 dage gamle snæbler blev udtaget fra gruppen der klækkede den 27/2-3/3-02. Forsøget kørte fra den 7/4-02 til den 14/4-02. Vandtemperaturen var 5,0 ±1°C, og der var 80 snæbler i hver gruppe. Gennemsnitsvægten var 10,4 mg og gennemsnitslængden 13,0 mm.

Salinitetstest IV: 148-166 dage gamle snæbler blev udtaget fra gruppen der klækkede mellem den 27/2 og 16/3-02. Forsøget kørte fra den 12/8-02 til den 19/8-02. Vandtemperaturen var $12,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, og der var 50 snæbler i hver gruppe. Gennemsnitsvægten var 14,1 mg og gennemsnitslængden 33,6 mm.

Der udførtes to salinitetstest med helt, med samme fremgangsmåde som for snæblerne. Dog var grupperne her: FV, 10ppt, 14ppt, 18ppt og 25ppt.

Salinitetstest HI: Heltene var i dette forsøg ca. 50 dage gamle, og kom fra Fishcon A/S i Viborg. Helten blev afhentet i Viborg d. 31/5-02, og transporteret til Odense i to 20 L spande. Vandet var inden transporten gennemluftet med ilt, og derved overmættet. På grund af heltens størrelse blev det vurderet, at det ikke var nødvendigt med beluftning under transporten. Helten blev placeret ved 10°C , og gik i de to 20 L spande til forsøgsstart. Helten blev ikke fodret før forsøgsstart, og blev fodret med saltkrebs ca. 6 timer efter forsøgsstart. Forsøget kørte fra den 3/6-02 til den 10/6-02. Vandtemperaturen var $10,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, og der var 80 helt i hver gruppe i overlevelsesforsøget, samt 30 stk i hver gruppe til BWC og histologi. Helten havde en gennemsnitsvægt på 42 mg og en gennemsnitslængde på 21,2 mm.

Salinitetstest HII: Heltene var i dette forsøg ca. 60 dage gamle, og blev hentet hos Fishcon A/S den 10/6-02. Proceduren var den samme som ved det forrige forsøg, men da disse helt var noget større end i den første test, blev vandet beluftet med ilt fra flaske under transport. Forsøget kørte fra den 12/6-02 til den 19/6-02. Vandtemperaturen var $10,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, og der var 80 helt i hver gruppe i overlevelsesforsøget, samt 30 stk til BWC og histologi, og de havde en gennemsnitsvægt på 440 mg og en gennemsnitslængde på 40,3 mm.

2.5.2 Akklimeringsforsøg:

I akklimeringsforsøgene indgik to grupper, en ferskvandsgruppe (FV) og en saltvandsgruppe, og for begge grupper var der en overlevelsesdel og en kropsvandindholdsdel (BWC). Den initiale salinitet i saltvandsgruppen var 10ppt, som så blev hævet med 5ppt hver fjerde dag. Hævningen foregik ved at promillen

blev øget med 1ppt i timen. Der blev anvendt en 10% saltvandsopløsning, som blev tilsat med et bægerglas, og saliniteten blev kontrolleret ved hjælp af en salinitetsmåler (YSI 85, YSI Incorporated). Der blev anvendt de samme akvarier som i salinitetsforsøgene til henholdsvis overlevelse og BWC. Start volumen var 10 L i overlevelsesdelen og 5 L i kropsvandindholdsdelen. Denne mængde varierede i saltvandsgruppen, som følge af tilsætning af yderligere vand. Der blev dog fjernet vand med mellemrum for at holde et nogenlunde konstant volumen.

Proceduren for BWC var den samme som i salinitetstestene med snæbel, og samplingen blev udført lige inden saliniteten hævedes. For overlevelsesdelen blev de døde snæbler fjernet og talt hver 24. time. Tilstanden af de resterende snæbler blev samtidigt vurderet.

Akklimeringsforsøg I: 44-48 dage gamle snæbler blev taget fra gruppen der klækkede fra den 8-12/3-02. Vandtemperaturen var $5,0 \pm 1^\circ\text{C}$, og der var 80 snæbler i hver gruppe i overlevelsesforsøget, 50 i hver gruppe i BWC, og de havde en gennemsnitsvægt på 13,1 mg og en gennemsnitslængde på 13,8 mm.

Akklimeringsforsøg II: 255-273 dage gamle snæbler blev udtaget fra fisk der klækkede mellem den 27/2 og 16/3-02. Vandtemperaturen var $13,0 \pm 1^\circ\text{C}$, og der var 40 snæbler i hver gruppe i overlevelsesforsøget, 50 i hver gruppe i BWC, og de havde en gennemsnitsvægt på 690 mg og en gennemsnitslængde på 50 mm.

2.6 Drikkerate:

Drikkerate forsøgene fandt sted 26/8-25/9-02. Snæblerne var overlevende fra salinitetstest IV, og blev suppleret med fisk fra karret i kælderen. Vandtemperaturen var $15,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Der blev målt drikkerate ved 18 ppt, 25 ppt og i ferskvand (FV). Ferskvandsforsøgene blev udført i en plasticbalje der kunne rumme ca. 50 L, mens saltvandsforsøgene blev udført i en plasticboks der kunne rumme ca. 20 L. Vandet i de to baljer var inden forsøgene anvendt til måling af drikkerate hos ørreder i forbindelse med et laboratoriekursus på Instituttet. Der måltes først ved 25 ppt, og vandet blev så fortyndet til 18 ppt. Saltvandet blev gennemluftet med luftsten, mens

der ikke var beluftning i ferskvandet. Som markør blev der anvendt den radioaktive gamma emitter $^{51}\text{Chrom-EDTA}$.

Der blev anvendt 20 snæbler i hver gruppe. Ved forsøgets start blev fiskene overført til det eksperimentelle akvarium med vand tilsat $^{51}\text{Chrom-EDTA}$ ($10\mu\text{Ci/l}$). Ti fisk blev overført til et skyllekar med non-radioaktivt vand efter 2 og 4 timers inkubation. Her opholdt de sig i 2 timer for at fjerne radioaktiv label fra overfladen af huden og gællerne. Derefter blev de aflivet, vejede og individuelt overført til scintillationsvials, og radioaktiviteten målt (1480 Wizard, Automatic gamma counter). Den specifikke radioaktivitet i FV og SV-karret blev efterfølgende bestemt ved tælling på vandprøver på hhv. 1, 2 og 3 ml. Efter endt måling blev drikkeraten udregnet ved hjælp af følgende formel:

$$\text{DR (ml/kg/time)} = \frac{\text{CPM}_{\text{tarm}} * 60 * \text{vandprøvevolumen (ml)}}{\text{CPM}_{\text{vand}} * \text{vægt} * \text{tid}}$$

2.7 Immunohistokemisk farvning:

Snæblerne der blev udtaget i forbindelse med salinitetstestene og placeret i ethanol, blev i efteråret 2002 indstøbt i paraffin v.h.a. en automatisk histokinette (Microm HMP 110, Walldorf, Tyskland). Efter dette kunne de ønskede $5\mu\text{m}$ snit laves og placeres på objektglas (Menzel SuperFrost). Dette blev udført på en mikrotom (Microm HM 355, Walldorf, Tyskland). Det primære interesse område var gælleområdet, og det blev løbende kontrolleret på mikroskop, hvorfra snittene blev udtaget.

Immunofarvningsproceduren for undersøgelse af Na^+, K^+ -ATPasens alpha-subunit og $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter var identisk bortset fra koncentrationerne af de primære antistoffer.

Immunofarvning:

Metoden der blev anvendt er beskrevet af Seidelin og Madsen (1999). Grundlaget for teknikken er reaktionen mellem et specifikt protein (antigen) og et primært antistof. Da dele af Na⁺,K⁺-ATPase enzymets α -subunit er meget velbevaret mellem organismer (Ura et al., 1996), er det muligt at opnå specifik krydsreaktion ved at bruge heterologe antistoffer. De anvendte primære antistoffer og de anvendte fortyndinger var: Rabbit anti-Na⁺,K⁺-ATPase (Ura et al., 1996), fortyndet 200x i PBS og T4-NKCC (Lytle, 1995), fortyndet 50x i PBS.

Vævssnit blev placeret ved 60°C i 12-16 timer for at fæstne snittet. Derefter placeredes objektglas i en glasvugge. De blev afparaffineret og rehydreret ved at blive ført gennem skåle med faldende koncentrationer af alkohol i følgende rækkefølge: 2x3 min. i xylol, 2x1 min. i absolut EtOH, 2x1 min. i 96% EtOH, 1 min. i 70%, 2x5 min. i citratbuffer (0,1 mM tri-Natriumcitrat-dihydrat, pH 6). Derefter blev snittene kogt i mikrobølgeovn for at øge tilgængeligheden af antigen. Skålen med snittene blev placeret i mikrobølgeovn tilsat kogestov på trin 4 i 4 min. Skålen afkølede i 5 min og derefter opvarmet på trin 3 i 4 min. Snittene fik så lov at stå i den varme citrat-buffer i 30 min. Næste trin var at minimere den endogene peroxidase aktivitet ved at reagere snittene med brintoverilte. Vuggen med snit blev placeret i en skål med 3% H₂O₂ i PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄*2H₂O, KH₂PO₄, pH 7,3) i 30 min. ved stuetemperatur. Derefter blev snittene vasket 2x5 i PBS. Der blev så tørret rundt om snittene med Kleenex, og en ring blev tegnet med en PAP-pen for at lægge en vandskyende hinde, der skulle forhindre de tilsatte opløsninger i at løbe af glasset. Så blev der tilsat 100 μ l 3% (w/v) bovint serum albumin (BSA) opløst i PBS til hvert snit for at blokere nonspecifikke sites. Snittene blev inkuberet i 30 min. ved stuetemperatur i en præparat kasse med destilleret H₂O i bunden. Derefter blev væsken suget væk fra objektglassene med Kleenex uden at snittene tørrede ud. Det primære antistof blev så tilsat til snit (100 μ l pr. snit) Snittene blev inkuberet natten over i en præparat kasse med destilleret H₂O i bunden ved 4°C. Kassens kant blev tapet til. Næste dag blev snittene vasket 2x5 min. i PBS, hvorefter der blev tørret rundt om dem med Kleenex uden at snittene tørrede ud. Så blev der tilsat sekundært antistof (Horseradish Peroxidase-konjugeret Goat Anti-rabbit IgG (H+L), fortyndet 200x i PBS), til snit (100 μ l pr. snit), og de blev inkuberet i 1 time ved 37°C i en

forvarmet præparat kasse med destilleret H₂O i bunden. Kassens kant blev tapet til. Efter dette blev væsken rystet af glassene og de blev placeret i en vugge, og vasket 2x5 min. i PBS. Væsken blev så rystet af og objektglassene blev placeret i en præparat kasse med destilleret H₂O i bunden. Her blev der tilsat 100µl pr. snit af en opløsning forberedt umiddelbart inden. Denne opløsning bestod af en kvart DAB-tablet (3,3-diaminobenzidin tetrahydrochlorid) opløst i 2,5 ml PBS tilsat 18,75 µl 3% H₂O₂. Snittene blev så inkuberet 10 min. ved stuetemperatur i en præparat kasse. Derefter blev snittene placeret i en vugge og renses i destilleret H₂O i 5 min. Så blev snittene farvet i Mayers hæmatoxylin i 3 min, og renses i rindende destilleret H₂O til farven var væk. Så blev vævene dehydreret ved at overføre objektglassene fra PBS til xylen med de samme tidsintervaller som i rehydreringen, dog blev der brugt 2x5 min. i absolut EtOH. Objektglassene blev monteret med dækglasser med en xylenbaseret lim (Eukit, Freiburg, Tyskland), Repræsentative digitale billeder af snittene blev taget med et Leica DMR 200 og behandlet ved hjælp af programmet Leica DC Viewer.

2.8 RNA/Na⁺,K⁺-ATPase:

Forsøget der skulle give et billede af udviklingen af Na⁺,K⁺-ATPase aktiviteten og niveauet af mRNA for Na⁺,K⁺-ATPase og Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter i gællerne hos snæbelen over tid i ferskvand (FV) og saltvand (25ppt), startede den 11/1-03. Snæbelerne havde en størrelse på 7-9 cm og 2-4 g. Vandtemperaturen var 13,0 ±1°C. I forsøget anvendtes plasticakvarier (14,6 L) med 10 liter vand.

Der blev placeret 24 snæbler i FV og 24 fisk i 25 ppt (12 snæbler per akvarie). Der blev udtaget 6 snæbler fra hver gruppe efter 2, 7 og 10 dage. Der blev dog kun udtaget gælle væv til RNA efter 2 og 10 dage. Snæbelerne blev bedøvet med slag til hovedet og en dissektionsnål blev ført gennem hovedet. Gælleapparatet blev omgående dissekeret ud, og anden gællebue blev overført til 1,5 ml eppendorfrør med SEI-buffer til måling af Na⁺,K⁺-ATPase aktivitet, frosset i flydende nitrogen og opbevaret ved -80°C. Resten af gælleapparatet blev overført til JA-20 plasticrør med 800µl D-opløsning (4 M Guanidinium Thiocyanate, 0,5 %Na-Lauryl Sarcosine, 25 mM NaCitrat, 0,3% Antifoam, 100 mM β-mercaptoethanol, pH=7) og homogeniseret

med Ultraturax knivbladshomogenisator. Derefter overført til flydende nitrogen, og opbevaret ved -80°C .

2.8.1 Northern blotting (mRNA analyse):

Til at analysere mRNA for Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit og NKCC i gælle væv blev der anvendt Northern blotting, som består af tre trin: Elektroforetisk adskillelse af mRNA på agarose gel, overførsel og fixering af RNA til nylonmembran og hybridisering med en specifikt mærket cDNA probe.

RNA blev oprenset ved chloroform-phenol ekstraktion (Chomzynski & Sacchi, 1987) som modificeret af Madsen et al. (1995). Den videre RNA analyse blev foretaget som beskrevet af Madsen et al. (1995) og Seidelin et al. (2001).

Total RNA ($20\mu\text{g}$) fra gællerne af 6 FV og 6 SV snæbler fra dag 2 og 10 blev analyseret ved formaldehyd gel elektroforese på den samme gel. RNA blev opløst i 1x MOPS buffer (20 mM 3-(N-morpholin)propansulfonsyre, 5 mM Na-acetat, 0,5 mM EDTA, pH 7,0), 2,2 M formaldehyd, 50% formamid og denatureret ved 65°C . Derefter blev der tilsat 50% glycerol, 1,0 mM EDTA og 0,25% bromphenolblåt. Elektroforesen blev gennemført med 5 V/cm gennem en 1% agarose (Seakem, FMC BioProducta, Rockland, ME), 1,2 M formaldehyd, 1xMOPS buffer, 0,2% iodoacetamid gel. Efter elektroforesen blev RNA overført til en nylonmembran (Zeta probe, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ved kapillær blotting. RNA blev fixeret på membranen ved UV-crosslinking med UV Stratalinker 1800.

Membranen blev præ-hybridiseret ca. 3 timer ved 42°C i 10 ml præ-hybridiseringsopløsning indeholdende 50% deioniseret formamid, 5x SSC (0,75 M NaCl, 75 mM Na_3citrat , pH 7,0), 1% SDS (Natrium dodecyl sulfat), 5x Denhardts opløsning (0,1% Ficoll, 0,1% polyvinyl pyrrolidon, 0,1% bovin serum albumin), 0,1% Na-pyrofosfat, 1 mM EDTA, 5 mg denatureret kalvethymus DNA og 2 mg denatureret gær transfer RNA. Komplementære cDNA prober blev radioaktivt mærket med $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP ved hjælp af RadPrime DNA Labeling kits (GibcoBRL). Den anvendte cDNA template var fra ørred (*Salmo trutta*) i hybridiseringerne for α - Na^+, K^+ -ATPase (Seidelin & Madsen, ikke publiceret) og $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter (Tipsmark et al., 2002), og fra regnbueørred i β -actin hybridiseringen (Pakdel et al., 1989). Proberne blev oprenset ved brug af spinsøjler (ProbeQuant, Pharmacia, Uppsala, Sweden)

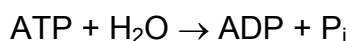
som tilbageholder uindkorporerede nukleotider, denatureret og tilsat præ-hybridiseringsopløsningen og hybridiseret i ca. 16 timer. Efter endt hybridisering blev membranen vasket to gange i 2x SSC/ 0,1 %SDS i ca. 15 min ved stuetemperatur, og i 0,1x SSC/0,1 %SDS ved 45°C i ca.15 min. Membranen blev placeret på en phosphor imaging screen, og analyseret for radioaktivitet (Storm, Molecular Dynamics, CA, USA). Efter analyse blev membranen strippet ved kogning og genbrugt til videre hybridisering.

Data for mRNA α -Na⁺,K⁺-ATPase og Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter blev normaliseret i forhold til mRNA β -actin ved hjælp af ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics).

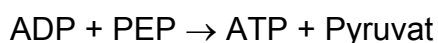
2.8.2 Måling af Na⁺,K⁺-ATPase aktivitet:

Aktiviteten af Na⁺,K⁺-ATPase i snæblens gæller er målt ved en metode der baseres på et koblet enzym-assay. I assayet indgår tre enzymer: (1) Na⁺,K⁺-ATPase, (2) pyruvatkinase (PK) og (3) laktatdehydrogenase (LDH).

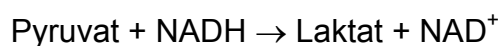
(1)



(2)



(3)



Under optimerede forhold vil hydrolyse af et mol ATP resultere i omsæning af et mol NADH til NAD⁺. Oxidationen af NADH til NAD⁺ kan aflæses spektrofotometrisk ved bølgelængden 340 nm. Det udnyttes at Na⁺,K⁺-ATPase enzymet hæmmes specifikt af ouabain idet Na⁺,K⁺-ATPase aktiviteten måles som forskellen i NADH (ATP) omsætning i assays med og uden ouabain. For at lave en præcis eksperimentel bestemmelse af forholdet mellem omsætning af ATP til ADP og fald i absorbans (NADH: 340 nm) bestemmes absorbansændringen for en given mængde ADP i et separat kalibreringsassay. Der laves en standardkurve med omsætning af 0, 3, 7,5 og 15 nmol ADP/brønd. Herved kan ændringen af OD³⁴⁰/nmol ADP bestemmes. Denne faktor indgår i udregningen af enzymaktiviteten.

Procedure:

Gælle væv som var udtaget efter 2, 7 og 10 dage, blev homogeniseret i 250 μ l SEIDM-buffer (300mM Sucrose, 20 Na_2EDTA , 50 mM Imidazol, 0,1% Na-Deoxycholat, 10 mM Mercaptoethanol: 0,7 μ l/ml). Homogenatet blev centrifugeret i 30 sek. ved 5000 g. Supernatanten blev fjernet og holdt på is. Assayet blev startet ved at 10 μ l homogenat blev tilsat 270 μ l assaymix i triplikater i 96-well brøndplader. De endelige assaykoncentrationer var: Na^+ 49,1 mM, K^+ 10,4 mM, Mg^{2+} 1,8 mM, ATP 0,5 mM, PEP 0,5 mM, NADH 0,085 mM, PK 2,6 units/ ml, LDH 2,0 units/ml, KCN 0,4 mM, EDTA 0,71 mM, Imidazol 50 mM med og uden 0,5 mM oubain.

Efter tilsætning af assaymix med og uden oubain blev brøndene rystet og absorbansen ved 340nm blev målt hvert 20. sek i 10 min på pladelæser (Spectra-Max Plus, Molecular Devices, Ca, USA) ved 25 °C, og ændringen pr. min blev beregnet v.h.a. programmet Softmax (Molecular Devices)

Na^+ , K^+ -ATPase aktiviteten blev normaliseret i forhold til proteinmængden i homogenatet. Proteinindholdet blev bestemt efter Lowry's metode (Lowry et al., 1951) modificeret til brug af pladelæser.

Proteinbestemmelse:

Til hver brønd blev der tilsat 200 μ l blandingsreagens (2% Na_2CO_3 + 0,4% (w/v) NaOH (0,1M); 1% (w/v) CuSO_4 ; 16% (w/v) Na_2 -Tartrat) og 10 μ l blindprøve (SEIDM-buffer), standard (0-5 mg/ml) eller homogenat. Pladen blev rystet i 10 min. og Folin's reagens (Folin-Ciocalteus phenol reagens fortyndet 1:2 i dest. vand) blev tilsat hver brønd. Pladen blev rystet i 1 min. og absorbansen målt ved 750 nm. Proteinindholdet kunne så bestemmes ud fra standardkurven.

