

Snorre

Fiskeridirektoratet  
Biblioteket

TORSKEEGGETS VANN- OG IONEBALANSE

BASALSTUDIER OG EFFEKTEN AV EKOFISK RÅOLJE

AV

ANDERS MANGOR-JENSEN

HOVEDFAGSOPPGAVE I MILJØFYSIOLOGI TIL CAND. SCIENT.-  
EKSAMEN VED UNIVERSITETET I BERGEN.

ZOOLOGISK LABORATORIUM  
BERGEN 1982

TORSKEEGGETS VANN- OG IONEBALANSE

BASALSTUDIER OG EFFEKTE AV EKOFISK RÅOLJE

AV

ANDERS MANGOR-JENSEN

HOVEDFAGSOPPGAVE I MILJØFYSIOLOGI TIL CAND. SCIENT.-  
EKSAMEN VED UNIVERSITETET I BERGEN.

ZOOLOGISK LABORATORIUM

BERGEN 1982

## FORORD

Denne hovedfagsoppgaven er utført ved Zoologisk Laboratorium, Universitetet i Bergen, i samarbeid med Fiskeridirektoratets havforskningsinstitutt. Oppgaven ble utformet etter henvendelse til havforsker Snorre Tilseth og stipendiat Tor S. Solberg. Oppgavens problemstilling ble tilpasset cand. scient graden i samarbeid med min faglige veileder professor dr. philos. Hans Jørgen Fyhn.

De fleste forsøkene ble gjort på levende materiale. Da torskeegg kun er tilgjengelig noen ganske få måneder i året, ble forsøkernes omfang av denne grunn noe begrenset. Oppgaven lot seg likevel gjennomføre takket være god veiledning fra professor Fyhn og amanuensis Leivestad. En spesiell takk rettes til stipendiat Jørgen Riis-Vestergaard for praktisk veiledning i store deler av hovedfagstiden.

## INNHOLDSFORTEGNELSE

	Side
SAMMENDRAG . . . . .	1
KAPITTEL 1: INNLEDNING . . . . .	3
KAPITTEL 2: TORSKEEGGETS EMBRYOLOGI OG UTVIKLING . . .	10
KAPITTEL 3: DET BIOLOGISKE MATERIALET . . . . .	16
3.1 Forsøksdyr . . . . .	16
3.2 Dyrehold . . . . .	16
3.3 Oljebelastning . . . . .	17
KAPITTEL 4: METODER . . . . .	19
4.1 Aldersbestemmelser . . . . .	19
4.2 Analyttiske metoder . . . . .	19
4.2.1 Osmolalitetmålinger . . . . .	19
4.2.2 Kvantitative $Na^+$ , $K^+$ og $Cl^-$ analyser . . . . .	21
4.2.3 Kvantitative NPS analyser . . . . .	24
4.2.4 Bestemmelse av perivitellint volum . . . . .	29
4.2.5 Egenvektbestemmelser . . . . .	32
4.3 Veinger og målinger . . . . .	36
4.3.1 Måling av eggdiameter . . . . .	36
4.3.2 Våtvektmålinger . . . . .	36
4.3.3 Tørrvektmålinger . . . . .	38
4.4 Beregninger . . . . .	39
4.4.1 Vanninnhold i embryo . . . . .	39
4.4.2 Konsentrasjonsforhold i embryo . . . . .	40
4.4.3 Permeabilitet . . . . .	40
4.4.4 Diffusjonsareal . . . . .	42
4.4.5 Usikkerhetsberegninger . . . . .	42
KAPITTEL 5: RESULTATER . . . . .	44
5.1 Alderskjennetegn gjennom embryogenesen . . . . .	44
5.2 Plommeosmolalitet . . . . .	44
5.3 Volum av perivitellint rom . . . . .	46
5.4 Eggets våtvekt . . . . .	49
5.5 Eggets tørrvekt . . . . .	51
5.6 Eggdiameter . . . . .	54
5.7 Vanninnhold i embryo . . . . .	54
5.8 Konsentrasjon av oppløste stoffer . . . . .	56
5.8.1 Uorganiske ioner . . . . .	56
5.8.2 NPS . . . . .	59