Na^+ , K^+ -ATPase aktiviteten blev beregnet i μ mol ADP/mg protein/time ved følgende formel:

$$\Delta\text{ABS}_{340}/\text{min} \times 60 \text{ min}/t$$

$$\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase aktivitet} = \frac{\Delta\text{ABS}_{340}/\text{min} \times 60 \text{ min}/t}{(1 \times 10^3 \text{ nmol}/\mu\text{mol} \times \Delta\text{OD}^{340}/\text{nmol ADP}) \times (0,01 \text{ ml} \times \text{mg protein/ml})}$$

2.9 Vækst:

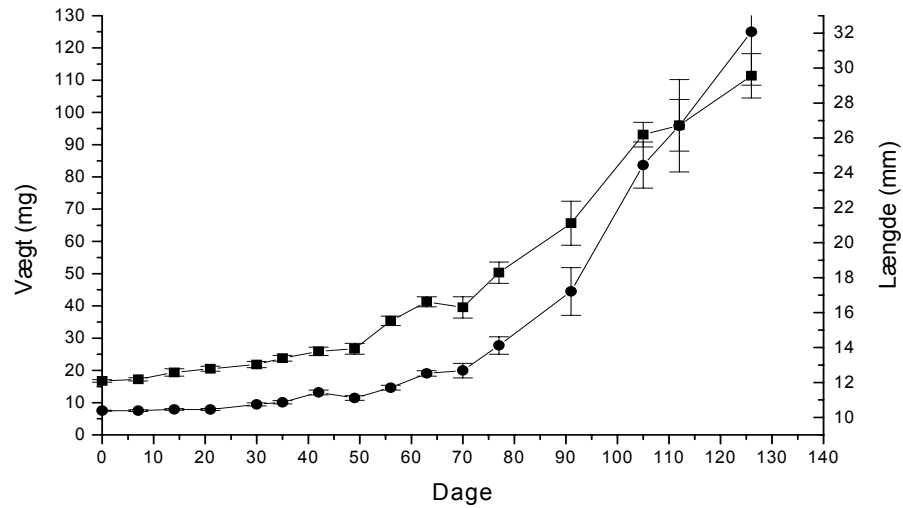
For at kunne følge den morfologiske udvikling, blev der taget digitale billeder af forskellige aldersgrupper. I de første 18 uger efter klækning blev der udtaget 10 styk snæbler med en eller to ugers mellemrum. Snæblerne kom fra det samme akvarium. De blev målt og vejede, og derefter udregnedes middelværdien af de to parametre.

2.10 Statistik:

Data blev analyseret ved hjælp af variansanalyse (en-/to-vejs ANOVA) efterfulgt af en Bonferroni korrigeret Fisher's Least Significant Difference (LSD) test. Data blev om nødvendigt transformeret for at opfylde ANOVA-betingelser om normalitet og varianshomogenitet (Zar, 1984). I alle tilfælde blev et signifikansniveau på $\alpha=0,05$ anvendt. Statistiske analyser blev udført ved hjælp af SigmaStat Ver. 2.03 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

3. Resultater:

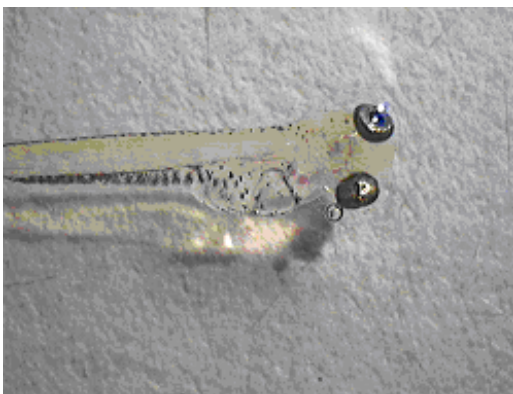
3.1 Vækst og udvikling:



Figur 3.1.1. Figuren viser udviklingen i snæbellarvernes længde (●) og vægt (■) fra klækning og 18 uger frem. Hvert punkt repræsenterer middelværdien af 10 fisk \pm SEM.

Snæbterne havde en gennemsnitsvægt på 7,5 mg og en gennemsnitslængde på 12,1 mm ved klækning og efter 18 uger var gennemsnitsvægten 125 mg og gennemsnitslængden 29,6 mm.

På figur 3.1.2 til 3.1.7 ses den morfologiske udvikling af snæbten.



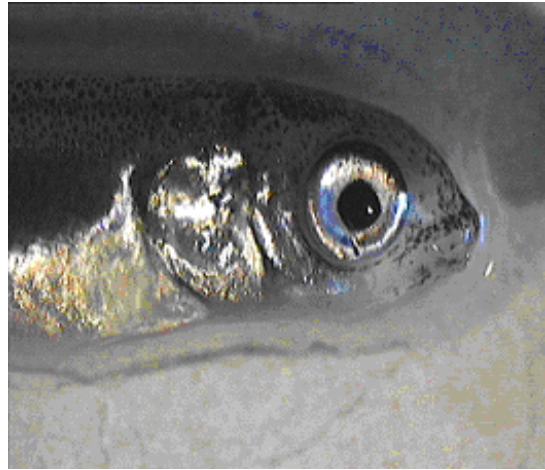
Figur 3.1.2. 0 dage gammel snæbellarve
7,5 mg; 12,1 mm



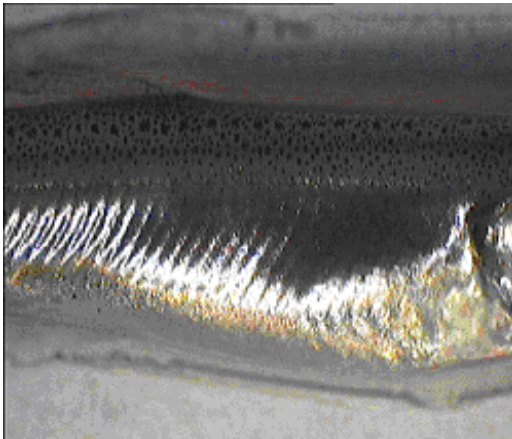
Figur 3.1.3. 70 dage gammel snæbellarve
20 mg; 17,1 mm.



Figur 3.1.4. 90 dage gammel snæbellarve.
45,7 mg; 22,1 mm.



Figur 3.1.5. 130 dage gammel snæbel.
186 mg 32,5 mm.



Figur 3.1.6. 130 dage gammel snæbel.
186 mg; 32,5 mm.



Figur 3.1.7. 210 dage gammel snæbel.
690 mg; 50 mm.

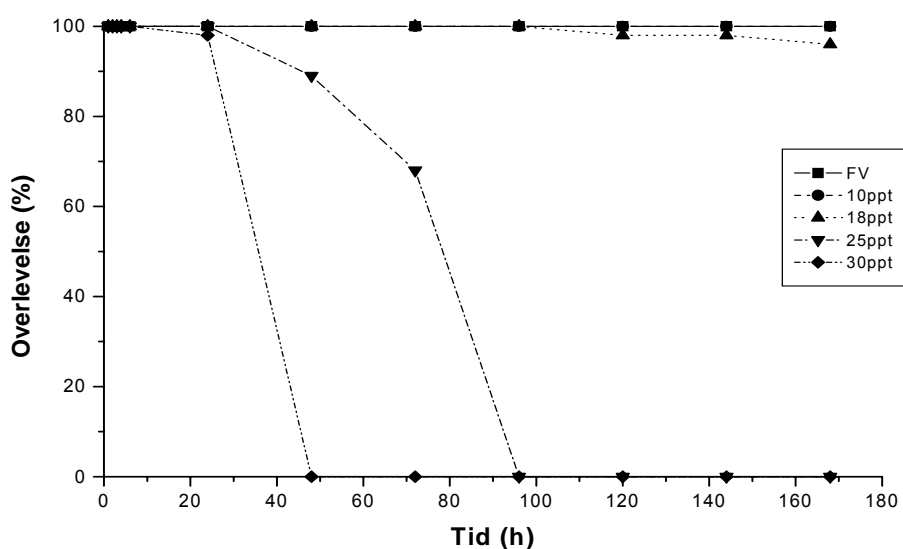
På figur 3.1.2 ses en nyklækket snæbellarve med blommesæk. På dette tidspunkt var munden ikke åbnet, og larven havde ingen skæl. På fig. 3.1.3 ses en snæbellarve på 20 mg og 17,1 mm. Larven havde endnu ikke udviklet skæl og finner. I bugen ses *Artemia salinas* som larven blev fodret med. Snæbellarven på fig. 3.1.4 var begyndt at anlægge skæl på bugen, og gællelåget begyndt at dannes. På fig. 3.1.5 ses et udviklet gællelæg dækket af skæl og på dette tidspunkt defineres snæblen som værende snæbelyngel. På fig. 3.1.6 ses midterdelen af den samme snæbel fra fig. 3.1.5. Det ses, at den ventrale del er dækket af skæl. På fig. 3.1.7 ses en fuldt metamorforseret snæbel. Snæblen er fuldt dækket af skæl og finnerne er differentieret. Snæbler på dette stadie betragtes stadig som værende på

yngelstadiet.

3.2 Salinitetstest:

Salinitetstest I:

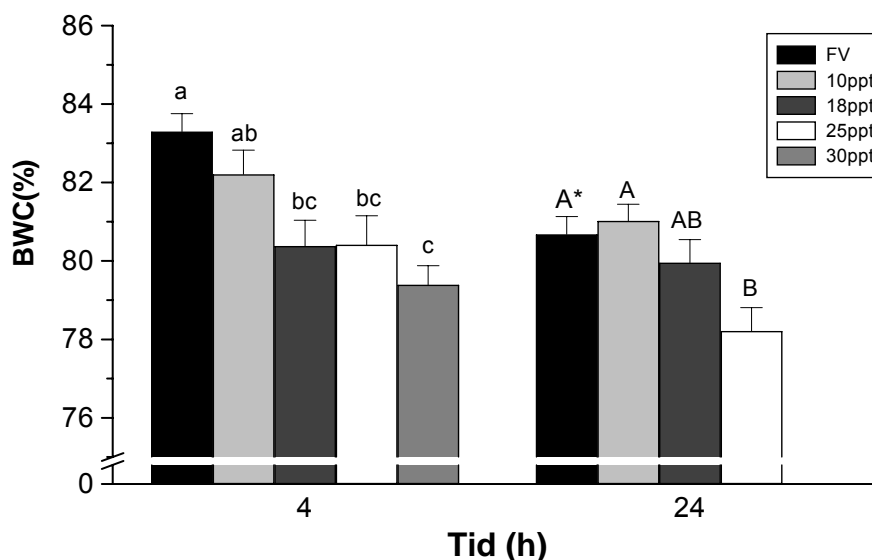
Figur 3.2.1. viser den procentvise overlevelse af 0-4 dage gamle snæbellarver (gns. 7,5 mg;12,0 mm) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden.



Figur 3.2.1. Procentvis overlevelse af 0-4 dage gamle snæbellarver (n=80) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden. Temperatur 5,0 °C. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Overlevelsen af snæbellarverne efter 24 timer var 100% for FV, 10 ppt, 18 ppt og 25 ppt, mens den var 98% for 30 ppt. Efter 48 timer faldt den i 30 ppt til 0, og i 25 ppt til 89%, mens den forblev 100 % for FV, 10 ppt og 18 ppt. Efter 72 timer faldt 25 ppt til 68%, mens FV, 10 ppt og 18 ppt forblev 100%. Efter 96 timer var alle snæbellarver i 25 ppt døde og larverne i 18 ppt begyndte at vise svaghestegn, der viste sig ved at snæbellarverne lagde sig på bunden. Efter 168 timer lå alle resterende snæbellarver (96%) i 18 ppt levende på bunden, men tog ingen føde til sig. I FV og 10 ppt var alle i live efter 168 timer, og de var aktive og tog føde til sig.

Figur 3.2.2 viser kropsvandindholdet (BWC) i procent i 0-4 dage gamle snæbellarver ved forskellige saliniteter efter 4 og 24 timer.

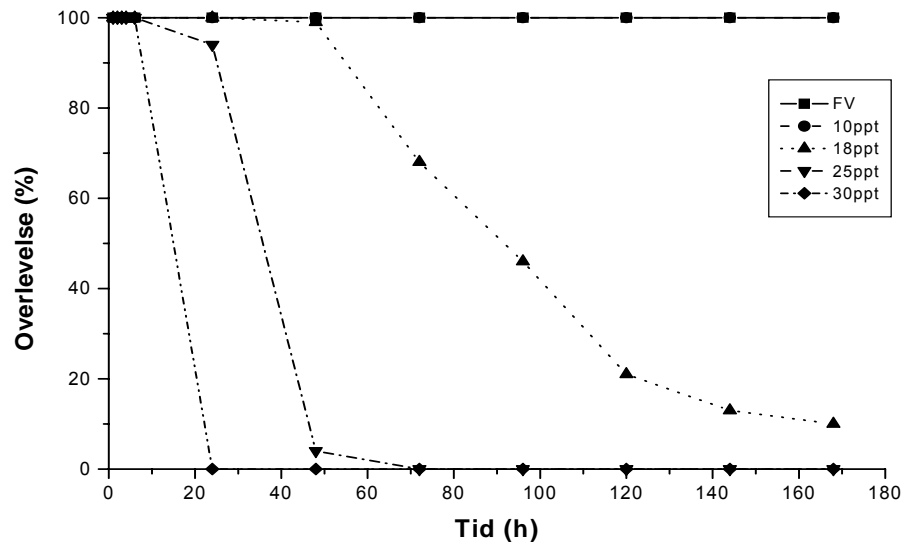


Figur 3.2.2. BWC (%) i 0-4 dage gamle snæbller efter 4 og 24 timer i FV og ved forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet ved middelværdien \pm SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige (P<0,05), mens (*) angiver signifikant forskel (P<0,05) mellem indbyrdes grupper ved 4 og 24 timer. BWC blev ikke målt ved 30 ppt efter 24 h da der ikke var overlevende.

Efter 4 timer ses en signifikant forskel mellem FV, 18 ppt, 25 ppt og så 30 ppt, samt mellem 10 ppt og 30 ppt. BWC i snæbellarverne faldt fra 83,3% i FV til 80,4% i 18 ppt og 25 ppt, og til 79,4% i 30 ppt. For alle grupper ses, at BWC faldt fra 4 til 24 timer, men der var kun signifikant forskel mellem snæbellarverne i FV. I mellem grupperne ved 24 timer var der signifikant forskel mellem FV (80,7%) og 25 ppt (78,2%) samt 10 ppt (81,0%) og 25 ppt.

Salinitetstest II:

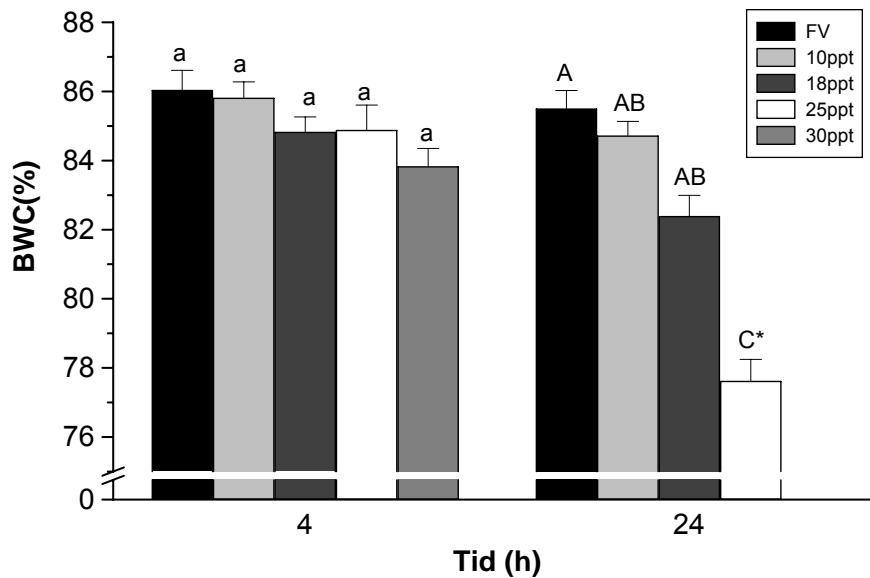
Figur 3.2.3 viser den procentvise overlevelse af 15-19 dage gamle snæbellarver (gns. 7,9 mg; 12,6 mm) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden.



Figur 3.2.3. Procentvis overlevelse af 15-19 dage gamle snæbellarver (n=80) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden. Temperatur 5,0 °C. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Overlevelsen for 30 ppt var 0% efter 24 h, og 94% for 25 ppt, mens den var 100% for FW, 10 ppt og 18 ppt. 18 ppt var dog begyndt at vise tegn på krise, og alle 25 ppt lå inaktive på bunden. Efter 48 timer var overlevelsen faldet til 4% for 25 ppt, mens den var 99% for 18 ppt og 100% for FV og 10 ppt. Efter 72 timer var alle 25 ppt døde, og overlevelsen for 18 ppt var nede på 68%. Efter 168 timer var alle FV og 10 ppt i live og aktive, mens der var 10% overlevelse i 18 ppt. Af disse var kun halvdelen aktive og tog føde til sig.

Figur 3.2.4 viser kropsvandindholdet (BWC) i procent i 15-19 dage gamle snæbellarver ved forskellige saliniteter efter 4 og 24 timer.

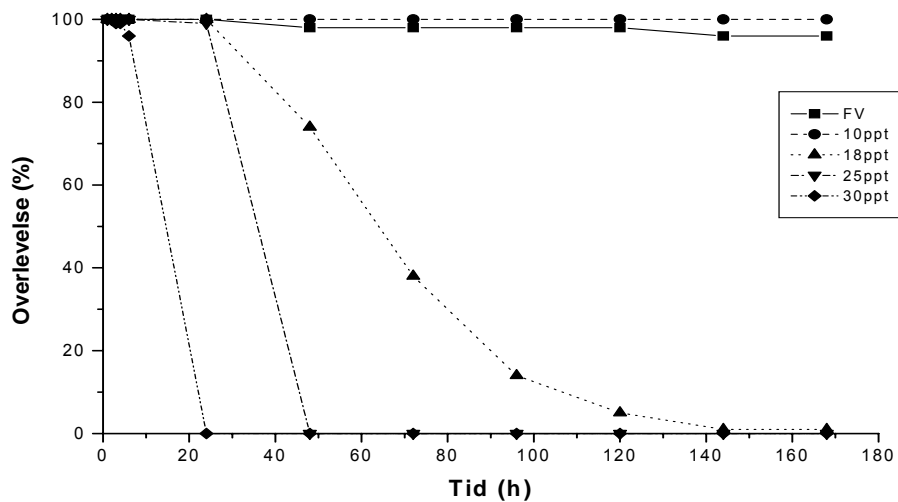


Figur 3.2.4. BWC (%) i 15-19 dage gamle snæbellarver efter 4 og 24 timer i FV og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet ved middelværdien \pm SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige ($P < 0,05$), mens (*) angiver signifikant forskel ($P < 0,05$) mellem indbyrdes grupper ved 4 og 24 timer. BWC blev ikke målt ved 30 ppt efter 24 h da der ikke var overlevende.

BWC i snæbellarverne i FV, 10 ppt, 18 ppt, 25 ppt og 30 ppt var ikke signifikant forskellig efter 4 timer, men der ses et fald fra 86,0% i FV til 83,8% i 30 ppt. BWC i snæbellarverne ændrede sig ikke signifikant fra 4 til 24 timer i FV, 10 ppt og 18 ppt, mens der var et signifikant fald i 25 ppt. I mellem grupperne efter 24 timer var der signifikant forskel mellem snæbellarverne i FV, 10 ppt, 18 ppt og så 25 ppt. BWC i snæbellarverne var 85,5% i FV, 82,4% i 18 ppt og 77,6% i 25 ppt.

Salinitetstest III:

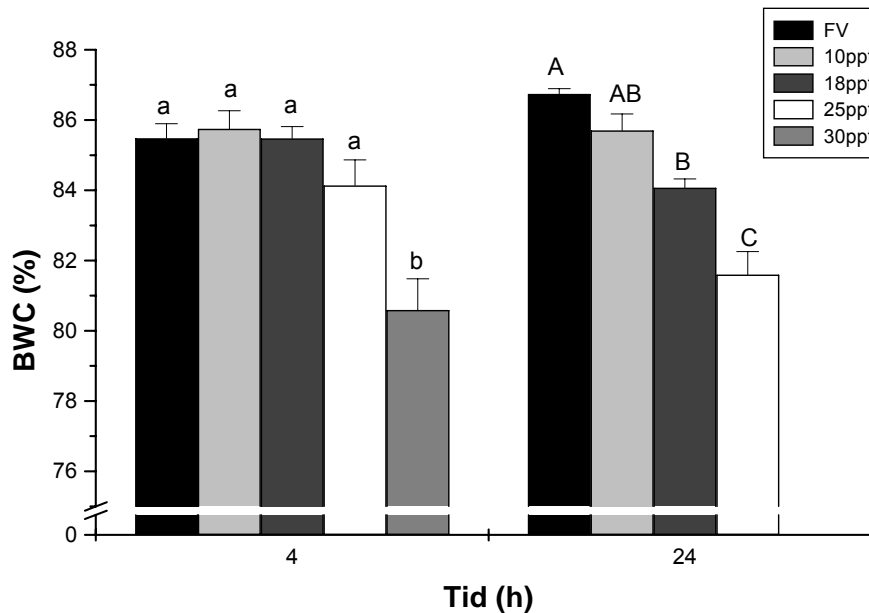
Figur 3.2.5. viser den procentvise overlevelse af 32-35 dage gamle snæbellarver (gns. 10,4 mg; 13,0 mm) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden.



Figur 3.2.5. Procentvis overlevelse af 32-35 dage gamle snæbellarver (n=80) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden. Temperatur 5,0 °C. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Efter 24 timer var den procentvise overlevelse hos snæbellarverne i 30 ppt 0%. I FV, 10 ppt og 18 ppt var den 100%, mens den var 99% i 25 ppt. Ca. 90% af de overlevende snæbellarver i 25 ppt lå dog inaktive på bunden, og ca. 50 af 18 ppt ligeledes. Efter 48 timer var alle snæbellarver i 25 ppt døde og kun få af de levende i 18 ppt var aktive. Efter 72 timer lå alle snæbellarver i 18 ppt på bunden, og udviste kun svage livstegn. Efter 168 timer var 99% af snæbellarverne i 18 ppt døde, mens alle i 10 ppt var i live og aktive. I FV overlevede 96%, og de var alle aktive.

Figur 3.2.6. viser kropsvandindholdet (BWC) i procent i 32-35 dage gamle snæbellarver ved forskellige saliniteter efter 4 og 24 timer.

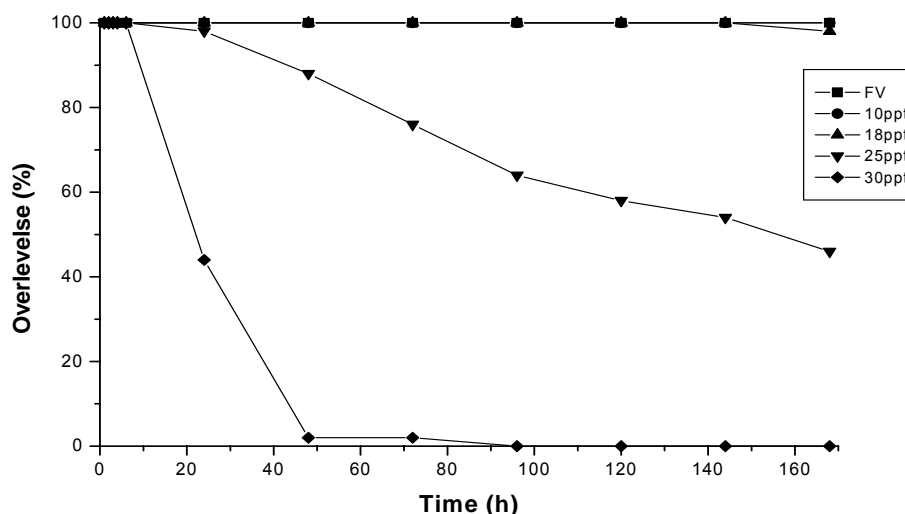


Figur 3.2.6. BWC (%) i 32-35 dage gamle snæbellarver efter 4 og 24 timer i FV og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet ved middelværdien \pm SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige ($P < 0,05$). BWC blev ikke målt ved 30 ppt efter 24 h da der ikke var overlevende.

Efter 4 timer observeredes en signifikant forskel i BWC mellem snæbellarverne i 30 ppt og i FV, 10, 18 og 25 ppt. BWC lå for de fire sidstnævnte grupper mellem 84,1% og 85,7, mens det var faldet til 80,6% i 30 ppt. Der var ikke nogen signifikant forskel indenfor de enkelte grupper fra 4 til 24 timer. Efter 24 timer var der signifikant forskel mellem snæbellarverne i FV og 18 ppt, FV og 25 ppt samt mellem 18 ppt og 25 ppt. BWC var i FV 86,7%, 84,0% i 18 ppt og 81,6% i 25 ppt.

Salinitetstest IV:

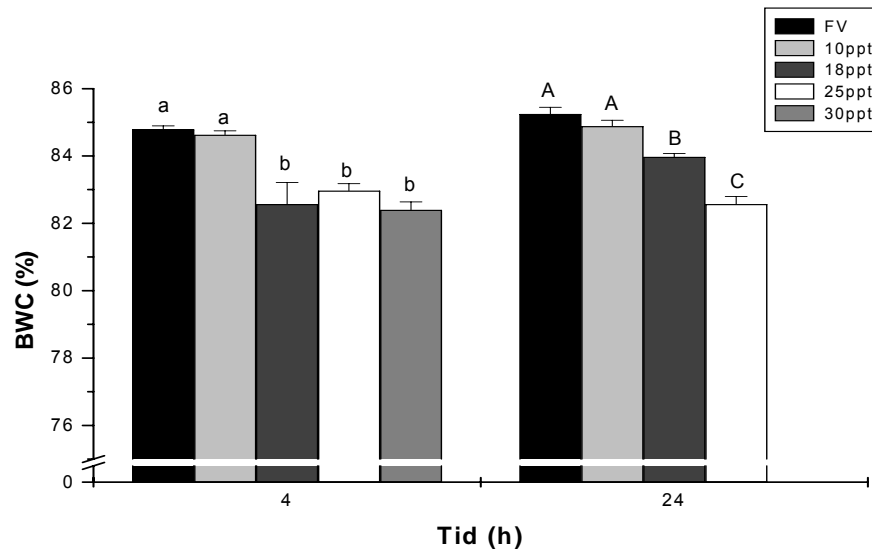
Figur 3.2.7. viser den procentvise overlevelse af 150-170 dage gammel snæbelyngel (gns.141 mg; 33,6 mm) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden.



Figur 3.2.7. Procentvis overlevelse af 150-170 dage gammel snæbelyngel (n=50) ved forskellige saliniteter som funktion af tiden. Temperatur 12,0 °C. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Efter 24 timer var den procentvise overlevelse af snæbelynglen i 30 ppt 44% og 98% i 25 ppt, mens den var 100% i FV, 10 og 18 ppt. Efter 48 timer var 2% af ynglen i live i 30 ppt, mens 88% var i live i 25 ppt. I 18 ppt var alle i live og aktive. Efter 72 timer var 2% i live i 30 ppt og aktive, og de 64% overlevende i 25 ppt var aktive. I 18 ppt var 100% i live og aktive. Efter 96 timer var alle individer i 30 ppt døde, mens de 64% overlevende i 25 ppt var aktive og samtidigt tog føde til sig. Alle individer i FV, 10 ppt og 18 ppt var aktive. Efter 168 timer var 46% af ynglen i 25 ppt i live og aktive. I 18 ppt var 98% i live og aktive, mens der var 100 % overlevelse i FV og 10 ppt.

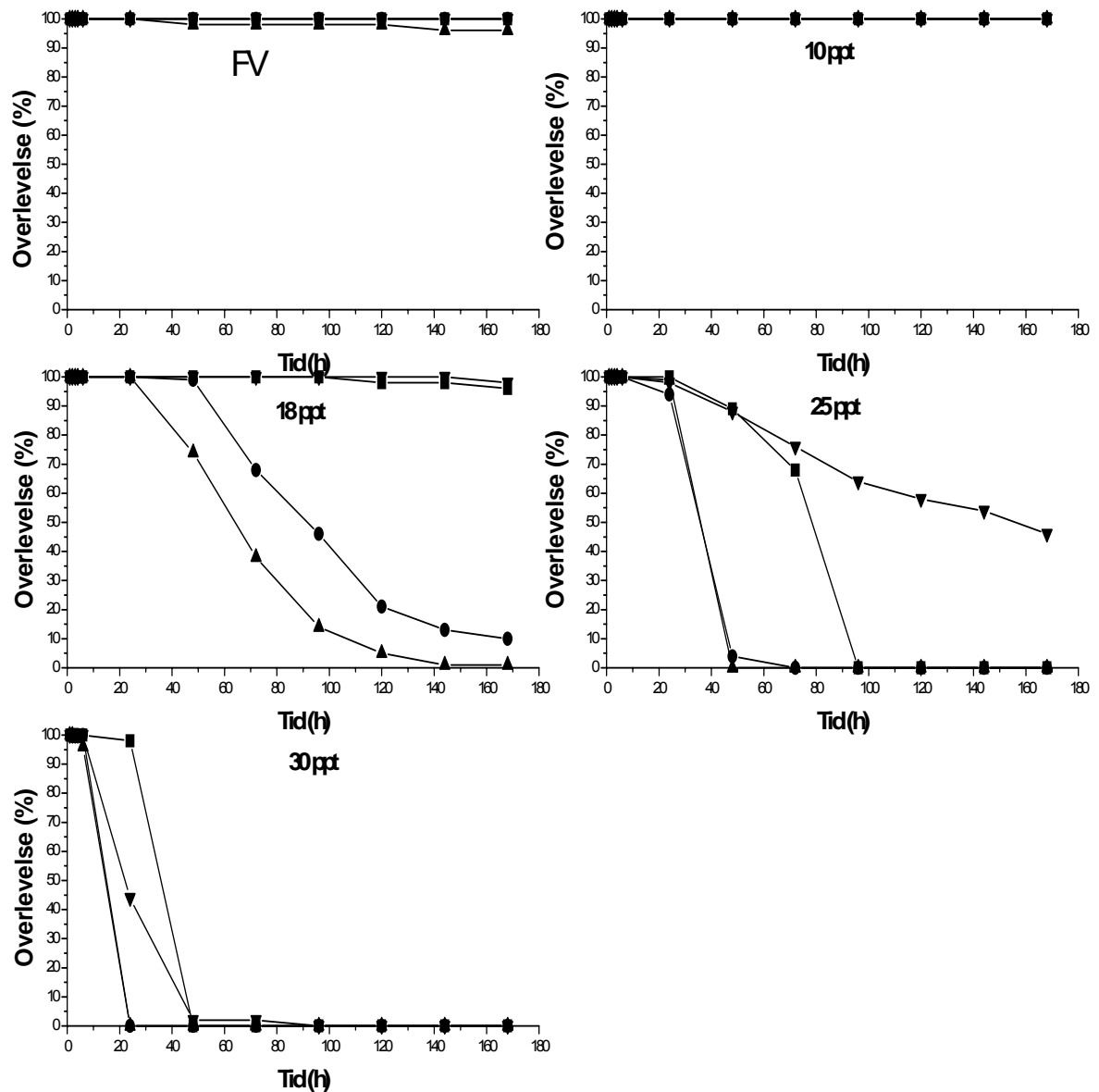
Figur 3.2.8. viser kropsvandindholdet (BWC) i procent i 150-170 dage gammel snæbelyngel ved forskellige saliniteter efter 4 og 24 timer.



Figur 3.2.8. BWC (%) i 150-170 dage gammel snæbelyngel efter 4 og 24 timer i FV og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet ved middelværdien \pm SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige ($P < 0,05$). BWC blev ikke målt ved 30 ppt efter 24 h da der ikke var overlevende.

Snæbelynglen i FV og 10 ppt udviste 4 timer efter overførsel ikke signifikant forskel i BWC , men mellem de to grupper, og 18, 25 og 30 ppt var der signifikant forskel. BWC i snæbelynglen faldt fra 84,8% i FV til 82,4% i 30 ppt. Efter 24 timer var der signifikant forskel på BWC i ynglen i FV og 18 ppt, mellem ynglen i FV og 25 ppt samt mellem ynglen i 18 og 25 ppt. Der var ikke signifikant forskel inden for samme salinitet efter 4 og 24 timer. Efter 24 timer lå BWC i ynglen på 85,2% i FV og var faldende til 82,6% i ynglen i 25 ppt.

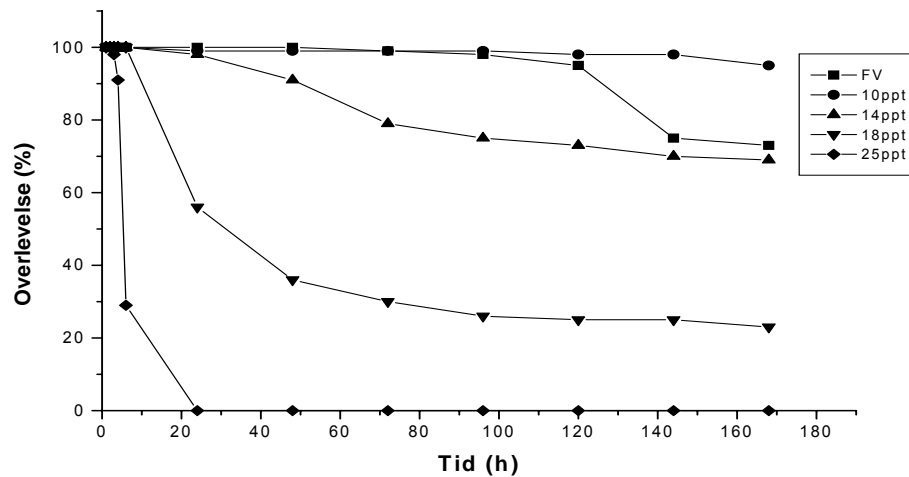
Figur 3.2.9 viser en samlet oversigt over den procentvise overlevelse af snæbellarver/ yngel ved forskellig alder i salinitetstest I-IV i FV og i de forskellige saliniteter.



Figur 3.2.9. Den procentvise overlevelse af 0-4(■), 15-19(◆), 32-35(▲) og 150-170(▼) dage gamle snæbellarver/ yngel i salinitetstest I-IV. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Helt I:

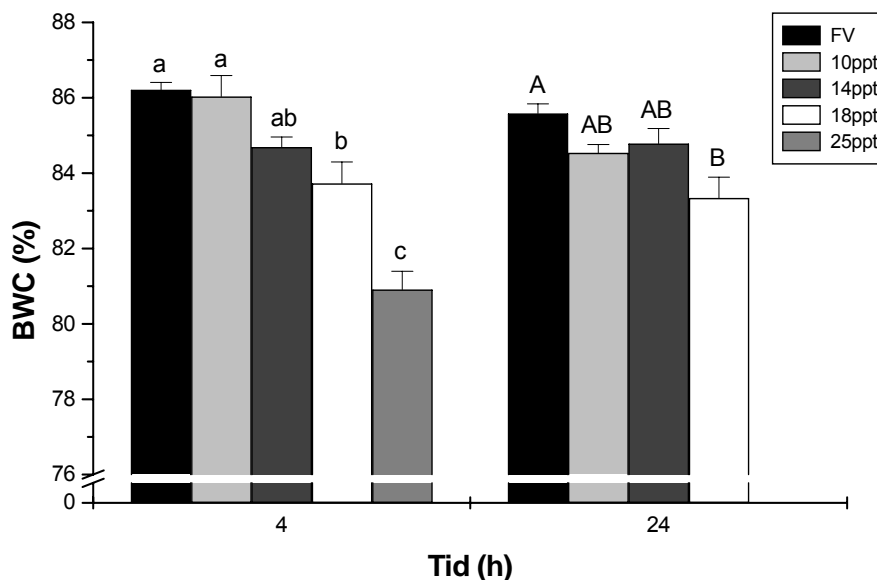
Figur 3.2.10 viser overlevelsen af heltlarver i procent, som har en gennemsnitsstørrelse på 42 mg og 21,2 mm ved forskellige saliniteter som funktion af tiden.



Figur 3.2.10. Procentvis overlevelse af heltlarver (n=80) ved gennemsnitsstørrelsen 42,0 mg og 21,2 mm ved forskellige saliniteter som funktion af tiden. Temperatur 10,0 °C. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Efter 24 timer var den procentvise overlevelse af heltlarver i 25 ppt 0%, i 18 ppt 56 % og 98% i 14 ppt, mens den var 100 % i FV og 10 ppt. Efter 48 timer var overlevelsen i 18 ppt faldet til 36% og til 91% i 14 ppt. Overlevelsen i 10 ppt var 99% og 100% i FV. Overlevelsen var efter 72 timer faldet til 30% i 18 ppt, og til 79% i 14 ppt, mens den var 99% i 10 ppt og FV. Efter 96 timer var overlevelsen i 18 ppt på 26%, i 14 ppt på 75, mens den var på 99% i 10 ppt og 98% i FV. Overlevelsen i FV efter 168 timer var 73% og i 10 ppt på 95%. I 14 ppt var den faldet til 69% og i 18 ppt var den på 23%.

Figur 3.2.11 viser kropsvandindholdet (BWC) i procent i heltlarver (gns. 42 mg; 21,2 mm) ved forskellige saliniteter efter 4 og 24 timer.

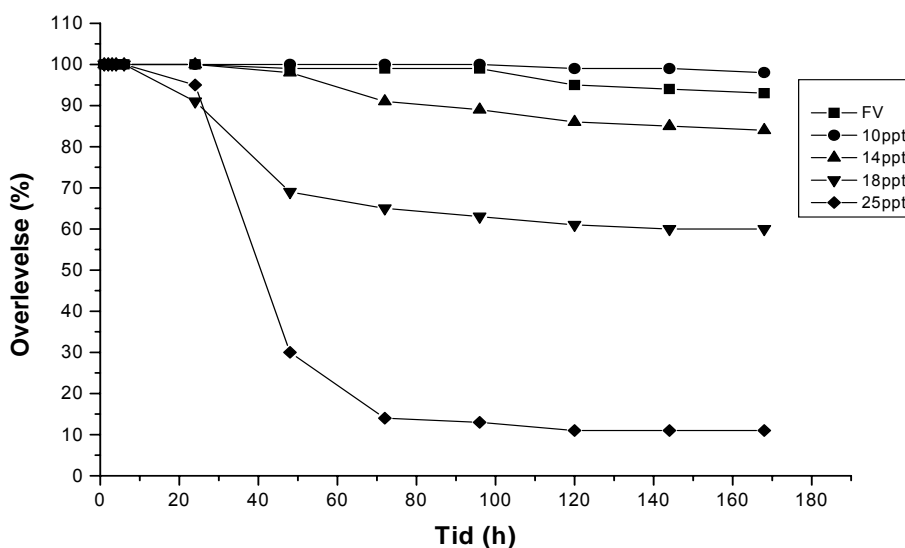


Figur 3.2.11. BWC (%) i heltlarver (gns. 42 mg; 21,2 mm) efter 4 og 24 timer i FW og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet ved middelværdien \pm SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige ($P < 0,05$). BWC blev ikke målt ved 25 ppt efter 24 h da der ikke var overlevende.

Efter 4 timer var der signifikant forskel på BWC i heltlarver i FW og 18 ppt. BWC i FW var 86,2% og 83,7% i 18 ppt. Der var ligeledes signifikant forskel på BWC i heltlarver i FW og 25 ppt. BWC i 25 ppt var på 80,9%. Der var også signifikant forskel på BWC i heltlarverne i 10 ppt og 18 ppt samt mellem larverne i 10 ppt og 25 ppt. BWC i 10 ppt var 86,0%. Der var signifikant forskel mellem heltlarverne i 14 ppt og 25 ppt med BWC i 14 ppt på 84,7%. Der var ikke signifikant forskel mellem de respektive grupper efter 4 og 24 timer. Efter 24 timer var der signifikant forskel på BWC i heltlarverne i FW og 18 ppt. BWC i FW var 85,6% og i 18 ppt var BWC 83,3%. Der var ikke signifikant forskel på BWC i 10 ppt, 14 ppt og 18 ppt.

Helt II:

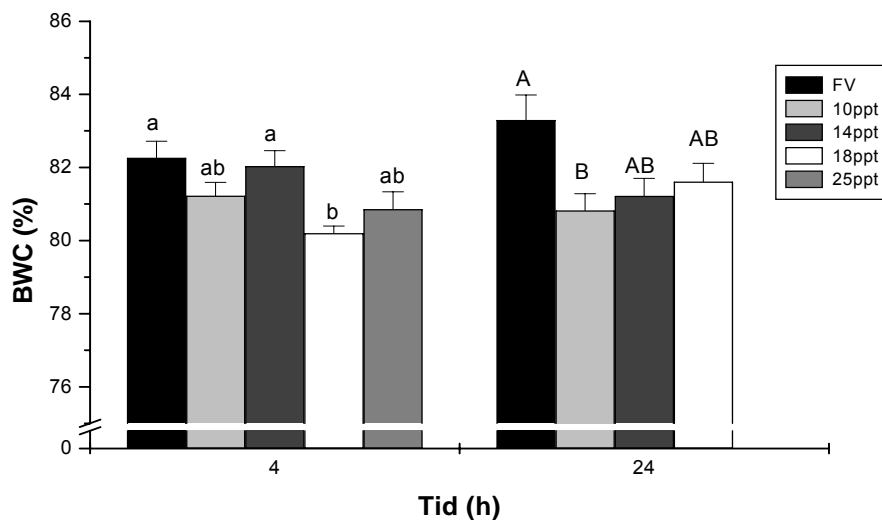
Figur 3.2.12. viser overlevelsen af heltyngel i procent, som har en gennemsnitsstørrelse på 219 mg og 32,5 mm ved forskellige saliniteter som funktion af tiden.