	side
5.9	Torskeeggets egenvekt . . . . . 59
5.10	Embryo's vannpermeabilitet . . . . . 63
KAPITTEL 6:	DISKUSJON . . . . . 64
6.1	Endringer i plommeosmolalitet . . . . . 64
6.2	Torskeeggets vannbalanse . . . . . 66
6.2.1	<i>Dannelse av perivitellint rom</i> . . . . . 66
6.2.2	<i>Permeabilitet</i> . . . . . 67
6.3	Sammensetning av oppløste stoffer . . . . . 69
6.4	Osmotisk regnskap . . . . . 73
6.5	Endringer i egenvekt . . . . . 75
6.6	Oljebelastning . . . . . 76
KAPITTEL 7:	KONKLUSJON . . . . . 77
	REFERANSER . . . . . 78

### SAMMENDRAG

Torskeembryo's vann og ionebalanse er undersøkt. Grupper av eggene ble belastet med 100-150 ppb av den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje med det formål å påvise evnt. effekter av oljen på embryo's evne til å opprettholde et fornuftig indre miljø. Ubelastete egg ble brukt som referanse.

Ved hjelp av microteknikker ble osmolaliteten i embryo's plommemasse bestemt med jevne mellomrom gjennom embryogenesen. Resultatene viser at torskeembryo opprettholder en osmotisk uavhengighet til sjøvannet i hele utviklingsperioden.

Vanninnholdet i embryo ble bestemt utfra volummålinger av perivitellint rom samt våtvekt- og tørrvektmålinger. For å måle volumet av det perivitelline rommet ble det benyttet to forskjellige metoder som begge er basert på chorion's høye permeabilitet for ioner og små molekyler. Beregningene av vanninnhold viser at embryo mister vann til omgivelsene gjennom hele embryogenesen. Endringene i vanninnhold ble benyttet til å beregne filtrasjonspermeabiliteten over epithelene i embryo.

Kvantitative analyser av  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Cl}^-$  i embryo ble gjort ved ekstraksjon av egg i 1N  $\text{HNO}_3$ . Analyser av ekstraktet ga sammen med beregningene over vanninnhold, opplysninger om ionenes konsentrasjonsforhold i embryo. Konsentrasjonene av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  er langt lavere i embryo enn i sjøvann. Konsentrasjonen av  $\text{K}^+$  er litt høyere enn i sjøvann, og varierer noe gjennom embryogenesen.

Kvantitative bestemmelser av ninhydrin-positive substanser

på homogeniserte egg viser at en stor del av de osmotisk aktive partiklene i torskeembryo er frie aminosyrer. Konsentrasjonen av ninhydrin-positive substanser faller med ca. 50% i løpet av embryogenesen. Hvordan disse stoffene demobiliseres er foreløpig usikkert.

Eggenes egenvekt og nøytral flotasjon ble målt i en tetthetsgradient basert på saltvann av ulik saltholdighet. Disse målingene viser at eggenes egenvekt øker sterkt de siste dagene før klekking. Mekanismen bak dette er ukjent, og den økologiske betydningen er uklar.

Innenfor forsøkenes begrensninger ble det ikke registrert effekter av oljebelastning på de målte parametrene.