Figur 3.2.12. Procentvis overlevelse af heltyngel (n=80) ved gennemsnitsstørrelsen 219,0 mg og 32,5 mm ved forskellige saliniteter som funktion af tiden. Temperatur 10,0 °C. Bemærk overlap mellem enkelte punkter.

Efter 24 timer var den procentvise overlevelse af heltyngel i 25 ppt på 95% og på 91% i 18 ppt. Af de overlevende i 18 og 25 ppt lå enkelte individer på bunden, mens resten var aktive. I FV, 10 ppt og 14 ppt var overlevelsen 100% og alle individer aktive. Efter 48 timer var overlevelsen i 25 ppt faldet til 30%, mens overlevende individer var aktive og tog føde til sig. I 18 ppt var overlevelsen 69% og enkelte af de overlevende lå på bunden, mens resten var aktive og tog føde til sig. Efter 72 timer var overlevelsen i 25 ppt faldet til 14% og i 18 ppt til 65%. I begge grupper var de overlevende helt aktive og tog føde til sig. I 14 ppt var overlevelsen 91% og heltynglen var aktiv. I FV var overlevelsen 99% og i 10 ppt 100%. Efter 168 timer var overlevelsen i FV på 93% og alle var aktive. I 10 ppt var den 98% og alle individer var aktive. I 14 ppt var overlevelsen faldet til 84% og alle resterende individer aktive. I 18 ppt var overlevelsen 60% med alle individer aktive og i 25 ppt var 11% i live og aktive.

Figur 3.2.13 viser kropsvandindholdet (BWC) i procent i helt (gns. 219 mg; 32,5 mm) ved forskellige saliniteter efter 4 og 24 timer.



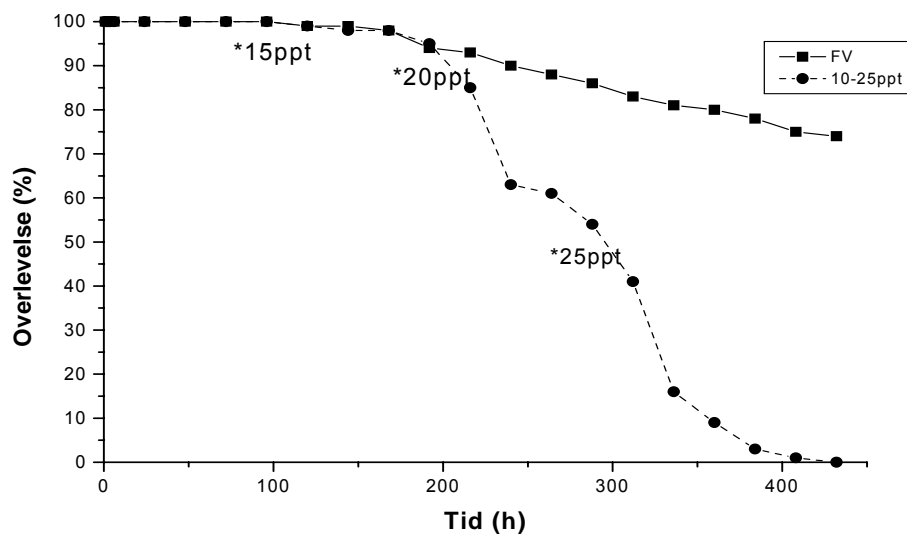
Figur 3.2.13. BWC (%) i heltyngel (gns. 219 mg; 32,5 mm) efter 4 og 24 timer i FW og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet ved middelværdien \pm SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige (P<0,05). BWC blev ikke målt ved 25 ppt efter 24 h da der ikke var overlevende.

Efter 4 timer var der signifikant forskel på BWC i heltynglen i FW og 25 ppt. BWC i heltynglen i FW var 82,3 % og 80,2% i 25 ppt. Der var ligeledes signifikant forskel på BWC i heltynglen ved 18 ppt og 25 ppt, og BWC i 18 ppt var 82,2%. Der var ikke signifikant forskel på BWC i de respektive grupper efter 4 og 24 timer. Efter 24 timer var der signifikant forskel på BWC i heltynglen i FW og 10 ppt. BWC i FW var 83,5% og i 10 ppt var det 80,8%.

3.3 Akklimering:

Akklimering I:

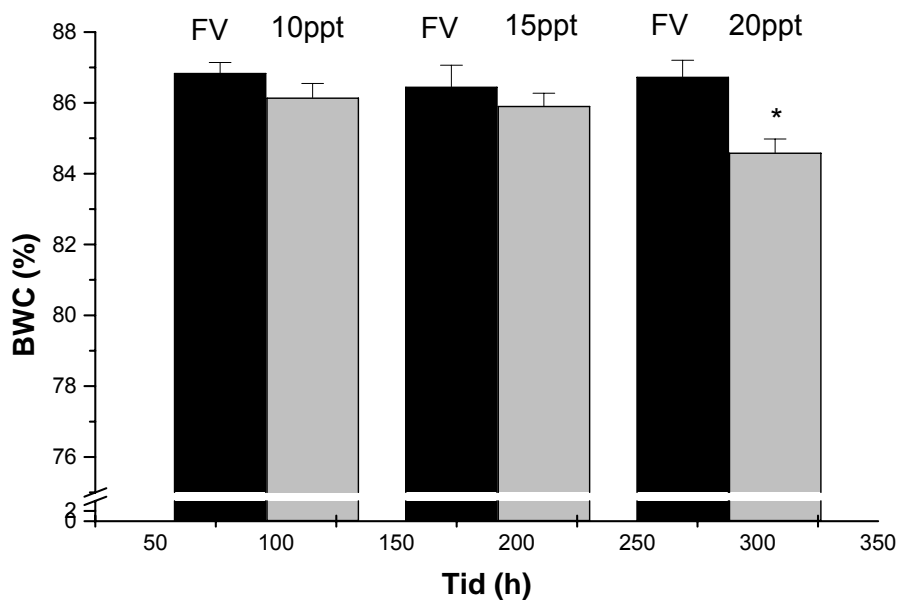
Figur 3.3.1 viser den procentvise overlevelse af 44-48 dage gamle snæbellarver (gns. 13,1 mg; 13,8 mm) ved gradvis øgning af saliniteten over tid.



Figur 3.3.1. Procentvis overlevelse af 44-48 dage gamle snæbellarver (n=80) (gns. 13,1 mg; 13,8 mm) ved gradvis salinitetsøgning over tid. Temperatur 5,0 °C. (*) angiver tidspunkt for salinitetsøgning.

Overlevelsen af snæbellarverne var efter 96 timer 100% i både FV og 10 ppt. Efter 96 timer øgedes saliniteten til 15 ppt. Efter 120 timer var overlevelsen i 15 ppt 99% og 99% i FV. Efter 192 timer var overlevelsen i 15 ppt 95% og i FV 94%. I 15 ppt var ca. 40% af de overlevende inaktive på bunden, mens alle i FV var aktive. Saliniteten blev efter 192 timer hævet til 20 ppt. Efter 216 timer var overlevelsen i 20 ppt 85%, og ca. 40% af de overlevende var inaktive. De aktive fisk tog føde til sig. Overlevelsen i FV forblev høj, og var på dette tidspunkt 93 %. Efter 288 timer var overlevelsen i 20 ppt faldet til 54% og ud af disse var ca. 45% inaktive. I FV var overlevelsen faldet til 86%. Saliniteten blev efter 288 timer øget til 25 ppt, og 24 timer senere var overlevelsen i 25 ppt faldet til 41%, mens den var 83% i FV. Af de overlevende i 25 ppt var 4 fisk aktive, mens resten lå på bunden. Efter 432 timer var der 0% overlevelse i 25 ppt, mens overlevelsen i FV var 74%. Alle snæbler i FV var aktive.

Figur 3.3.2. viser BWC i procent i 44-48 dage gamle snæbellarver (gns. 13,1 mg; 13,8 mm) ved gradvis øgning af salinitet over tid.

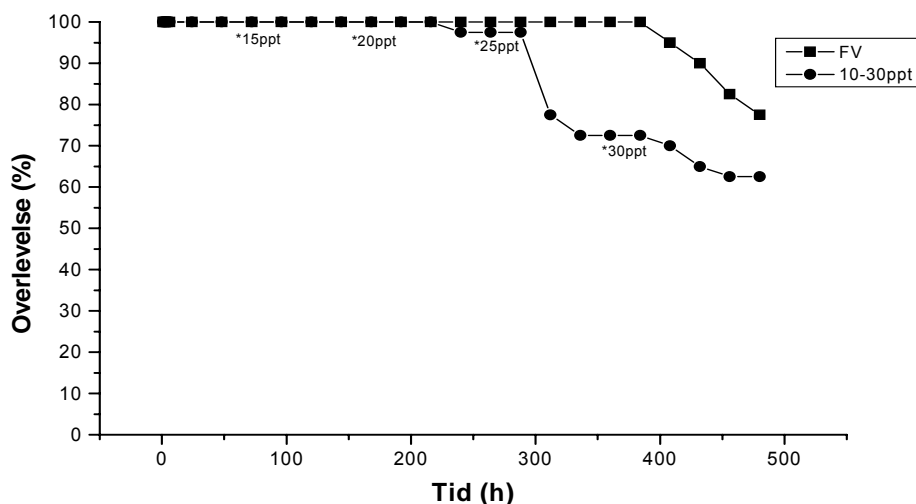


Figur 3.3.2. BWC (%) i 44-48 dage gamle snæbellarver i FV og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet med middelværdien \pm SEM ($n=10$). (*) angiver signifikant forskel ($P<0,05$) mellem grupper ved samme tid.

Efter 96 timer var der ikke signifikant forskel på BWC i snæbellarverne i FV (86,8%) og 10 ppt (86,1%). Der var ikke signifikant forskel på BWC i FV (86,5%) og 15 ppt (85,9%) efter 192 timer. Efter 288 timer var der signifikant forskel mellem BWC i FV (86,7%) og 20 ppt (84,6%).

Akklimering II:

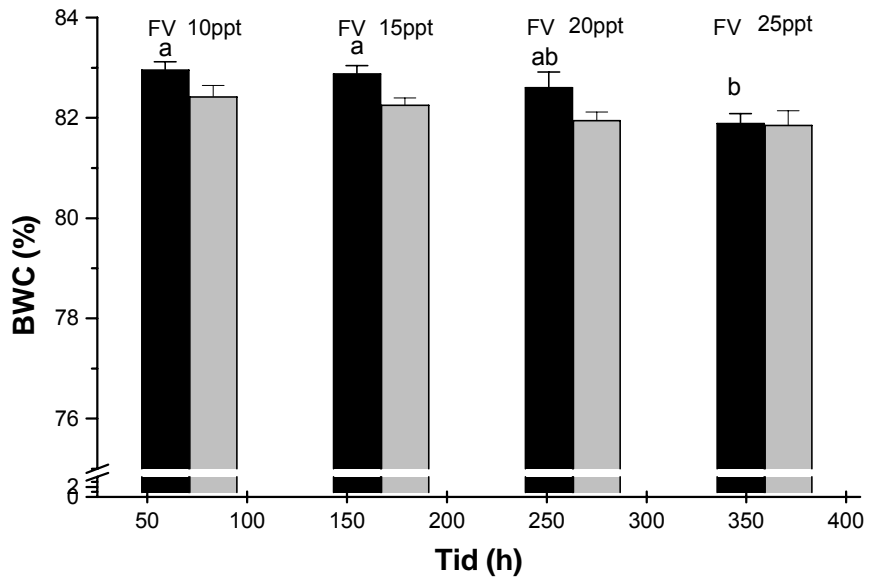
Figur 3.3.3 viser overlevelse af 210-230 dage gammel snæbelyngel (690 mg; 50 mm) ved gradvis øgning af saliniteten over tid.



Figur 3.3.3. Procentvis overlevelse af 210-230 dage gammel snæbelyngel (n=40) (gns. 690 mg; 50 mm) ved gradvis øgning af saliniteten over tid. Temperatur 13,0 °C. (*) angiver tidspunkt for øgning af salinitet.

Overlevelsen af snæbelyngel var 100% i 10 og 15 ppt. I samme tidsrum (192 timer efter forsøgsstart) var overlevelsen i FV 100%. Alle snæbler var aktive og tog føde til sig. Efter 192 timer blev saliniteten hævet til 20 ppt. Efter 288 timer var overlevelsen på 98%. Af de overlevende lå 5 stk. på bunden, mens resten var aktive. Overlevelsen i FV var 100%. Saliniteten blev øget til 25 ppt, og 24 timer senere var overlevelsen faldet til 78%. Af de overlevende befandt 8 stk. sig på bunden. Otteogfyrre timer efter øgningen til 25 ppt var overlevelsen på 73% og alle individer var aktive. Saliniteten blev hævet til 30 ppt efter 384 timer, og 24 timer senere var overlevelsen 70%, mens den var faldet fra 100% i FV til 95%. Efter 480 timer var overlevelsen i FV faldet til 78%, og de resterende individer var aktive. I 30 ppt var 63% i live og aktive.

Figur 3.3.4. viser BWC i procent i 210-230 dage gammel snæbelyngel (gns. 690 mg; 50mm) ved gradvis øgning af salinitet over tid.

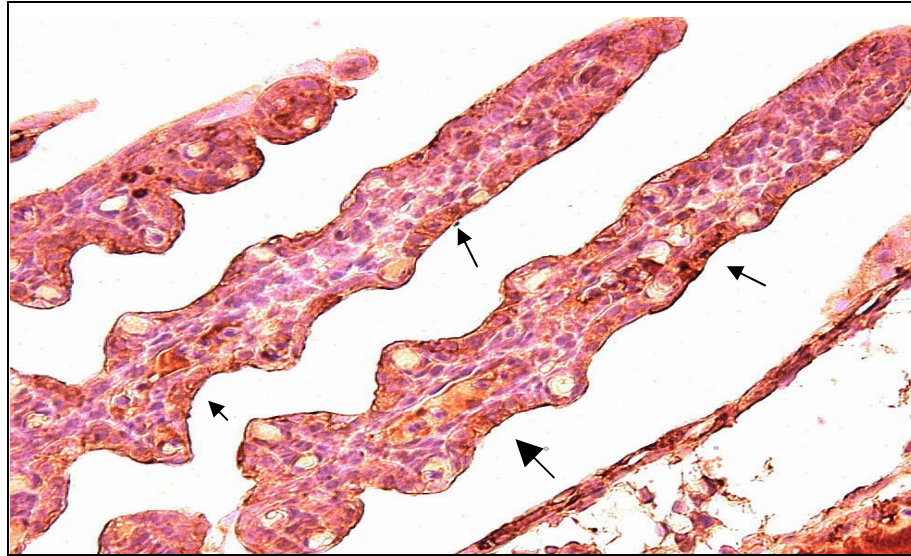


Figur 3.3.5. BWC (%) i 210-230 dage gammel snæbelyngel i FV og forskellige saliniteter. Hver gruppe er afbildet med middelværdien \pm SEM (n=10). Forskellige bogstaver angiver signifikant forskel ($P < 0,05$) mellem FV grupper ved forskellig tid.

Der var ikke signifikant forskel på BWC i snæbelynglen mellem de forskellige saliniteter og FV på noget tidspunkt, mens der var signifikant forskel på BWC i FV efter 96 timer og FV efter 384 timer. BWC i FV efter 192 timer var også signifikant forskellig fra BWC i FW efter 384 timer. FV efter 96 timer havde et BWC på 83,0%, mens det var 81,9 % efter 384 timer. Der var en tendens til at BWC i snæbelynglen generelt var lavere i SV i forhold til FV på nær efter 384 timer, hvor de var ens.

3.4 Immunohistokemi:

Figur 3.4.1 til 3.4.10 viser immunohistokemisk farvede tværsnit af gællelevæv fra snæbel.



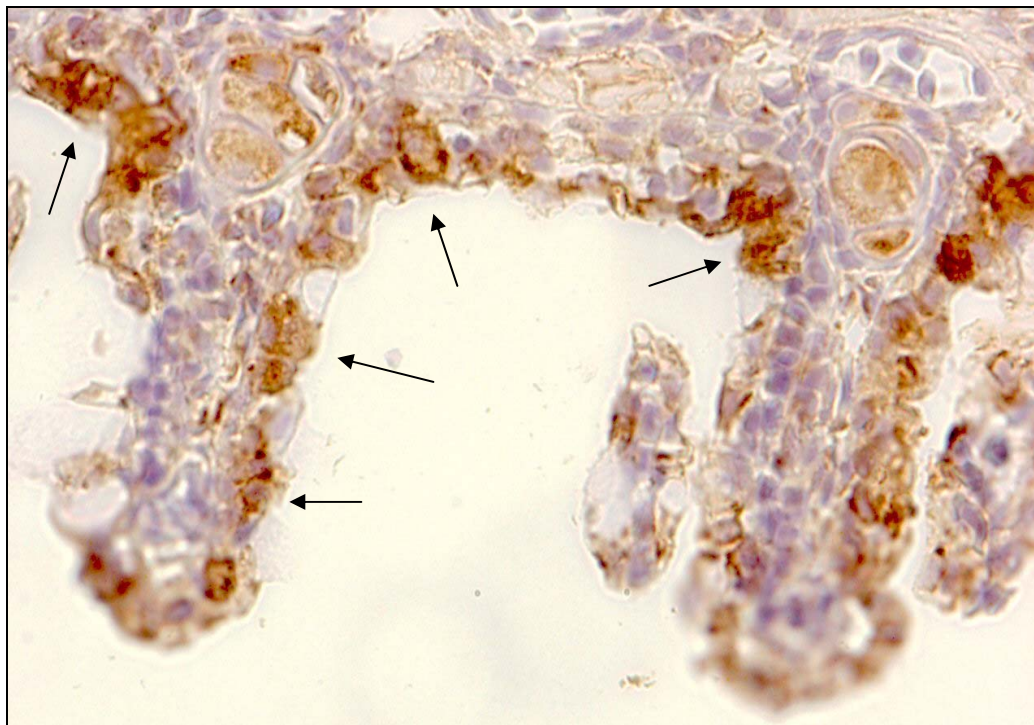
Figur 3.4.1. Gællelevæv fra 0-4 dage gammel snæbellarve i FV (kontrol) farvet med antistof mod Na⁺,K⁺-ATPasens α -subunit. 400x forstørrelse. Pile angiver eksempler på immunoreaktive celler.



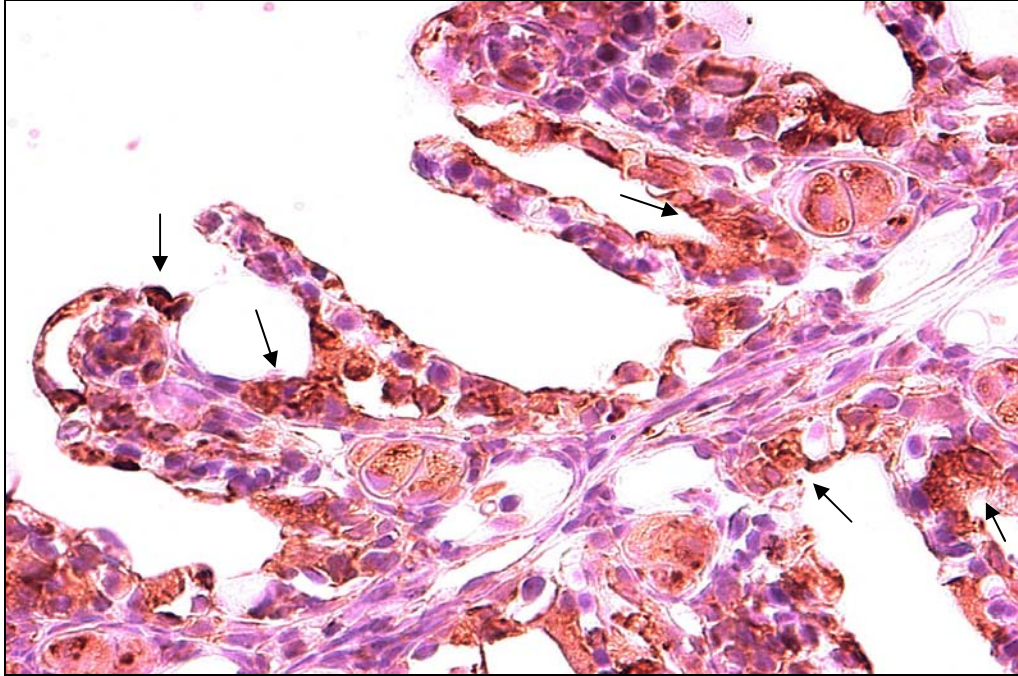
Figur 3.4.2. Gællelevæv fra 0-4 dage gammel snæbellarve efter 48 timer i 18 ppt farvet med antistof mod Na⁺,K⁺-ATPasens α -subunit. 400x forstørrelse. Pile angiver eksempler på immunoreaktive celler.



Figur 3.4.3. Gællæv fra 150-170 dage gammel snæbelyngel i FV (kontrol) farvet med antistof mod Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit. 400x forstørrelse. Pile angiver eksempler på immunoreaktive celler.

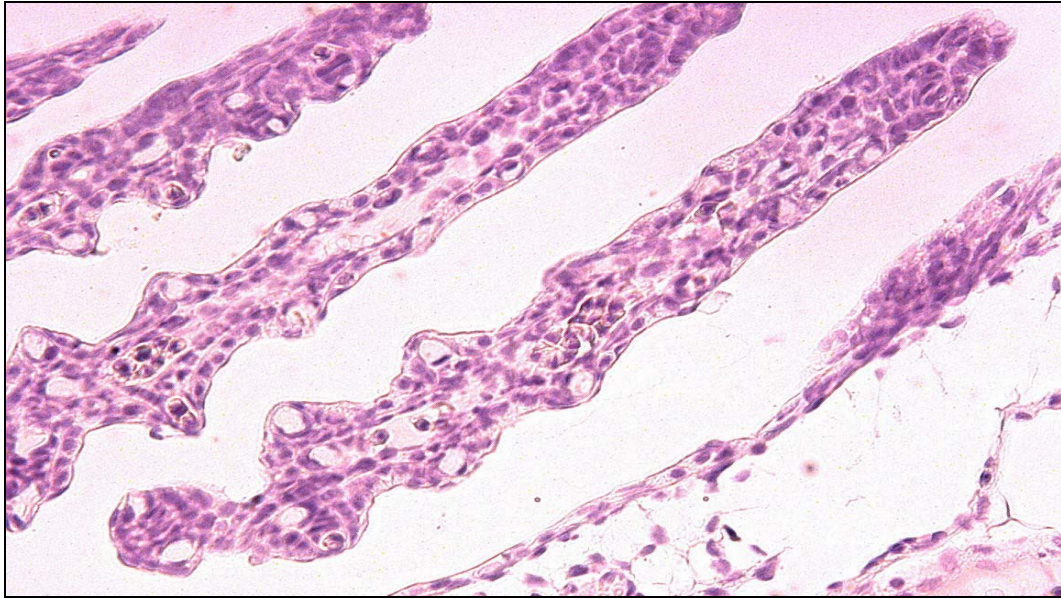


Figur 3.4.4. Gællæv fra 150-170 dage gammel snæbelyngel efter 48 timer i 18 ppt farvet med antistof mod Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit. 400x forstørrelse. Pile angiver eksempler på immunoreaktive celler.



Figur 3.4.5. Gælle væv fra 150-170 dage gammel snæbelyngel efter 48 timer i 25 ppt farvet med antistof mod Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit. 400x forstørrelse. Pile angiver eksempler på immunoreaktive celler.

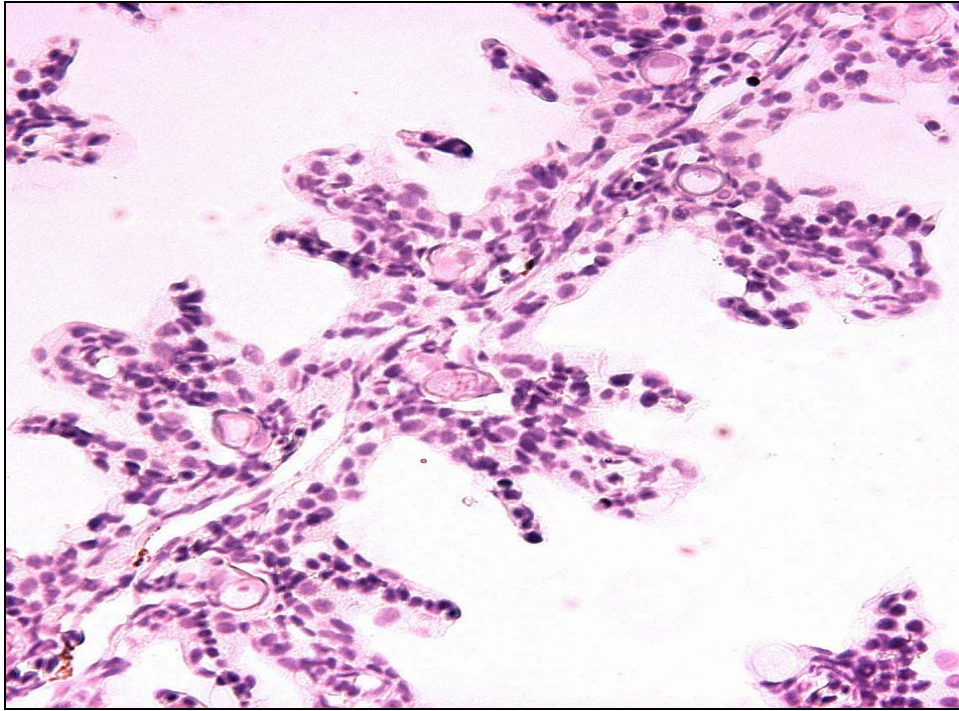
Immunofarvning mod Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit viser, at der er enkelte immunoreaktive celler i gælle vævet tilstede umiddelbart efter klækning (fig. 3.4.1 & 3.4.2) og at disse befinder sig i overfladen af vævet. Antallet af immunoreaktive celler stiger med udviklingen af gælle vævet, og er lokaliseret på både filamenter og lameller (fig. 3.4.3, 3.4.4 & 3.4.5) i snæbelynglen, hvor de ligger i overfladen af vævet. Der synes at være en tendens til at cellerne sidder i mindre komplekser.



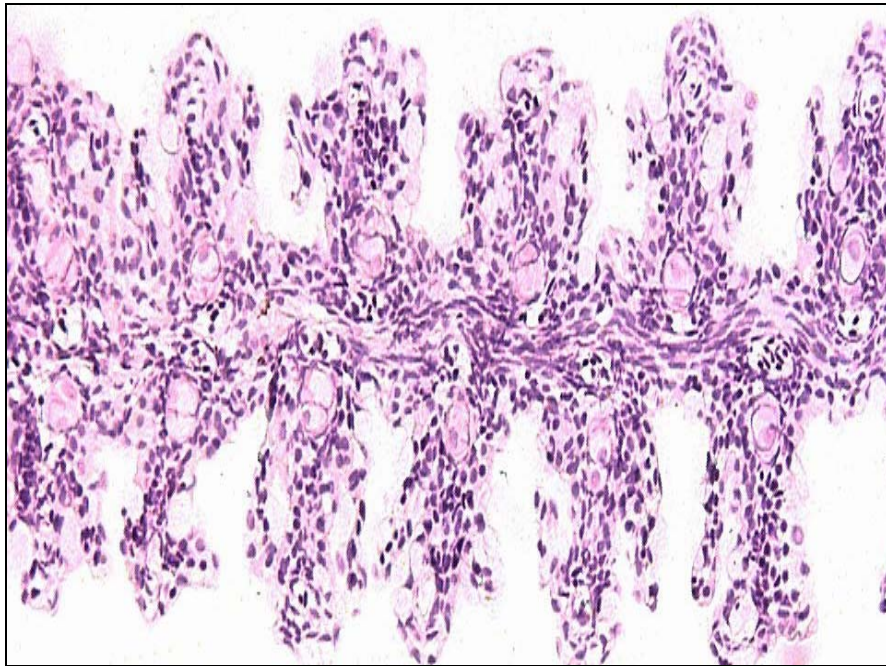
Figur 3.4.6. Gællæv fra 0-4 dage gammel snæbellarve i FV (kontrol) farvet med antistof mod Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter. 400x forstørrelse.



Figur 3.4.7. Gællæv fra 0-4 dage gammel snæbellarve efter 48 timer i 18 ppt farvet med antistof mod Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter. 400x forstørrelse.



Figur 3.4.8. Gælle væv fra 150-170 dage gammel snæbelyngel i FV (kontrol) farvet med antistof mod Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter. 400x forstørrelse.



Figur 3.4.9. Gælle væv fra 150-170 dage gammel snæbelyngel efter 48 timer i 18 ppt farvet med antistof mod Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter. 200x forstørrelse.

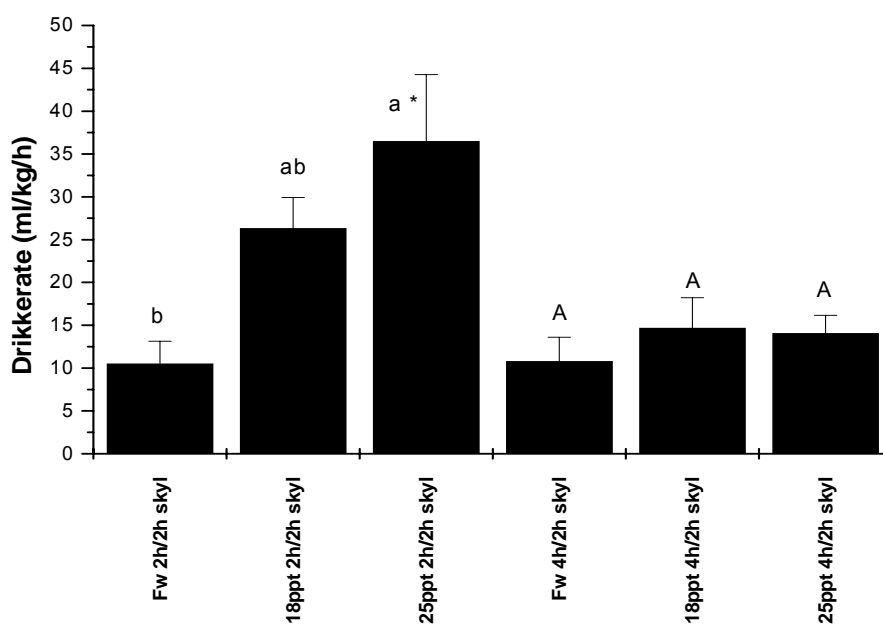


Figur 3.4.10. Gællelevæv fra 150-170 dage gammel snæbelyngel efter 48 timer i 25 ppt farvet med antistof mod $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter. 200x forstørrelse.

Figur 3.4.6 til 3.4.10 viser ingen immunoreaktive celler ved anvendelse af antistof mod $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporteren.

3.5 Drikkerate:

Figur 3.5.1 viser drikkeraten (DR) hos 180-200 dage gammel snæbelyngel (gns. 175 mg) i FV og SV (yngel akklimeret til SV i 14 dage inden forsøgsstart) med forskellige saliniteter. Drikketiden varierer fra 2 til 4 timer, mens skylletiden var 2 timer.

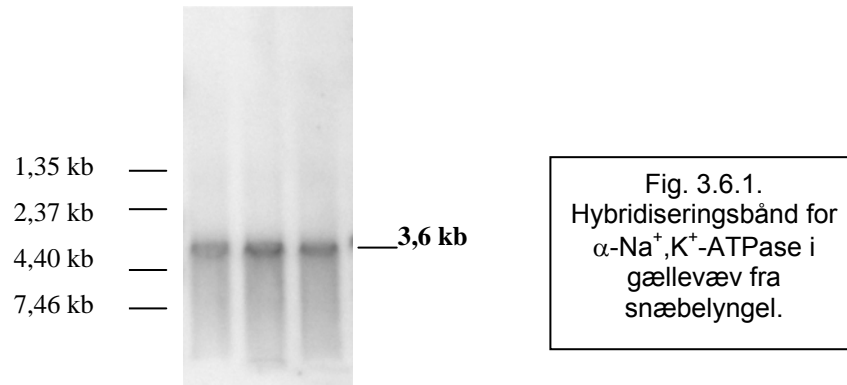


Figur 3.5.1. Drikkerate (ml/kg/h) i FV, 18 og 25 ppt med drikketid på 2 og 4 timer og skylletid på 2 timer. Hver gruppe angiver middelværdien ± SEM (n=10). Søjler uden et fælles bogstav er signifikant forskellige ($P < 0,05$). (*) angiver signifikant forskel ($P < 0,05$) mellem grupper med samme salinitet, men forskellig drikketid. Temperatur 15,0 °C.

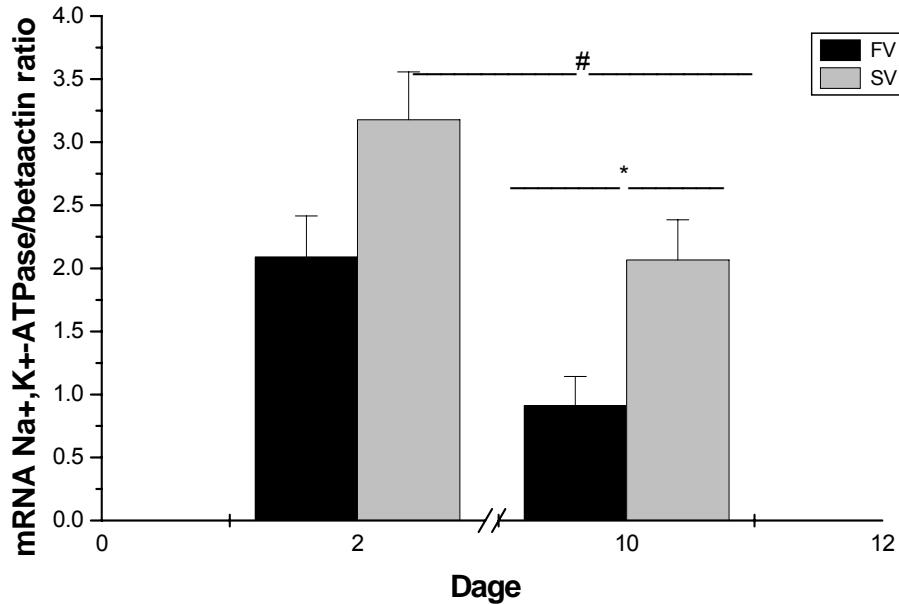
Drikkeraten ($10,5 \pm 2,6$ ml/kg/h) hos snæbelynglen i FV med drikke- og skylletid på 2 timer var forskellig fra snæbelynglen i 25 ppt ($36,5 \pm 7,8$ ml/kg/h). DR i 18 ppt ($26,3 \pm 3,6$ ml/kg/h) var ikke forskellig fra FV og 25 ppt. Der var ikke forskel på DR mellem FV ($10,6 \pm 2,8$ ml/kg/h), 18 ppt ($14,7 \pm 3,5$ ml/kg/h) og 25 ppt ($14,1 \pm 2,1$ ml/kg/h) ved en drikketid på 4 timer. DR hos snæbelynglen i 25 ppt med en drikketid på 4 timer var signifikant forskellig fra 25 ppt med en drikketid på 2 timer, mens dette ikke var tilfældet indbyrdes for FV og 18 ppt.

3.6 RNA:

Figur 3.6.1 viser hybridiseringsbånd for Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit i gælløvæv fra snæbelyngel ved anvendelse af en ørred cDNA template.



Figur 3.6.2 viser mængden af mRNA for Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit normaliseret til betaactin i snæbelyngel gæller (størrelse 2-4 g og 70-90 mm) 2 og 10 dage efter overførsel til henholdsvis FV og 25 ppt SV.



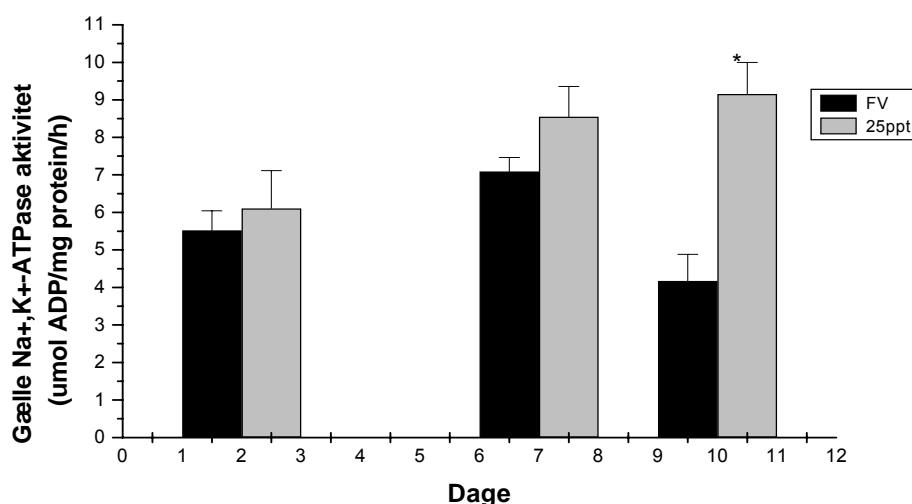
Figur 3.6.2. Mængden af Na^+, K^+ -ATPase α -subunit mRNA normaliseret i forhold til betaactin i gælløvæv fra snæbelyngel (størrelse 2-4 g og 70-90 mm) 2 og 10 dage efter overførsel til henholdsvis FV og 25 ppt SV. Hver gruppe angiver middelværdien \pm SEM (n=6). Temperatur 13,0 °C. (#) angiver signifikant forskel ($P < 0,05$) for tid, og (*) for salinitet (testet vha. 2-vejs ANOVA).

Ratioen for Na^+, K^+ -ATPase α -subunit mRNA normaliseret til betaactin i gællelevæv fra snæbelynglen var to dage efter overførsel 2,1 i FV og 3,2 i 25 ppt. Der var ikke signifikant forskel på de to grupper. Efter 10 dage var ratioen 0,9 i FV og 2,1 i 25 ppt, hvilket var signifikant forskellig. Ratioen i de to 25 ppt grupper var signifikant forskellig.

Hybridiseringen for $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporterens blev mindre vellykket og kvaliteten var ikke god nok til at vurdere niveauet af dette protein.

3.7 Gælle Na^+, K^+ -ATPase aktivitet:

Figur 3.7.1 viser gælle Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten hos snæbelyngel (størrelse 2-4 g og 70-90 mm) 2, 7 og 10 dage efter overførsel til henholdsvis FV og 25 ppt SV.



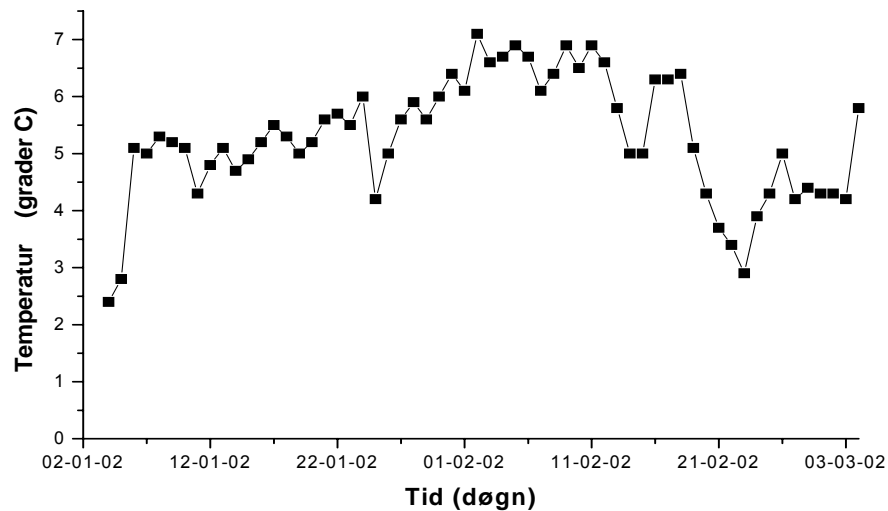
Figur 3.7.1. Gælle Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten hos snæbelyngel (størrelse 2-4 g og 70-90 mm) 2, 7 og 10 dage efter overførsel til henholdsvis FV og 25 ppt SV. Hver gruppe angiver middelværdien \pm SEM (n=6). (*) angiver signifikant forskel mellem FV og 25 ppt ($P < 0,05$). Temperatur $13,0^\circ \text{C}$.

Efter 2 dage var der ikke signifikant forskel på gælle Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten hos snæbelynglen i FV ($5,5 \mu\text{mol ADP/mg protein/h}$) og 25 ppt ($6,1 \mu\text{mol ADP/mg protein/h}$). Efter 7 dage var aktiviteten $7,1 \mu\text{mol ADP/mg protein/h}$ i FV og $8,5 \mu\text{mol ADP/mg protein/h}$ i 25 ppt, men forskellen var ikke signifikant. Aktiviteten i FV efter 10 dage var $4,2 \mu\text{mol ADP/mg protein/h}$, hvilket var signifikant forskelligt fra 25 ppt, hvor aktiviteten var $9,2 \mu\text{mol ADP/mg protein/h}$.

3.8 Feltforsøg:

Driftnet Hjortvad Å:

På figur 3.8.1 ses døgnmiddeltemperaturen i Hjortvad Å fra den 4/1-02 til den 4/3-02. Den estimerede temperatur fra medio november til ultimo december er sat til 4°C for at kunne estimere klækketidspunktet for snæbellarver i Hjortvad Å.



Figur 3.8.1. Figuren viser døgnmiddeltemperaturen i Hjortvad å fra den 04-01-02 til 04-03-02. Data udleveret fra Ribe Amt.

Fra fig. 3.8.1 blev klækketidspunktet for snæbellarver estimeret til ultimo februar.

Tabel 3.8.1. Resultater af driftnetfiskeri i Hjortvad Å. St. A angiver lokaliteten "Rådmand Vejles Bro" opstrøms sandfang. St. B angiver lokaliteten "Seminariet" nedstrøms sandfang.