## 1. INNLEDNING

Marine teleoster lever i et sterkt hyperosmotisk miljø, og vil derfor til enhver tid være utsatt for et osmotisk stress i form av væsketap og tilførsel av salter. For å opprettholde den osmotiske gradienten mellom det indre og det ytre miljøet, har fiskene utviklet renale og ekstrarenale strukturer som fungerer osmoregulerende. Fisk har ikke evnen til å utskille hypertont urin, d.v.s. mer konsentrert enn plasma, og lever derfor under delvis "tørre" betingelser på samme måte som et landlevende dyr. Dette gir seg bl. a. utslag i at nitrogenekskresjonen for en stor del består av urea, som på grunn av sin høye vannløselighet og lave toxicitet kan ekskreseres i et lite vannvolum. En voksen fisk erstatter sitt obligate vanntap ved å drikke sjøvann. I tarmen absorberes vannet osmotisk ved at saltene i tarminnholdet aktivt transporteres over i plasma. Den ekstra saltbelastningen som på denne måten oppstår, fjernes v.h.a. ekstrarenale ekskresjonsorganer. Utskillelsen av monovalente ioner som  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Cl}^-$  foregår i fiskens gjelleepithel.  $\text{Cl}^-$  sekreterende celler er påvist i gjelleepithelet til de fleste saltvannsfisk etter at disse strukturene første gang ble påvist hos ål (Keys & Willmer, 1932). Driking av sjøvann medfører også et betydelig inntak av divalente ioner, bl. a.  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{SO}_4^{2-}$ . Utskillelsen av disse ionene skjer i nyren og med fecaliene.

Osmoregulering er i hovedsak hormonstyrt, og krever i tillegg til en funksjonell tarm, en velutviklet sirkulasjon og et avansert gjellesystem.

Under reproduksjon hos de fleste marine fisker gytes egg og sperm ut i de frie vannmassene hvor befruktning skjer. Før



gyting er både egg og sperm tilnærmet isosmotisk med gonadevæskene til de voksne fiskene (Davenport et al., 1981), og vil derfor bli utsatt for en dramatisk endring av det ytre miljøet ved gyting. Dette medfører at embryo vil stå overfor de samme osmotiske problemene som voksne fisk uten å være i besittelse av deres osmoreguleringsorganer. Dette osmotiske problemet kan løses etter følgende prinsipper:

1. Eliminasjon av den osmotiske gradienten mellom det indre og ytre miljøet ved å tolerere høy indre osmolalitet. Dette er kjent å være tilfellet for en rekke marine organismer bl. a. evertebrater, elasmobrancher og cyclostomater. Selv om det osmotiske vannproblemet på denne måten er løst, skjer det likevel en aktiv regulering av ionesammensetninger i de fleste tilfellene.

2. Opprettholdelse av en osmotisk gradient til det ytre miljøet ved aktiv osmoregulering. Denne løsningen av problemet finnes bl. a. hos marine fisk, og medfører osmotiske fluxer av vann og ioner som må kompenseres for v.h.a. aktive prosesser.

3. Impermeabilitet. Fullstendig impermeabilitet er sannsynligvis ikke forenelig med liv hos en organisme som er avhengig av en konstant utveksling av respirasjonsgasser og ekskresjonsprodukter med det ytre mediet. Marine pattedyr kan til en viss grad sies å benytte seg av impermeabilitet for å unngå osmotisk vanntap. Dette henger sammen med deres uavhengighet av sjøvannet som respirasjonsmedium. Dessuten har marine pattedyr evnen til å kvitte seg med et saltoverskudd i form av en tildels meget hyperosmotisk urin.

Flere arbeid har vist at pelagiske fiskeegg opprettholder en høy osmotisk gradient til det ytre miljøet gjennom hele embryogenesen (Holliday, 1965; Guggino, 1980). En morfologisk undersøkelse på marine fiskeegg viser at munn og tarm ikke er funksjonelle før klekking (Fridgeirson, 1978). Dette medfører at embryo ikke er istand til å ta opp vann exogent gjennom tarmen slik som den voksne fisken. Embryo har heller ikke gjellefilamenter (Guggino, 1980), som er det viktigste ioneregulerende organ hos voksne fisk. Det pelagiske egget har et stort overflate/volumforhold sammenliknet med andre hypoosmotiske marine organismer. Et høyt overflate/volumforhold vil ytterligere øke det osmotiske stresset som egget utsettes for ved å opprettholde et hypoosmotisk indre miljø. Hittil har det ikke vært påvist organer eller strukturer i torskeembryo som fungerer osmoregulerende eller ioneregulerende.