Dato	Tidsrum		Antal larver St. A	Antal larver St. B
	St. A	St. B		
11-02-02	09.45-12.45		0	0
	10.05-13.05			
18-02-02	10.45-13.15		0	0
	11.00-14.00			
21-02-02	12.00-14.00		0	0
	12.15-14.15			
24-02-02	11.00-13.00		0	0
	11.15-13.15			
26-02-02	11.00-13.00		0	0
	11.15-13.15			
03-03-02	13.00-15.00		0	0
	13.15-15.15			
05-03-02	13.45-15.45		0	0
	14.00-16.00			
11-03-02	13.30-15.30		0	0
	13.45-15.45			
13-03-02	14.15-16.15		0	0
	14.30-16.30			
25-03-02	13.15-15.15		0	0
	13.30-15.30			

Der blev foretaget 10 befiskninger med driftnet i februar/marts 2002, men der blev ikke fanget snæbellarver.

Elektrofiskeri Vidåen:

Tabel 3.8.2. Resultat af elektrofiskeri i Vidåen.

Dato	Tidsrum	Temperatur (°C)	Antal snæbler	Længde (mm)
				37
22-05-02	09.30-14.00	17,0	2	41

Elektrofiskeri i Rudbøl Sø og Vidåen resulterede i fangsten af 2 stk snæbelyngel på henholdsvis 37 og 41 mm. De to individer blev fanget lige omkring udløbet af Rudbøl Sø.

4. Diskussion:

4.1 Salinitetstest:

I salinitetstestene ses på snæbellarvers evne til at klare forskellige saliniteter over tid, samt kropsvandindholdet. Hvis snæbellarver skulle drifte direkte til havs lige efter klækning skulle de være istand til, enten at tolerere osmotisk stress over længere tid eller besidde/udvikle en evne til at hypoosmoregulere. Overlevelsen giver en indikation af, hvad der sker ved direkte overførsel fra FV til SV, men kan ikke skelne mellem vævstolerance eller aktiv osmoregulering, mens kropsvandindholdet giver en indikation om snæbelen aktivt kan hypoosmoregulere.

I salinitetstest 1 blev nyklækkede snæbellarverlarver overført til FV og forskellige saliniteter (fig. 3.2.1). Overlevelsen ved 30 ppt var efter 48 timer 0%, mens den i 25 ppt var 0% efter 96 timer. Ved 18% var overlevelsen 95 % efter 7 døgn, men larverne lå inaktive på bunden. I overensstemmelse med dette observeredes også et fald i BWC ved højere saliniteter i forhold til FV (fig. 3.2.2). Dette indikerer at nyklækkede larver ikke kan overleve i Vadehavet. Billedet er det samme i test 2 og 3, hvor larverne kun var marginalt større, men forskel var, at larverne efter 32-35 dage havde opbrugt deres blommesæk. Det ses også, at overlevelsen ved 25 ppt hurtigere faldt til 0% i forhold til test 1. Dette gjaldt også for larver i 18 ppt. I følge Hiroi et al. (1998) kan chloridceller i huden og blommesækken være en faktor i ionregulering i larver, hvor gællerne ikke er udviklede. I marine arter anses chloridceller i huden for at være ansvarlige for sekretion af salt (Alderdice, 1988). Dette tyder på at blommesækken spiller en vis rolle i de tidligste larvestadier, men at det ikke er nok til at sikre en tilstrækkelig hypoosmoregulering. Først i test 4 ses en væsentlig udvikling. Her var overlevelsen væsentligt forbedret ved 18 og 25 ppt og de overlevende individer ved de nævnte saliniteter, var efter 7 døgn aktive. BWC i snæbelynglen ved høje saliniteter var stadig lavere end i FV og 10 ppt, men der skete ikke yderligere fald efter 24 timer, hvilket tyder på en stabilisering. Black (1950) fandt at pukkellaks med en vægt på 870 mg havde et BWC på 82,6 % efter 23 timer i SW, mens det for fisk på 700 mg lå på 83,4 % efter 84 timer. Antallet af fisk per måling var kun tre, men værdierne stemmer godt overens med dem, der ses i salinitetstest 4 (fig. 3.2.8).

Pukkellaks kan ved de ovennævnte størrelser tolerere højsaline miljøer, og udviklingen hos snæbelynglen indikerer en øget evne til hypoosmoregulering.

BWC i snæblen er højere end det gængse muskelvandindhold (MWC) der findes i f. eks ørreder. Her ligger det på ca. 80% i FV og et niveau på 72-73% er lethalt (Madsen, 2003, pers. komm.). Talbot et al., (1982) fandt, at BWC i lakse- og ørredlarver var ca. 82% i FV efter absorption af blommesækken, mens det lå på ca. 65% på blommesækstadiet. I lakselarver var et vandtab på 5,6%, 6,1% og 3,3% dødeligt i fuld styrke SV henholdsvis 9, 29 og 62 dage efter klækning. For ørredlarver var tallene 7, 5%, 7,9% og 4,2%. Det indikerer at dehydrering kan være den afgørende faktor i salinitetstest I-III. I test I var vandtabet mellem snæbellarver i FV og 30 ppt efter 4 timer på 4,7% og efter 24 timer var tabet mellem larver i FV og 25 ppt 2,3%. I test II var vandtabet mellem larverne i FV og 30 ppt efter 4 timer på 2,6% og efter 24 timer var det på 9,2% mellem larver FV og 25 ppt. I test III var tabet på 6,0% og 5,9%. I test IV var tabet på henholdsvis 2,8 og 3,1% og det tyder på at dehydrering ikke var den afgørende faktor her. I udtagelsen af snæbler til måling af BWC blev døde fisk frasorteret, mens snæbler der lå levende på bunden indgik i målingerne. Derved fås det mest reelle gennemsnit ved en given salinitet. Den væsentligste forskel på snæblerne i test 4 og i de første tre, var ikke kun størrelsen, men også det faktum, at snæblerne i test 4 næsten var fuldt metamorfoserede (fig. 3.1.5 & 3.1.6). Dog skal det konstateres, at væksten i den første periode efter klækning var begrænset (fig. 3.3.1) som følge af den lave temperatur (5 °C), hvilket sandsynligvis ikke følger forholdene i naturen. Metamorfosen er en dynamisk proces, hvilket vanskeliggør at vurdere det nøjagtige start- og sluttidspunkt. I dette tilfælde begyndte larverne at anlægge skæl da de var ca. 22 mm, og var fuldt differentierede m.h.t skæl og finner ved en størrelse 35 mm. Snæblerne var på dette tidspunkt overgået til yngelstadiet, og var næsten fuldt dækkede af skæl. Der var også dannet gællelæg, og mængden af gællævæv var mangedoblet. Denne udvikling indikerer, at salttolerancen udvikles som et resultat af snæblernes øgede størrelse, hvor skælanlæg og udvikling af gæller er vigtige i denne henseende. Desuden er overflade/volumet ratioet også formindsket og dermed mindskes vandtabet.

Resultaterne understøttes af Kjær & Juhl (1990) der også fandt en størrelsesafhængig SV-tolerance hos snæbelyngel, men i deres undersøgelse

bruges alder som reference. Resultaterne bør dog tages med forbehold da der ikke blev brugt samme antal snæbler i samme salinitetstest. Desuden blev nogle individer bedøvet og målt inden forsøgsstart. Meget tyder dog på, at det er størrelse og deraf følgende vævsudvikling, og ikke alder der har betydning i udvikling af SV tolerance. Dette berøres i et efterfølgende afsnit.

4.1.2 Miljøforhold i salinitetstest:

Da det ikke er muligt, at skabe naturlige forhold for fisk i laboratoriet må det i bedste fald tilstræbes, at nærme sig m.h.t. flest mulige parametre.

En ofte brugt metode til at undersøge, hvor langt forskellige laksefisk er i deres udvikling af SV tolerance er en 24-timers saltvandstest (Hogstrand & Haux, 1985), hvor overlevelsen og koncentrationen af natrium i plasma måles 24 timer efter direkte overførsel til højsalint vand. Testen blev tidligere brugt som en ren overlevelsestest (Conte & Wagner, 1965), men er i følge Hogstrand & Haux (1985) ikke velegnet idet den ikke siger noget om overlevelse og vækst på sigt. Målingen af natrium giver en indikation af om der foregår en aktiv hypoosmoregulering. At konkludere, at snæblen ville være i stand til at klare en given salinitet, hvis den var i live efter 24 timer, viser sig ikke at være realistisk. Mine resultater viser, at der ikke er en klar sammenhæng mellem snæbelyngels overlevelse efter 24 timer og overlevelse på længere sigt. I nogle forsøg er dødeligheden akut høj på mindre end 24 timer ved en given salinitet, hvorimod dødeligheden er mere progressiv i andre. For eksempel viser resultatet af salinitetstest I, at snæblen vil være istand til at tolerere salinitetet op til i hvert fald 30 ppt efter 24 timer, men efter 48 timer var dødeligheden 100%. Det mest realistiske billede af SV tolerance hos snæblen opnås ved at teste snæblerne over flere dage. Det er rimeligt at antage, at kan en fisk klare en given salinitet i 7 dage, i modsætning til den ofte anvendte 24 timers test, og have et normalt aktivitetsniveau vil denne salinitet ikke være et problem. Dette udvidede tidsrum giver desuden mulighed for at skelne mellem aktiv hypoosmoregulering og vævstolerance. Ionsammensætningen af det anvendte salt burde ikke have været noget problem, da en måling viste, at sammensætningen var ret lig vand fra Nordsøen (Rankin 2002, pers. komm.). Hvis der var brugt ukendt salt til forsøgene ville der være en risiko for at enkelte ioner ikke

var tilstede i de rette mængder, hvilket ville vanskeliggøre osmoregulering og derved give et fejlagtigt billede af SV tolerancen.

Salman & Eddy (1989), Zaugg et al., (1983) og Duston (1993) fandt, at et forhøjet indhold af NaCl (7-12%) i foderet havde en positiv indvirkning på overlevelsen ved direkte overførsel til SV samt at aktiviteten af Na⁺,K⁺-ATPase steg, og derved forbedrede muligheden for osmoregulering. Da snæbllerne blev fodret med saltkrebs, ville der muligvis være en risiko for, at det ville forbedre snæbllernes SV tolerance. Saltkrebs kan tolerere forhold der går fra næsten FV til ekstremt høje saliniteter gennem forskellige mekanismer. Ofte tilpasses den indre osmolalitet til omgivelserne så de bliver isoosmotiske med omgivelserne, i dette tilfælde 13-15 ppt (Kirschner, 1979). Resultaterne indikerer ikke nogen markant forbedring af saltvandstolerancen, og med den mængde salt der blev tilsat vandet, samtidigt med at saltkrebsene blev skyllet i FV inden fodring, er det mindre sandsynligt at der blev skabt en saltkoncentration der var høj nok til at skabe en eventuel effekt. Saliniteten i FV karrene oversteg ikke på noget tidspunkt 0,5 ppt.

Da snæbellarverne i de første test var af ringe størrelse var det ikke muligt, at måle relevante parametre som f. eks koncentrationen af natrium i plasma. I stedet målt indholdet af vand i hele fisk efter 4 og 24 timer. Hvis snæbllerne havde været istand til aktivt at regulere deres indre miljø ville det kunne registreres ved at måle BWC. Efter overførsel til SV vil fisken tabe vand, men begynde at drikke vand til at opveje tabet. Det havde været mere hensigtsmæssigt at måle BWC efter en længere periode i SV, men dette var ikke muligt p.g.a. den ringe overlevelse. Dette vurderes senere i forbindelse med SV-akklimering over tid.

En væsentlig forskel fra salinitetstest I-III og til IV samt "helt I" og "helt II" var temperaturen. I test I-III var den 5°C, i test IV 12 °C, mens den i "helt I" og "helt II" var 10 °C. Sigholt & Finstad (1990) fandt, at juvenile laks både som presmolt og smolt havde dårlige overlevelse ved lave temperaturer (2,0°C; 4,1°C) i forhold til højere (8,7°C). Dårlig overlevelse ved lave temperaturer kan skyldes hæmning af aktiv iontransport, f.eks ved hæmning af Na⁺,K⁺-ATPase (Staurnes et al., 2001). Hvis snæbellarver drifter til havs umiddelbart efter klækning er 5°C dog ikke en urealistisk havtemperatur, og derfor en rimelig temperatur at bruge i forsøg. I test IV har snæbelynglen nået en størrelse, som den i naturen formodentlig ville have opnået i

løbet af foråret, og 12 °C er derfor en mere realistisk temperatur at anvende.

4.1.3 SV-tolerance i andre arter:

Den art der ligner snæblen mest, er dens nære slægtning helten (*C. lavaretus*). Helten har, som tidligere nævnt, sin opvækst i mere brakke områder end helten. For at sammenligne udviklingen af saltvandtolerance i disse to nært beslægtede arter udsattes helt i to forskellige størrelse for samme type salinitetstest, dog med enkelte ændringer i saliniteterne. Helten i test I udviste en ringe tolerance i forhold til snæblerne i test I-III til trods for, at helten var betydeligt større (fig. 3.2.10 & 3.2.11). Helten på dette stadie var dog ikke metamorforeret. I test II (fig. 3.2.12 & 3.2.13) var tolerancen dog væsentligt forbedret, men helten var, ligesom snæblerne i test IV, næsten fuldt metamorforerede. Selvom der skete en forbedring af SV tolerancen hos helten, er tolerancen mindre end hos snæbler i næsten samme størrelse. Dette stemmer godt overens med at helten lever i mere brakke miljøer, og derfor ikke er afhængig af at kunne hypoosmoregulere i samme grad som snæblen. Resultaterne indikerer, at snæblen og helten har udviklet sig i forskellig retning, og at de er tilpasset forskellige miljøer. Madsen et al., (1996) målte muskelvandindholdet (MWC) i helt (40-60 g) efter direkte overførsel til 25 og 32 ppt. Målingerne fandt sted i op til 14 dage. Det viste sig, at MWC ved 25 ppt faldt indtil 24 timer, hvorefter det steg til det initiale niveau efter 72 timer. Dette indikerer, at helten ved den givne størrelse er i stand til aktivt at hypoosmoregulere.

Jäger et al., (1981) testede udviklingen af SV-tolerancen i de tidlige stadier af helt (*C. lavaretus*) ved direkte overførsel til SV op til 23 ppt, og fandt tilsvarende en størrelsesafhængig overlevelse med den bedste overlevelse efter metamorfosen. Det noteredes også, at der var et mindre fald i overlevelsen i tiden efter blommesækken var opbrugt, og til efter metamorfosen. Madsen et al., (1996) fandt, at større helt (40-60 g) klarede direkte overførsel til 25 ppt fra FV, men døde ved overførsel til 32 ppt. Larver af *Coregonus peled* (Stor svævhelt) udviklede en øget tolerance med alderen. Nyklækkede larver døde ved saliniteter højere end 8 ppt, mens larver i alderen 30-45 dage var i stand til at overleve ved 20 ppt (Nesterenko, 1976). Disse resultater stemmer godt overens med resultaterne for snæblen der viser en størrelsesafhængig

forbedring af SV tolerancen, sandsynligvis som følge af udvikling af de osmoregulatoriske organer.

Snæblens livscyklus minder om to arter af Stillehavslaks: ketalaks (hundelaks, *Oncorhynchus keta*) og pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*). Disse arter trækker til havs umiddelbart efter klækning, og kan på dette tidspunkt hypoosmoregulere (Weisbart, 1967). Hos disse arter spiller størrelsen tilsyneladende også en rolle idet Iwata et al., (1982) fandt at yngel af pukkellaks med størrelsen 0,4-1,4 g var bedre til at akklimere til SV end yngel med størrelsen 1,8-2,3 g. Houston (1961) fandt dog, at yngel med størrelsen 1,6 g bedre kunne regulere mængden af chlorid i kroppen end yngel med størrelsen 0,9 g. I det førstnævnte forsøg blev japanske laks anvendt, mens canadiske indgik i det andet, og muligheden for genetiske adaptationer til forskellige miljøer kunne være en faktor. Resultaterne indikerer, at evnen til hypoosmoregulering er størrelsesafhængig, og at dette finder sted på forskellige stadier af de enkelte arters udvikling. Som tidligere nævnt skal ørred og Atlanterhavslaks gennemgå en smoltifikation for at opnå en maksimal evne til at overleve i et højsalint miljø. Parry (1960) viste dog, at der allerede i de tidlige udviklingsstadier af yngel og larver sker en forbedring af SV-tolerancen. Larver af laks (1 og 6 uger efter klækning) havde meget kort middellevetid (8 og 19 timer; 0,5 og 2 timer) i SW (33,9 ppt og 25,4 ppt), mens den var væsentlig højere (45 og 45 timer; 76 og 96 timer) i 17 ppt og 8,5 ppt. Middellevetiden i SV steg med størrelsen og nåede maksimum ved smoltifikationen. Som nævnt i introduktionen er smoltifikationen det tidspunkt, hvor laks og ørred opnår deres højeste grad af saltvandtolerance. I forbindelse med denne sker der også en række fysiologiske ændringer (Hoar, 1988), hvilket kunne indikere, at en sådan er nødvendig for nogle arter for at opnå en større grad af saltvandtolerance. Zydlewski & McCormick (1996) fandt at den amerikanske shad (*Alosa sapidissima*) ikke kunne overleve i 35 ppt ved direkte overførsel før 36 dage efter klækning. Overlevelsen efter 24 timer steg til 89% 45 dage efter klækning, hvilket var tidspunktet for larve til yngel metamorfosen.

I forbindelse med larve til yngel metamorfosen skal en vis størrelse opnås før denne foregår. Fisk ved en given alder kan have forskellig størrelse, hvilket kan være genetisk betinget eller et resultat af opvækstforholdene. Lav temperatur og dårlig

fødetilgang kan betyde dårlig tilvækst, hvilket udskyder metamorfosen og den følgende forbedring af hypoosmoreguleringen.

4.2 Akklimering:

Akklimeringstesten giver et billede af, om gradvis tilvænnning til stigende saliniteter (10-25 ppt) vil forbedre overlevelsen af snæbel i havet. På nogle lokaliteter i Vadehavet findes eustarielignende forhold, f.eks i Ho Bugt (fig.1.7.1), hvor saliniteterne er stærkt svingende, men generelt ikke er voldsomt høje, så en sådan akklimering kunne finde sted. En gradvis øgning af saliniteten ville kunne stimulere udviklingen af hypoosmoregulatoriske funktioner. F.eks kunne Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten øges.

Akklimeringstest I (fig. 3.3.1) viste, at overlevelsen faldt kraftigt efter saliniteten blev øget til 20 ppt. Dog kan miljøet i forsøgsopstillingen have influeret på overlevelsen, for nogenlunde samtidig skete et fald i overlevelsen i FV. Faldet her var dog langt mindre, men vandkvaliteten var muligvis blevet forringet da der ikke blev skiftet vand i forsøgsperioden. Dog tyder det kraftige fald i SV på, at saliniteten havde størst indflydelse. Dette understøttes også af BWC (fig.3.3.2), hvor der observeredes et signifikant fald i BWC fra snæbellarver i 15 ppt til snæbellarver i 20 ppt. Da fiskene i 20 ppt havde haft 4 dage fra saliniteten blev hævet til eventuelt at regulere BWC, og dette ikke skete, indikerer dette at snæbellerne på dette tidspunkt ikke aktivt kunne hypoosmoregulere. Madsen et al., (1996) viste at MWC i helt retunerede til sit initiale niveau 72 timer efter overførsel til SV. Seidelin et al., (2000) fandt at MWC i ørreder (*Salmo trutta*) nåede tilbage til udgangsniveauet 5 dage efter overførsel. Dette indikerer at 4 dage ikke et urealistisk tidsrum at se en regulering i. I akklimeringstest II (fig.3.3.3) observeredes en bedre overlevelse ved høje saliniteter. Efter 4 døgn ved 25 ppt var overlevelsen 73%, og efter 4 døgn ved 30 ppt var overlevelsen 63%. Forbedringen i overlevelsen skyldes sandsynligvis den øgede størrelse af snæbellerne, hvilket medfører en øget udvikling af de osmoregulatoriske organer såsom gæller, tarm og nyrer samt et mindre overflade/volume ratio. Efter 408 timer observeredes et fald i overlevelsen i FV. Overlevelsen efter 480 timer var 73% så noget tyder på, at en miljømæssig faktor har indvirket på forsøget. Til forskel fra akklimering I blev vandet i akvarierne skiftet en gang om uden for at undgå

forringelse af vandkvaliteten som følge af snæbelynglens øgede størrelse. Håndteringen af akvarierne i denne forbindelse kan muligvis have påført fiskene stress.