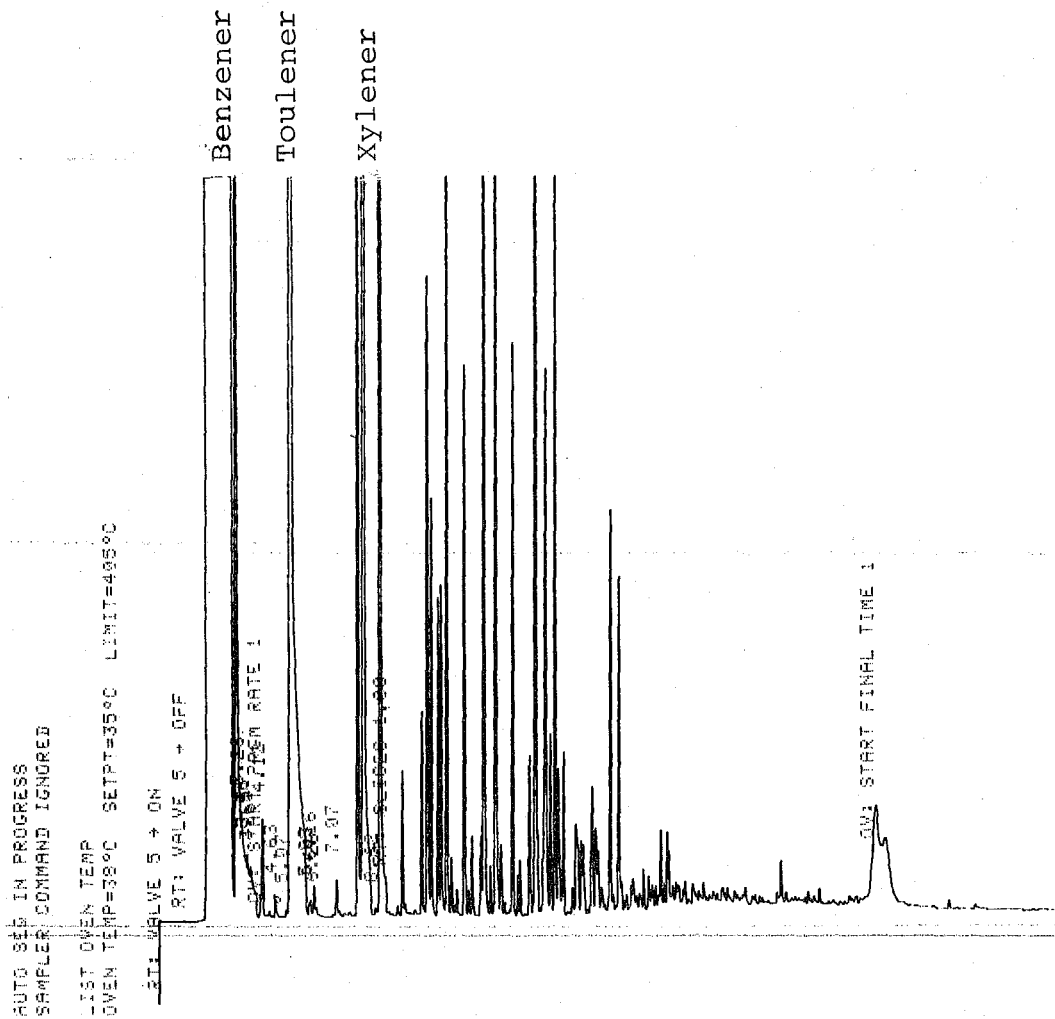
I stadig større grad er forurensing blitt en trussel for livet i havet. Spesielt gjelder dette den reproduktive fasen, som på grunn av sin lave mobilitet antas å være ømfintlig overfor miljøgifter. I de siste årene har det pågått en stadig større oljeutvinningsaktivitet på den norske kontinentalsokkelen. Disse områdene er samtidig gytefelt for flere av våre kommersielt utnyttete fiskearter, bl. a. torsk (Gadus morhua L.). Forurensing i form av oljehydrokarboner vil derfor til visse tider av året, kunne representere en trussel mot optimal reproduksjon på gytefeltene.

Råolje består av en rekke forskjellige oljehydrokarboner. Kromatografiske undersøkelser har vist at ca. 70% av innholdet er lavmolekylære aromatiske forbindelser som benzener, toulener

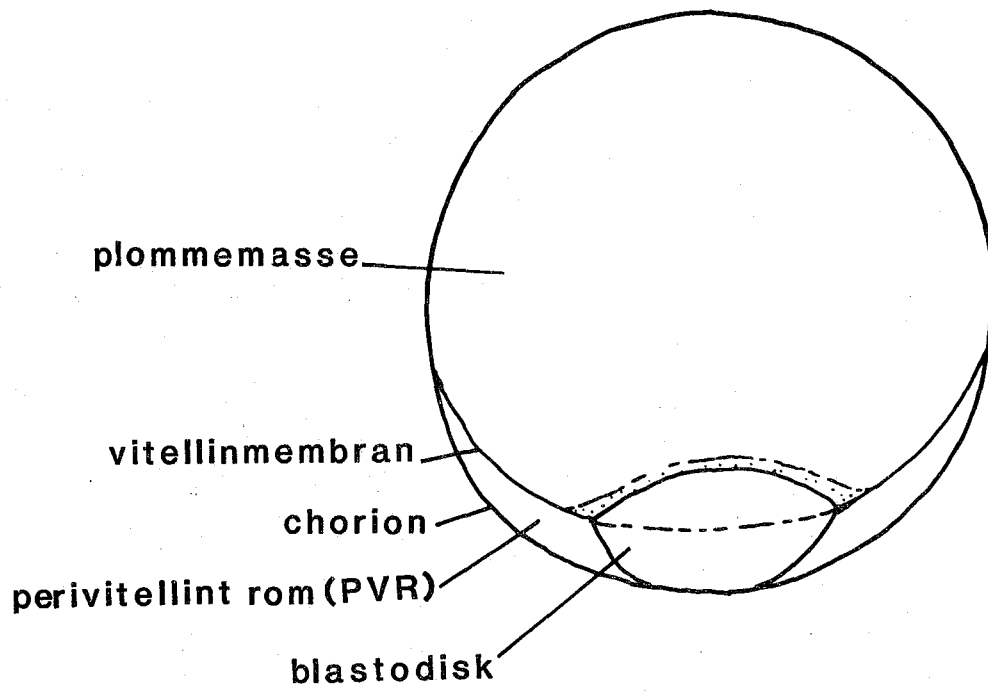
og xylener. Det er vist at disse forbindelsene på grunn av sin lipofile karakter er istand til å løse seg i biologiske membraner og påvirke de fysiske/kjemiske prosessene som foregår i disse (Goldrace, 1968). Undersøkelser med radioaktivt merkete oljekomponenter, viser at visse oljeforbindelser oppkonsentreres i torskkegg på grunn av sin lave vannløselighet (Solbakken pers. med.). Ved biotester kan effekten av ulike konsentrasjoner og fraksjoner av olje på marine dyr undersøkes. I de foreliggende undersøkelsene på torskkegg ble det lagt vekt på å eksponere materialet for en konsentrasjon, og fraksjon av råolje som kunne forventes å opptre på et gytefelt ved en evt. ukontrollert oljeutblåsning. Under og umiddelbart etter utblåsningen fra Bravo-plattformen i april 1977, ble det registrert totale oljekonsentrasjoner på fra 100 - 250 ppb i en omkrets av 11 nautiske mil (ca. 20 km) omkring utblåsningsstedet. 4 uker etter utblåsningen var den totale konsentrasjonen av oppløste oljehydrokarboner under den målbare grensen (Grahl-Nielsen, 1978). Toksisiteten av råolje er avhengig av konsentrasjonen av aromatiske forbindelser (Andersen, 1979), og ved akutteksponeringer er det den vannløselige fraksjonen av disse som er mest giftig for marine dyr (Rice et al., 1977). Ekofisk råolje er karakterisert ved et høyt innhold av aromatiske forbindelser (Grahl-Nielsen, 1978). Hvilke konsekvenser en ukontrollert utblåsning fra et oljefelt i nærheten av gyteområder vil ha på nyrekrutteringen til fiskestammene er ikke kjent. Det er gjort få undersøkelser som belyser marine organismers evne til anisosmotisk regulering under oljebelastning.