Gennem forsøget var snæbelynglens BWC (fig.3.3.5) generelt lavere i SV end i FV undtagen ved 25 ppt, hvor det lå på samme niveau som i FV. Det skal noteres, at BWC i snæbelynglen ved 20 og 25 ppt ikke var nævneværdigt lavere end ved 10 ppt, hvilket indikerer en øgning af snæblernes hypoosmoregulatoriske formåen. Forskellen på BWC i snæbelynglen mellem FV og SV var dog ikke signifikant på noget tidspunkt, men der blev observeret et fald i BWC i FV gruppen til tiden 384 timer. Faldet i BWC for FV ved 384 timer kunne skyldes en stressfaktor. Stressede fisk øger sandsynligvis respirationen, og derved gøres gællen mere permeabel (Staurnes, 2001), hvilket har indvirkning på vand- og ionfluxen. Det er dog mindre sandsynligt at vand ville strømme ud af snæblerne i FV.

Iwata et al., (1982) viste, at yngel af ketalaks (hundelaks) forbedrede deres hypoosmoregulatoriske evne ved at opholde sig i 12 ppt i 12 timer inden overførsel til højere salinitet. Baggerman (1960) fandt, at ketalaks og pukkellaks foretrak SV fremfor FV i migrationsperioden, og hvis de ikke fik adgang til SV døde de. Iwata & Komatsu (1984) fandt, at ketalaks trak til havs umiddelbart efter klækning, og en stor del derefter opholdt sig i SV med salinitet på 10-15 ppt i op til 2 dage inden de trak til havs. Dette indikerer, at et ophold i en vis periode i brakvand kan forbedre den hypoosmoregulatoriske formåen, hvilket også virker sandsynligt for snæblens vedkommende. Det ville have været interessant at lave en direkte overførsel af snæbelyngel i samme størrelse som i akklimeringstest II for at se eventuelle forskelle, men dette var ikke muligt af ressourcemæssige årsager.

4.3 Immunohistokemi:

Farvning af gællevæv med antistof mod Na^+, K^+ -ATPase og $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporterens gav ikke noget specifikt billede af udviklingen i chloridcelle antal og deres placering. Billederne (fig. 3.4.1-3.4.10) viser dog tydeligt den generelle morfologiske udvikling der sker i gællen fra klækning til det tidspunkt, hvor metamorfosen er i det sidste stadie. På fig 3.4.1 ses et snit af det rudimentære gællevæv i en nyligt klækket snæbel. På dette tidspunkt er gællen ikke differentieret,

og der ses ikke opdeling i filamenter og lameller. Der ses dog enkelte immunoreaktive celler, hvor der var farvet for Na^+, K^+ -ATPasens α -subunit. Cellerne er placeret i overfalden af gælløvævet og er sandsynligvis chloridceller, idet Na^+, K^+ -ATPase enzymet ofte er lokaliseret i sådanne celler i gælløvæv (Uchida et al., 1996). Der ses ikke nogen nævneværdig forskel mellem gælløvæv i snæbellarver i FV og 18 ppt (fig. 3.4.2), men da snæbterne kun havde opholdt sig i 18 ppt i 48 timer kan tidsrummet have været for kort til at eventuelle ændringer i gælløvævet kunne finde sted. Snæbternes ringe hypoosmoregulatoriske evne påvirkes af, at de på dette tidspunkt ikke er i stand til at regulere mængden og placering af Na^+, K^+ -ATPase-enzymet. 15-19 dage gamle snæbellarver og 32-35 dage gamle snæbellarver blev også undersøgt, men billedet var det samme som hos 0-4 dage, og er derfor ikke medtaget.

Efter 150-170 dage var der sket en markant ændring i gællens morfologi. Ud over at mængden af væv var øget, var vævet også langt mere differentieret med udvikling af synlige filamenter og lameller. På fig. 3.4.3 ses et gællesnit af en snæbel fra FV, og der er tydelige immunoreaktive (Na^+, K^+ -ATPase α -subunit) celler. Cellerne var lokaliseret på både filamenter og lameller. Ved sammenligning med snæbler i 18 og 25 ppt (fig. 3.4.4 & 3.4.5) ses der ikke nogen forskel i placeringen af celler ligesom billederne ikke muliggør at vurdere størrelsen af cellerne. Uchida et al., (1996) undersøgte ketalaks med en størrelse på 2-3 g efter overførsel fra FV til SV (ca. 19 ppt). Det viste sig, at antallet af CC på filamenterne ikke ændrede sig, mens antallet på lamellerne faldt. Denne observation var dog først tydelig efter 7 dage. Størrelsen af CC på filamenterne var ca. 1.8 gange større end i FV efter 21 dage. Seidelin et al., (2000) fandt i ørred (*Salmo trutta*), at antallet af immunoreaktive celler (Na^+, K^+ -ATPase α -subunit) på filamenterne steg svagt, mens antallet af celler faldt drastisk (50 %) på lamellerne efter kun en dag i SV (25 ppt). Ud fra dette kan man forvente ændringer i antallet og placeringen af CC under akklimering til SV, men dette kræver formentligt fuldt differentieret gælløvæv og mere omfattende undersøgelser for at bestemme i snæblen. Mine undersøgelser kan dog bruges til at konstatere, at der findes celler i snæbelgællen der minder om typiske chloridceller med højt indhold af NaK -ATPasen som set i andre arter.

På fig. 3.4.6-3.4.10 ses snit af gælle væv farvet med antistof mod $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC). Der ses ingen tydelig krydsreaktion mellem antistoffet og epitoper i gælle vævet hverken i FV eller SV fisk. På baggrund af mine forsøg, kan det dog ikke konkluderes hvorvidt det negative resultat skyldes fravær af cotransporter proteinet, brugen af heterologt antistof med dårlig krydsreaktionsevne, eller manglende optimering af proceduren. Det anvendte antistof er brugt med succes til påvisning af cotransporter proteinet i gællen hos en række andre benfisk (Atlantehavslaks: Pelis & McCormick, 2001; regnbueørred: Behnke et al., 1996; havørred: Tipsmark et al., 2002; tilapia: Wu et al., 2003), så sandsynligheden er høj for at det ville kunne genkende epitopen i snæblen. Af tidsmæssige årsager blev en optimering ikke forsøgt, men en primær antistofkoncentration på 50x som anvendt her svarer til hvad der er anvendt i andre forsøg. Tipsmark et al., (2002) fandt, at der var kraftig immunofarvning for NKCC i ørred (*S. trutta*) i celler i filamenterne og ved basen af lamellerne efter overførsel til SV (28 ppt), mens immunofarvningen i FV gæller var svagere og mere diffus. Dette er som forventet idet NKCC er koblet til SV-akklimering, hvor der ofte ses en kraftig stigning i mængden af dette protein (Behnke et al., 1996; Wu et al., 2003).

4.4 Drikkerate:

Drikkerateforsøgene viste, at snæbelyngel med en gennemsnitsstørrelse på ca. 175 mg og 33 mm havde en gennemsnitlig en drikkerate i FV på ca. 10 ml/kg/h (fig. 3.5.1). Dette gjaldt både for drikketiden 4 og 2 timer. Normalt ville man ikke forbinde FV akklimerede fisk med indtagelse af vand i særlig grad da vand jo trænger passivt ind i fisken (Boeuf, 1993). Observationen af et væsentligt vandindtag er dog i overensstemmelse med tidligere observationer hos andre arter på tidlige udviklingsstadier. Tytler et al., (1990) fandt, at regnbueørredlarver (*Oncorhynchus mykiss*) 40 dage efter klækning havde en drikkerate på 3,2 ml/kg/h. Disse larver havde en vægt på ca. 250 mg. Fuentes & Eddy (1997) fandt, at juvenile laks (*S. salar*) med en vægt på 300-500 mg, havde en drikkerate på 1,4 ml/kg/h. Perrott et al., (1992) fandt, at regnbueørreder af ukendt størrelse havde en drikkerate på 0,07 ml/kg/h i FV og 1,42 ml/kg/h i SV. Fuentes & Eddy (1997) fandt, at drikkeraten i laks FV falder fra larve- til yngelstadiet. Baggrunden for at juvenile fisk drikker relativt

store mængder vand i FV er ikke kendt. Tytler et al., (1990) foreslog, at det havde en osmoregulatorisk funktion i tarmen, hvor det medvirker til optag af især divalente ioner. Ydermere blev det foreslået at drikning i blommesækclarver kunne medvirke til at rense tarmen for blommesæk-rester. Snæbterne blev fodret med saltholdigt foder, men da fodringen blev stoppet 24 timer før forsøgsstart samtidigt med at promillen i saltkrebsopdrættet var relativt lav (13-15 ppt) vurderes det, at belastningen herfra ikke gav anledning til stimulering af drikning.

Drikkeraten hos snæbterne er dog markant højere end for regnbueørred og lakseyngel, og kan ikke umiddelbart forklares, men kan skyldes at f. eks gællerne var dårligt udviklede og vandindtaget var nødvendigt for optag af forskellige metabolitter fra vandet.

Der er generel enighed om, at benfisk i SV aktivt drikker vand for at erstatte det vand der tabes til omgivelserne (Karnaky, 1988). For snæbternes vedkommende observeredes en stigning i drikkeraten efter overførsel til SV (fig 3.5.1). Denne stigning var dog kun markant når drikketiden var 2 timer. Ved en drikketid på 4 timer blev drikkeraten i SV kun beregnet til at være marginalt højere end i FV. Denne metode afhængighed kan forekomme underlig, men skyldes at den forlængede drikketid giver en lavere rate forudsat at der var opnået et steady-state i indtagelsen af radioaktive isotoper. Den korte drikketid er sandsynligvis den mest pålidelige da passagetiden gennem snæbelynglen ikke er kendt.

Laksesmolt havde 7 dage efter overførsel til SV en drikkerate på 7 ml/kg/h (Fuentes & Eddy, 1997). Denne relativt mindre drikkerate er sandsynligvis et resultat af den meget mindre overflade/volume ratio i laksesmolt i forhold til snæbler i den anvendte størrelse. Med så stor en relativ overflade vil vandtabet blive væsentligt større, og der skal drikkes mere vand for at kompensere. De præliminære målinger af drikkerater i snæbler indikerer at snæbelyngel i den givne størrelse udviser et drikkerespons ved overførelse til hyperosmotiske forhold. Ved sammenligning med velundersøgte fiskearter må det tolkes som en aktivering af de hypoosmoregulatoriske mekanismer. Dette understøtter resultatet af salinitetstest IV, hvor der var sket en udvikling i snæbternes saltvandstolerance.

4.5 RNA/ Na⁺,K⁺-ATPase :

Ved anvendelse af en cDNA probe fra ørred viste der sig et hybridiseringsbånd i totalRNA fra snæbelgæller. Transkriptlængden blev bestemt til 3,6 kb og er sandsynligvis α -subunit NaK-ATPase. Andre har fundet størrelsen af mRNA for denne subunit til at være 3,7 kb i laks, ørred og regnbueørred (Kisen et al., 1994). Mængden af mRNA for Na⁺,K⁺-ATPasens α -subunit i gællevæv stiger ofte efter overførsel af fisk fra FV til SV (Seidelin et al., 2001; Madsen et al., 1995). Dette er et respons på et krav om større hypoosmoregulatoriske egenskaber, hvilket ofte opnås gennem en øget Na⁺,K⁺-ATPase aktivitet i gællernes chloridceller i filamentet. I snæblernes tilfælde ses en stigning i mRNA niveauet i gællerne efter 2 dage i SV, mens niveauet falder efter 10 dage i både FV og SV (fig. 3.6.2). Madsen et al., (1995) fandt et øget mRNA niveau i gællevæv fra ørred (1+) 1 dag efter overførsel til SV (25 ppt), med det højeste niveau efter 2 dage, hvorefter niveauet faldt. Seidelin et al., (2000) fandt at mRNA niveauet i gællevæv fra ørred (1+) nåede sit højeste niveau 12 timer efter overførsel til SV (25 ppt), hvorefter det faldt. I ørredpresmolt (*S. trutta*) ses en stigning i mRNA niveauet, forud for eller sideløbende med forøgelse af Na⁺,K⁺-ATPase enzymmængden, som forberedelse til havmigrationen (Nielsen et al., 1999). Øgningen af mRNA i snæblens gællevæv er sandsynligvis udløst af overførslen til saltvand og indikerer en øget evne til at hypoosmoregulere ved denne størrelse.

Efter overførsel til SV (25 ppt) steg gælle Na⁺,K⁺-ATPase aktiviteten gradvist hos snæbelynglen (fig. 3.7.1). Enzymaktiviteten i SV er dog ikke signifikant højere end i FV efter 2 og 7 dage, mens dette er tilfældet efter 10 dage, men kun som følge af et uventet fald i FV. Madsen et al., (1996) fandt en stigende Na⁺,K⁺-ATPase aktivitet i helt (40-60 g) som respons på overførsel fra FV til SV (25 ppt). I ketalaks ses en stigning i gælle Na⁺,K⁺-ATPase aktivitet i FV under udvikling fra larve- til yngelstadiet (Uchida et al., 1996), som minder om den stigning der ses under smoltifikationen i FV hos andre laksefisk (Hoar, 1988). Zydlewski & McCormick fandt, at i shad (*Alosa sapidissima*) steg Na⁺,K⁺-ATPase aktiviteten til det tredobbelte efter overførsel til SV (35 ppt) og nåede sit højeste niveau efter 5 dage. Stigningen i gælle Na⁺,K⁺-ATPase aktiviteten i de ovennævnte arter indikerer, at disse forøger deres hypoosmoregulatoriske formåen ved overgang til SV. Dette er mindre udtalt i

snæblen ved den givne størrelse da der ikke sker en signifikant øgning i gælle Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten fra FV til SV undtagen ved 10 dage. Værdierne i FV for snæblernes vedkommende ligger dog højere i forhold til helt (40-60 g), hvor aktiviteten i FV er ca. $1 \mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/h}$ (Madsen et al., 1996), mens Nielsen et al., (1999) fandt at aktiviteten i ørreder (1+) udenfor smoltperioden lå på ca. $2 \mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/h}$. Dette kan indikere, at snæblen ved den givne størrelse (7-9 cm) har nået et udviklingsstadium, hvor havmigrationen er ved at blive "forberedt" bl.a. ved at øge Na^+, K^+ -ATPase aktiviteten i gællen. Yderligere forøgelse i SV vil derved ikke være så udpræget. Denne betragtning svarer til hvad man ser hos smoltificerende laksefisk. Hos f.eks. ørred og laks (*S. trutta* & *S. salar*) stiger enzym aktiviteten i FV i løbet af foråret, og når et niveau som ofte kun stiger marginalt eller endda falder efter overgang til SV (Boeuf, 1993). Nielsen et al., (1999) fandt, at $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase aktiviteten lå mellem ca. 7 og $10 \mu\text{mol P}_i/\text{mg protein/h}$ i ørreder fra forskellige danske åer i smoltperioden.

Der blev også forsøgt at påvise tilstedeværelse af mRNA for $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporteren (NKCC), men kvaliteten af hybridiseringen var ikke tilstrækkelig til at sige noget om udviklingen i NKCC mRNA niveauet. Det mest sandsynlige er dog, at der ville være sket en øgning af mængden af mRNA efter overførsel til SV. Behnke et al., (1996) og Pelis et al., (2001) observerede en øget mængde NKCC i gællerne på SV-akklimerede regnbueørreder og laks. En anden mulighed er, at NKCC først spiller en rolle senere i snæbelynglens livscyklus, hvilket resultaterne af de immunohistokemiske farvning understøtter. Det kan selvfølgelig til en vis grad tænkes i FV, men næppe, at snæblen kan udskille ioner i SV uden brug af NKCC.

4.6 Feltforsøg:

Fiskeri med driftnet i Hjortvad Å skulle give et billede af om snæbellarver driftede ned igennem vandløbet efter klækning.

Man ved at snæbler gyder i en kort periode fra sidst i november til midten af december, og man kan derfor ud fra temperaturen estimere klækketidspunktet idet man ved at snæbelæg kræver ca. 400 daggrader (i dette tilfælde $100 \text{ dg} \times 4^\circ\text{C}$, Hvidt & Christensen, 1990) før de klækker, men det var først muligt at følge temperaturen fra først i januar måned 2002. Den estimerede vandtemperatur fra medio november

til og med december 2001 blev sat til 4°C (180 daggrader). Da middeltemperaturen i Hjortvad Å fra d. 4/1-01 til første befiskning 11/2-02 var 5,5°C (209 daggrader) gav det 389 daggrader, men da elfiskeri viste at snæbterne ikke var modne sidst i november vurderedes det, at gydningen først fandt sted et stykke ind i december, hvilket betød at klæketidspunktet ville være ultimo februar. Fiskeriet med driftnet resulterede ikke i fangst af snæbellarver, men fiskeriet var besværliggjort af de store nedbørsmængder der ramte området i februar/marts 2002. Dette betød, at store mængder løsrevet materiale fyldte nettene og det var kun muligt at fiske to timer af gangen. Samtidigt er gydebestanden faldende, hvilket påvirker antallet af larver der klækker (Jensen et al., 2003). En undersøgelse af Grøn (1991) påviste snæbellarver i drift på samme strækning af Hjortvad Å, med samme metode. Larverne (43 stk.) blev fanget sidst i februar og først i marts opstrøms sandfanget, mens der ikke blev fanget larver nedstrøms sandfanget. Størstedelen af larverne havde stadig blommesæk. Hvidt & Christensen (1990) påviste snæbellarver i drift i på forskellige strækninger af Vidåen, med de højeste antal ved udløbet af Rudbøl Sø. Størrelsen på snæbterne lå på 11-30 mm, og de blev fanget fra starten af marts til ind i maj måned. Dette stemmer godt overens med det faktum at elektrofiskeri i Rudbøl Sø gav to snæbler på 37 og 41 mm. Dette indikerer, at snæbterne kan tage ophold i stillestående partier, mens en del muligvis rives med af strømmen, hvis f. eks. vandstanden stiger.

Undersøgelser af Næsje et. al (1986) og Lindroth (1957) har påvist, at den største drift af heltlarver (*C. lavaretus*) finder sted om natten, men under klækning af snæbellarver i laboratoriet kunne det konstateres, at kraftig belysning øgede klækkeraten. Det er derfor rimeligt at antage en fototaktisk reaktion også i naturen, og det er mindre sandsynligt at fiskeri om natten havde givet bedre resultater.

Elektrofiskeri i Rudbøl Sø gav mulighed for at dække et stort område. Fiskeriet blev dog besværliggjort af kraftig blæst og deraf følgende nedsat sigtbarhed. De to fangne snæbler på 37 og 41 mm var fuldt metamorfoserede, og blev fanget ved udløbet af søen. Når snæbterne har nået denne størrelse må det formodes, at de har mulighed for at styre deres position i vandløbet til en vis grænse. At de har taget ophold i søen kunne være en indikation på, at snæbterne ikke er klar til at leve i Vadehavet umiddelbart efter klækning. Laboratorieforsøgene viste også, at der skete en

forbedring af saltvandtolerancen sammenfaldende med metamorfosen, men det er ikke givet af de fangne individer inden for kort tid ville trække til havs.

4.7 Perspektivering:

Snæblen er i forhold til f.eks laks og ørred en meget lidt undersøgt art. Undersøgelserne i dette speciale giver et billede af, hvordan snæblens saltvandtolerance er i de tidlige stadier af deres udvikling, hvor der er begrænset viden om deres færden i vandløbene. Der er dog nogle rent fysiske problemer i de helt tidlige stadier, hvor der kun er en begrænset mængde målinger der kan udføres på grund af larvernes ringe størrelse. En parameter der vil give et godt billede af udviklingen er gælle Na^+, K^+ -ATPasen, fordi den hos andre arter har vist sig at være en god indikator på evnen til at akklimere til SV. Den skulle så følges fra det tidspunkt, hvor der er gællelevæv nok til at måle, hvilket sandsynligvis er muligt tidligere end det er sket i dette forsøg. Gælle Na^+, K^+ -ATPase aktivitetsmålinger bruges ofte til at forudsige SV-tolerancen i laksefisk i forbindelse med udsætninger (Staurnes, 2001). Dog ser det ud til, at udsætningsstørrelsen på snæblen (3-5 cm) da udsætningerne startede i 1987 ikke har givet anledning til problemer, da resultatet blev en kraftig forøgelse af bestanden. Dette kan dog have været betinget af særligt gunstige forhold på udsætningstidspunktet og det faktum, at udsætningerne blev foretaget i FV og snæblerne har taget ophold i vandløbene i en periode.

Der bør gøres en øget indsats for at belyse om snæblen optræder i FV på andre tidspunkter end lige før gydningen, og om alle individer forlader vandløbene, hvilket kunne gøres ved elektrofiskeri og mærkningsforsøg.