Med bakgrunn i denne innledningen ble følgende problemstilling utformet:

1. Hvilke osmotiske endringer skjer i torskembryo under embryogenesen?
2. Hvilke effekter har det hyperosmotiske sjøvannet på embryo's vannbalanse?
3. hvilke endringer i sammensetningen av det indre miljø skjer i utviklingstiden?
4. Hvilke mekanismer sørger for at egget holdes flotert i vannmassene?
5. Har sublethale konsentrasjoner av råolje noen påviselige effekter på 1., 2., 3. og 4.?



Figur 1. Gasskromatogram av den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje. Analysen er utført ved Fiskeridirektoratets havforskningsinstitutt. De lette komponentene benzen, toulen og xylen utgjør ca. 70% av de oppløste hydrokarbonene.



Figur 2. Skisse av et pelagisk egg ca. 1 døgn etter befruktning.

## 2. TORSKEEGGET- MORFOLOGI OG UTVIKLING

Dette kapitelet er ikke en del av den eksperimentelle oppgaven, men er nødvendig for å gi en bakgrunn for behandlingen av stoffet, og for å klarlegge benyttete termer og uttrykk. Terminologien er hentet fra Fridgeirson (1978).

### Morfologi

Utgangspunktet for den morfologiske gjennomgåelsen av torskeegget er valgt i et egg ca. 1 døgn etter befruktning. Ytterst er egget omsluttet av en rigid hinne som kalles chorion. Fritt flytende innenfor chorion ligger den befruktete eggcellen, som på de tidligste stadiene i utviklingen består av cytoplasma og plommemasse omsluttet av en enkel cellemembran, vitellinmembranen. Mellom chorion og vitellinmembranen er det et væskefylt rom, perivitellinrommet (PVR).

### Chorion

Elektronmikroskopiske studier av chorion har vist at denne er porøst oppbygget av flere lag (Lønning, 1972). Den innerste delen av chorion er lamellær, og relativt ensartet fra art til art. Den ytterste delen består av flere distinkte soner som kan variere i antall hos ulike arter av fiskeegg (Hagstrøm og Lønning, 1968). Chorion viser høy permeabilitet til lavmolekylære substanser som f. eks. sakkarider (Riis-Vestergaard, 1981) og sjøvannsalter (fig. 6). I den animale polen av egget er det før befruktning en kraterliknende fordypning i chorion. Denne snevres inn til en trang pore (micropyle) som penetrerer chorion (Sakai, 1961). Det er gjennom denne åpningen at spermien kommer i kontakt med og befrukter eggcellen. Etter at egget er blitt befruktet blokkeres micropyle

og polyspermi hindres.

Allerede i 1890 beskrev Mcintosh og Prince den porøse strukturen i chorion. Krogh et al. (1938) viste at væsken i perivitellinrommet i egg av kantål (Syngnathus acus) hadde samme klorid-konsentrasjon som sjøvann. Permeabilitetsforsøk med fargestoffer av ulik molekylstørrelse har vist at torskkeeggets chorion er permeabel for molekyler med molekylvekt på opptil ca. 300 Dalton (Davenport et al. 1981). Trisakkaridet raffinose (mw = 540 Dalton) diffunderer inn i perivitellinrommet til rødspetteegg når disse inkuberes i en 15 mM raffinose-løsning. (Riis-Vestergaard, 1981). Egne målinger viser at  $\text{Cl}^-$  i perivitellinrommet i torskkeegg lar seg vaske ut med aq. dest. i løpet av 1-2 minutter (fig. 6). På grunn av chorions høye permeabilitet for vann og ioner vil vitellinmembranen være den vesentligste diffusjonsbarriæren mellom embryo og det ytre mediet i perioden før epiboli (Se § 5.1).