Flere forhold truer snæblens eksistens (1.6.4), men resultaterne i dette speciale indikerer, at snæbelbestanden sandsynligvis ikke kommer på fode igen, medmindre der sikres vilkår, der tilgodeser, at snæblen ikke er tilpasset SV umiddelbart efter klækning. I Vidåen findes den største bestand, som er relativt stabil (fig. 1.6.1), og de vilkår der findes her bør forsøges oprettet i andre vandløb. Meget taler for at forholdene i Magisterkøgen og Rudbøl Sø er de faktorer der er gunstige for bestandens opretholdelse her. Der bør dog foretages mere intensive undersøgelser der kan kortlægge ynglens færden i vandløbene. Det vil dog ikke være økonomisk og fysisk muligt at genoprette alle vandløb i Sydvestjylland inden for en overskuelig

fremtid, men det bør tilstræbes at skabe enkelte steder i alle betydende vandløb, det være sig indskudte søer eller vådområder der oversvømmes om foråret. Sådanne områder vil kunne forlænge snæbelynglens opholdstid i FV og dermed give mulighed for at udvikle den saltvandtolerance der skal til for at overleve i Vadehavet, inden bestandene helt forsvinder i de vandløb, hvor den er for nedadgående. Det bør også overvejes at foretage støtteudsætninger i forbindelse med forbedringer i vandløbene. Hvis dette opfyldes sammen med en generel vandløbsforbedring, er der chance for, at snæblen har en fremtid i de sydvestjyske åer og Vadehavet.

5. Konklusion:

Snæbelyngel udviser en størrelsesafhængig udvikling af saltvandtolerance. Der sker en væsentlig forbedring af overlevelsen i SV med høj salinitet som følge af metamorfosen.

Akklimeringsforsøg, hvor saliniteten øges gradvist, indikerer også en størrelsesafhængig udvikling i saltvandtolerance med en væsentligt forbedret overlevelse på yngelstadiet i forhold til larvestadiet. Gradvis akklimering til stigende salinitet har dog ikke nogen overordnet gunstig effekt på snæblens overlevelse ved moderate saltholdigheder.

Den øgede saltvandtolerance kommer til udtryk ved at snæbelynglen aktivt kan hypoosmoregulere, hvilket ses ved at snæbelyngel med en gennemsnitsstørrelse på 175 mg kan regulere sit kropsvandindhold, øge sin drikkerate i SV samt at snæbelyngel på 2-4 g udviser en tendens til øget gælle Na^+ , K^+ -ATPase aktivitet i SV.

Immunohistokemiske farvninger viser tilstedeværelse af Na^+ , K^+ -ATPase enzymet i diskrete celler i gællen. Udvikling i mængden af dette enzym følger den generelle gælleudvikling, hvilket forbedrer muligheden for hypoosmoregulering. Der ses ikke nogen markant ændring af antallet af immunoreaktive celler eller deres størrelse efter SV-overførsel ligesom placeringen ikke ændres.

Helt udviser en størrelsesafhængig saltvandtolerance med en væsentligt forbedret overlevelse for helt yngel i forhold til heltlarver i SV med høj salinitet. Generelt er heltens saltvandtolerance dårligere end snæblens, hvilket afspejler heltens tilpasning til mindre saline miljøer.

Den størrelsesafhængige saltvandtolerance taler for, at snæbelyngel har en opvækstperiode i FV som er nødvendig for at opnå en størrelse, der tillader snæbelynglen at overleve i det højsaline Vadehav.

Referencer:

- Alderdice, D. F. (1988). Osmotic and ionic regulation in teleost egg and larvae. In: Fish Physiology, Vol 11A, Hoar, W. S. & Randall, D. J. (eds.), Academic Press, San Diego, pp 163-251.
- Avella, M. & Bornancin, M. (1989). A new analysis of ammonia and sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Biol. 142: 155-175
- Baggerman, B. (1960). Salinity preference, thyroid activity and the seaward migration of four species of Pacific salmon (*Oncorhynchus*). J. Fish. Res. Bd. Canada vol 17(3): 295-322.
- Benkhe, R., Brill, S., Rao, M. & Forbush, B. III. (1996). Upregulation of the Na-K-Cl cotransporter protein in saltwater adaptation of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Bull. Mt. Desert Isl. Biol. Lab. 35: 24-25.
- Black, V. S. (1951). Changes in body chloride, density and water content of chum (*Oncorhynchus keta*) and coho (*O. kisutch*) salmon fry when transferred from fresh water to sea water. J. Fish. Res. Bd. Can. 8: 165-177.
- Boeuf G. (1993). Salmonid smolting: a pre-adaptation to oceanic environment. In Fish Ecophysiology. Rankin C.J, Jensen F.B. (eds). Chapman & Hall, London. S. 105-135.
- Bogé, G., Lopez, L. & Pérés, G. (1988). An in vivo study of the role of pyloric caeca in water absorption in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. Vol 91A: 9-13.
- Clarke, W. C & Hirano, T. (1995). Osmoregulation. In: Physiological ecology of Pacific salmon. Groot, C, Margolis, L. & Clarke, W. C. (eds.), UBC Press, Vancouver, pp 317-377.
- Conte, F. P. & Wagner, H. H. (1965). Development of osmotic regulation in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdnerii*). Comp. Biochem. Physiol. 14: 603-620.
- Duston, J. (1993). Effects of dietary betaine and sodium chloride on seawater adaptation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 105A, No.4: 673-677.
- Ejbye-Ernst, M. & Nielsen, H. T. (1997). Laksefiskene og fiskeriet i vadehavsområdet. Resumerapport. Danmarks Fiskeriundersøgelser, Ribe Amt & Sønderjyllands Amt, Boisen Print A/S, Grindsted.
- Evans, D. H. (1993). Osmotic and ionic regulation. In: The physiology of fishes. (ed. D.H. Evans). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 315-342.
- Foskett, K. J. & Scheffey, C. (1982). The chloride cell: Definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. Science Vol 215, 8: 164-166.
- Fuentes, J. & Eddy, F. B. (1997). Drinking in marine, euryhaline and freshwater teleost fish. In: Ionic regulation in animals: A tribute to professor W. T. W. Potts. N. Nazon, F. B. Eddy & G. Flik (eds.), Springer, Heidelberg, pp 135-149.
- Geering, K. (2001). The functional role of β subunits in oligomeric p-type ATPases. Journal of bioenergetics and biomembranes. 33; 5: 425-438.
- Grøn, P. N. (1991). Fiskeri med driftsnet efter snæbellarver i Hjortvad Å, februar-marts 1991. Ribe Amtsråd.
- Grøn, P. N., Møller, B., Nielsen, M. B., Ejbye-Ernst, M. & Larsen, L. K. (1988). Snæblen- en truet fiskeart. Ribe Amtsråd & Sønderjyllands Amtsråd, Form Tryk, Ribe.
- Haas, M. (1994). The Na-K-Cl cotransporters. Am. J. Physiol. 267: C869-C885.

- Hansen, M. M., Mensberg, K. –L. D. & Berg, S. (1999). Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coregonus* sp.) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 8: 239-252.
- Himberg, M. K. J & Lehtonen, H. (1995). Systematics and nomenclature of coregonid fishes, particularly in Northwest Europe. *Archiv für Hydrobiologie* 46: 39-47.
- Hiroi, J., Kaneko, T. & Uchida, K., Hasegawa, S. & Tanaka, M. (1998). Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. *Zoological science* 15: 447-453.
- Hoar W.S. (1988). The physiology of smolting salmonids. In: *Fish physiology*. Hoar W.S. & Randall D.J. (eds.), Vol. XIB. Academic press, New York, USA, pp, 275-343.
- Hogstrand, C. & Haux, C. (1985). Evaluation of the sea-water challenge test on sea trout, *Salmo trutta*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 82A, No. 2: 261-266.
- Holliday, F. G. T. (1969). The effects of salinity on the eggs and larvae of teleosts. In: *Fish Physiology*. Hoar, W. S. & Randall, D. J. (eds.), Vol I, Excretion, Ionic regulation, and metabolism, Academic Press, New York and London.
- Hvidt, C. B. & Christensen, I. G. (1990). Træk af nordsøsnæblens biologi i Vidå-systemet. Specialrapport, Zoologisk laboratorium, Aarhus Universitet.
- Hwang, P. P. & Hirano, R. (1985). Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. *The Journal of Experimental Zoology* 236: 115-126.
- Iwata, M., Hirano, T. & Hasegawa, S. (1982). Behavior and plasma sodium regulation of chum salmon fry during transition into seawater. *Aquaculture* 28: 133-142.
- Iwata, M. & Komatsu, S. (1984). Importance of eustarine residence for adaptation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry to seawater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 744-749.
- Jensen A. R., Ejbye-Ernst, M., Møller, B. & Grøn, P. N. (1999). Status for snæbelbestandene i Vadehavsområdet 1989-1998. Notat udarbejdet for Skov- og Naturstyrelsen af Ribe- og Sønderjyllands Amter.
- Jensen, A. R., Nielsen, H. T. & Ejbye-Ernst, M. (2003). National forvaltningsplan for snæbel. Miljøministeriet, Skov- og Naturstyrelsen, Sønderjyllands Amt & Ribe Amt, Schweitzer A/S.
- Jäger, T., Nellen, W., Schöder, W. & Shodjai, F. (1981) Influence of salinity and temperature on early life stages of *Coregonus albula*, *C. lavaretus*, *R. rutilus* and *L. lota*. *Rapport P.-v Réun. Cons. Int. Explor. Mer.* 178: 345-348.
- Kaneko, T., Hasegawa, S., Takagi, Y., Tagawa, M. & Hirano, T. (1995). Hypoosmoregulatory ability of eyed-stage embryos of chum salmon. *Marine Biology* 122: 165-170.
- Karnaky, K. J. (1998). Osmotic and ionic regulation. In: *The physiology of fishes*. (ed. D.H. Evans). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 57-176.
- Kirschner, L. B. (1979). Control mechanisms in Crustaceans and Fishes. In: *Mechanisms of osmoregulation in animals. Maintenance of cell volume*. Gilles, R. (ed.). John Wiley & Sons, New York, pp 157-222.
- Kisen, G., Gallais, C., Auperin, B., Klungland, H., Sandra, O., Prunet, P. & Andersen, Ø. (1994). Northern blot analysis of the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B, No.2: 255-259.

- Kjær, T. E & Juhl, T. S. (1990). Aspekter i forbindelse med opdræt af den truede fiskeart nordsøsnæbel, *Coregonus oxyrhynchus* L. Specialrapport, Zoologisk laboratorium, Aarhus Universitet.
- Kranenborg, J., Winter, H. V. & Backx, J. J. G. M. (2002). Recent increase of north sea houting and prospects for recolonization in the Netherlands. *Journal of fish biology* (Supplement A) pp 1-3.
- Laurent, P. & Hebibi, N. (1989). Gill morphometry and fish osmoregulation. *Can. J. Zool.* 67: 3055-3063.
- Laurent P. & Dunel S. (1980). Morphology of gill epithelia in fish. *Am. J. Physiol.* 238, R147-R159
- Lindroth, A. (1957). A study of the Whitefish (*Coregonus*) of the Sundsvall Bay district. Institute of freshwater research. Drottningholm report 38: 70-108.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J, Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lytle, C., Xu, J., Biemesderfer, D. & Forbush III, B. (1995). Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.* 269: C1496-C1505.
- Madsen S.S., Jensen M.K., Nøhr J., Kristiansen K. (1995). Expression of Na⁺, K⁺-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater. *Am. J. Physiol.* 269: 1339-1345.
- Madsen, S.S, Larsen, B. K & Jensen, F. B. (1996). Effects of freshwater to seawater transfer on osmoregulation, acid-base balance and respiration in river migrating whitefish (*Coregonus lavaretus*). *J. Comp. Physiol. B.* 166: 101-109.
- Marshall, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, and Zn²⁺ transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. *Journal of experimental zoology* 293: 264-283.
- McDowall R.M. (1988). Diadromy in fishes, migrations between freshwater and marine environments. Timber press, Portland, Oregon, USA, pp. 41-54.
- Muus, B. J. & Dahlstrøm, P. (1990). Ferskvandsfisk. Gads Forlag, København, pp 50-59.
- Nesterenko, N. A. (1976). Survival of *Coregonus peled* larvae in different salinities. *Journal of Ichthyology* 16 (3): 473-477.
- Nielsen, C., Madsen, S. S. & Björnsson, B. Th. (1999). Changes in branchial and intestinal osmoregulatory mechanisms and growth hormone levels during smolting in hatchery-reared and wild brown trout. *Journal of fish biology* 54: 799-818.
- Næsje, T. F. & Jonsson, B. (1986). Drift of cisco and whitefish larvae in a Norwegian river. *Transactions of the American fisheries society* 115: 89-93.
- Pakdel, F., Le Guellec, C, Vaillant, C., Le Roux, M.G. & Valotaire, Y. (1989). Identification and estrogen induction of two estrogen receptor (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other Ers. *Mol. Endocrinol.* 3: 44-51.
- Parry, G. (1960). The development of salinity tolerance in the salmon, *Salmo salar*, L., and some related species. *J. Exp. Biol.* 37: 425-437.
- Pelis, R. M. & McCormick, S. D. (2001). Effects of growth hormone and cortisol on Na⁺,K⁺, 2Cl⁻ cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124: 134-143.

- Pelis, R. M., Zydlewski, J. & McCormick, S. D. (2001). Gill $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter abundance and localization in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *Am. J. Physiol.* 280: R1844-R1852.
- Perrot, M. N., Grierson, C. E., Hazon, N. & Balment, R. J. (1992). Drinking behaviour in seawater and freshwater teleosts, the role of the renin-angiotensin system. *Fish Physiology and Biochemistry* Vol. 10, no. 2: 161-168.
- Pisam M, Caroff. A & Rambourg A. (1987). Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*; Their modifications during adaption to saltwater. *Am. J. Anat.* 79. 40-50.
- Pisam M., Prunet P., Boeuf G. & Rambourg A. (1988). Ultrastructural features of chloride cells in the gill epithelium of the Atlantic salmon, *Salmo salar*, and their modifications during smoltification. *Am. J. Anat.* 183: 235-244.
- Pisam M. & Rambourg A. (1991). Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.* 130: 191-232.
- Redeke, H. C. (1934). Über den Rheinschäpel, *Coregonus oxyrhynchus* L. *Verhandl. der Intern. Vereinigung für Limnologie* VI (2): 352-357.
- Salman, N. A. & Eddy, F. B. (1990). Increased seawater adaptability of non-smolting rainbow trout by salt feeding. *Aquaculture* 86: 259-270.
- Scheffel, H. J. (1999). Biologie des Nordseeschnäpels. In: *Der Nordseeschnäpel*. Offenbach, Verband Deutscher Sportfischer e.V: 12-37.
- Seidelin, M. & Madsen, S. S. (1999). Endocrine control of Na^+, K^+ -ATPase and chloride cell development in brown trout (*Salmo trutta*): interaction of insulin-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. *Journal of Endocrinology* 162: 127-135.
- Seidelin M., Madsen S.S., Blenstrup H. & Tipsmark C.K. (2000). Time course changes in the expression of Na^+, K^+ -ATPase in gills and pyloric caeca of brown trout (*Salmo trutta*) during acclimation to seawater. *Physiol. & Bioch. Zool.* 73(4): 446-453.
- Shikano, T. & Fujio, Y. (1998). Immunolocalization of Na^+, K^+ -ATPase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater acclimation. *The journal of experimental biology* 201: 3031-3040.
- Shiraishi, K., Kaneko, T., Hasegawa, S. & Hirano, T. (1997). Development of multicellular complexes of chloride cells in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae in seawater. *Cell Tissue Res.* 288: 583-590.
- Sigholt, T. & Findstad, B. (1990). Effect of low temperature on seawater tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 84: 167-172.
- Staurnes, M., Sigholt, T., Åsgård, T. & Baevefjord, G. (2001). Effects of a temperature shift on seawater challenge test performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture* 201: 153-159.
- Stoltze, M. (1998). Gulliste 1997. Miljø- og energiministeriet.
- Stoltze, M. & Pihl, S. (1998). Rødlister 1997 over planter og dyr i Danmark. Miljø- og miljøministeriet, Danmarks Miljøundersøgelser og Skov- og Naturstyrelsen.
- Sørensen, H. E. (1995). Vadehavet- marsk og mennesker. Forlaget Melbyhus, Skærbæk.
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*, 4. edition. W. H. Freeman, San Fransisco, California.

Talbot, C., Eddy, F. B. & Johnston, J. (1982). Osmoregulation in salmon and sea trout alevins. *J. exp. Biol.* 101: 61-70.

Tipsmark, C. K., Madsen, S. S., Seidelin, M.; Christensen, A. S., Cutler, C. P. & Gordon, G. (2002). Dynamics of Na⁺,K⁺, 2Cl⁻-cotransporter and Na⁺, K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of experimental zoology* 293: 106-118.

Tougaard, S., Koornstra, K. & Leeuwen; N. v. (1981). *Værn Vadehavet. Kasketot*, Biologforbundets Forlag Nr. 46.

Tytler, P., Tatner, M. & Findlay, C. (1990). The ontogeny of drinking in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 36: 867-875.

Uchida K., Kaneko T., Yamauchi K. & Hirano T. (1996). Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *J. Exp. Zool.* 276:193-200.

Ura K., Soyano K., Omoto, N., Adachi, S. & Yamauchi, K. (1996). Localization of Na⁺,K⁺-ATPase in tissues of rabbit and teleosts using an antiserum directed against a partial sequence of the α -subunit. *Zoological Science* 13: 219-227.

Veenstra, H. (1976). Tidevandslandskabets struktur og dynamik. In: *Vadehavet, et dansk-tysk-hollandsk naturområde*. Abrahamse, J., Joenje, W. & Leeuwen, N. v. (eds.), BYGD, Esbjerg.

Weisbart, M. (1968). Osmotic and ionic regulation in embryos, alevins and fry of the five species of Pacific salmon. *Canadian Journal of Zoology* 46: 385-397.

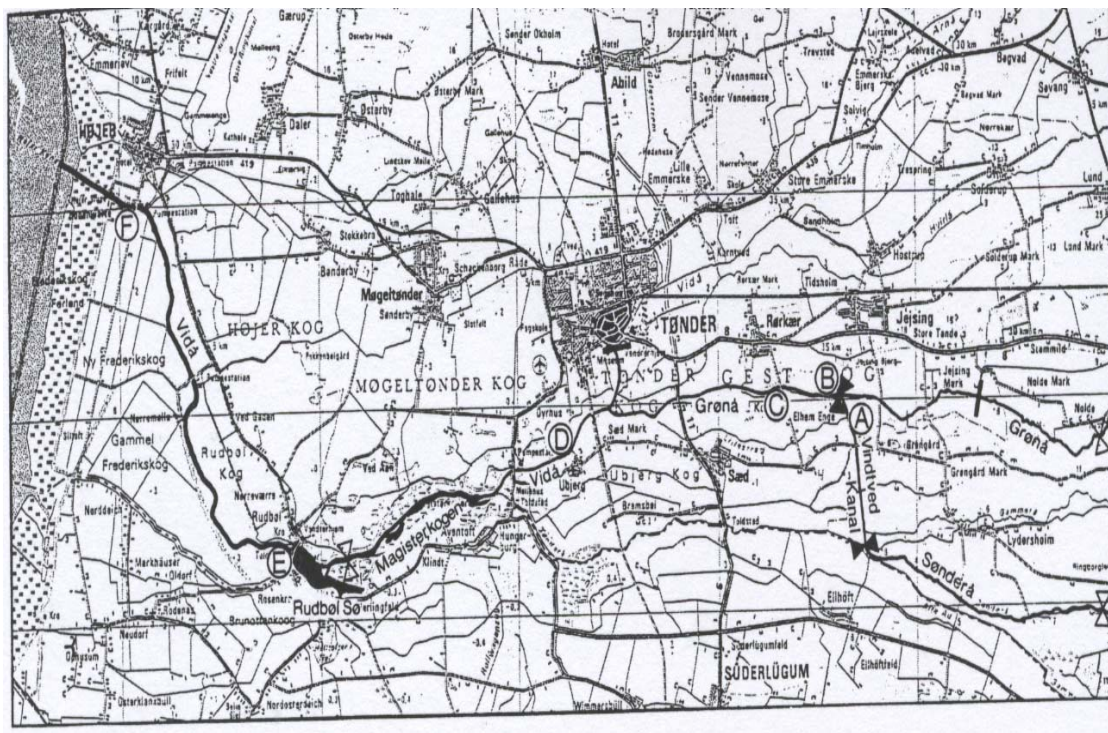
Wu, Y., Lin, L. & Lee, T. (2003). Na⁺,K⁺, 2Cl⁻-cotransporter: A novel marker for identifying freshwater- and seawatertype mitochondria-rich cells in gills of the euryhaline Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoological Studies* 42 (1): 186-192.

Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, N. J., Prentice Hall.

Zaugg, W. S., Roley, D. D, Prentice, E. F., Gores, K. X. & Waknitz, F. W. (1983). Increased seawater survival and contributions to the fishery of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by supplemental dietary salt. *Aquaculture* 32: 183-188.

Zydlewski, J. & McCormick, S. D. (1997). The ontogeny of salinity tolerance in the American shad, *Alosa sapidissima*. *Can. J. Aquat. Sci.* 54: 182-189.

Appendiks 2: Undersøgellesområde Rudbøl Sø.



(Fra Hvidt & Christensen, 1990)