#### Det perivitelline rommet

Mellom vitellinmembranen og chorion dannes perivitellinrommet. (PVR). Rommet er væskefylt, og væsken, perivitellinfluid (PVF), vil til enhver tid være i diffusjonslikevekt med det ytre mediet. PVR fungerer som rom for det utviklende embryo i de senere faser av embryonalutviklingen. Det er gjort flere undersøkelser som tyder på at et kolloid osmotisk overtrykk i PVR sørger for å holde chorion utspent og sfærisk. Dette vil bli nærmere gjennomgått senere i kapittelet.

#### Vitellinmembranen

Det har ikke vært mulig å finne litteratur som omhandler vitellinmembranens struktur. Ca. 7 dager etter befruktning



erstattes (suppleres ?) vitellinmembranen av et heldekkende epithellag. Før denne omvoksningsen (Epiboli) synes vitellinmembranen å bestå av en cellemembran. Denne er ømfintlig for mekanisk påvirkning, og ødelegges lett ved uforsiktig behandling.

### Eggcellen

Før befruktning ligger cytoplasmaet som en tynn hinne like innenfor vitellinmembranen. Dette cytoplasmalaget inneholder cellens organeller. Innenfor cytoplasmaet, omgitt av en intracellulær membran ligger plommematerialet (Kerr, 1919). Plommen kan på dette tidspunktet betraktes som en vakuole i egget. Karakteristisk for alle pelagiske fiskeegg er at plommeproteinene foreligger i oppløst form noe, som bidrar til å gjøre eggene transparente og sannsynligvis vanskelige å se for eventuelle predatorer. Det totale vanninnholdet i egget er ca. 93-94 vekt%. (Fridgeirson, 1978; og fig.16 )

### UTVIKLING

Umiddelbart etter gyting skjer det forandringer i egget som med en fellesbetegnelse kalles aktivering. Det er uenighet om hva som er den direkte årsaken til aktiveringen. Blaxter (1969) hevder at det er selve befruktningen (m.a.o. spermien) som er den utløsende faktor. Andre, bl. a. Yamamoto (1961) mener at det er endringene i det ytre miljøet som framkaller aktivering. Forsøk med bl. a. kveiteegg (Riis-Vestergaard, 1982), Lakseegg (Potts & Rudy, 1968) og gjeddeegg (Loeffler, 1971) viser at ubefruktete egg aktiveres når de kommer i kontakt med saltvann. Det er også rapportert gradforskjell i aktiver-

ing mellom befruktete og ubefruktete egg fra torsk (Davenport et al. 1981).

Aktivering er en felles betegnelse for følgende fysisk/kjemiske endringer i egget:

- a) Cortikalprosessen
- b) Endringer i vitellinmembranens vannpermeabilitet.
- c) Herding av chorion.

#### a) Cortikalprosessen

I eggcellens cytoplasma finnes en populasjon av blærelignende organeller som kalles cortikale vesikler (Hagstrøm og Lønning, 1968). Under aktivering smelter disse sammen med vitellinmembranen og tømmer innholdet sitt ut i PVR. Det frisatte innholdet fra vesiklene inneholder colloider som chorion er impermeabel for. Colloidenes størrelse er beregnet til ca. 300 000 Dalton (Eddy, 1974). De ikke-permeerende molekylerne vil sette opp et colloidotisk overtrykk i PVR. Dette vil resultere i et hydrostatisk overtrykk inne i egget som er målt med ulike metodikk for flere arter:

- i) Lakseegg (Salmo salar): 30 mOsm som tilsvarer et vanntrykk på 6,7 m H<sub>2</sub>O (Rudy & Potts, 1969).
- ii) Tannkarpe (Fundulus sp.): 90 mOsm som tilsvarer et vanntrykk på 20 m H<sub>2</sub>O (Kao & Chambers, 1954).
- iii) Torsk (Gadus Morhua L.): 10 mOsm som tilsvarer et vanntrykk på 2,2 m H<sub>2</sub>O. (Leivestad pers. med.)

b) Endringer i vitellinmembranens vannpermeabilitet

Permeabilitetsmålinger med tritium merket vann (THO) utført på egg fra rødspette (Pleuronectes platessa) viser at vannpermeabiliteten over vitellinmembranen til uaktiverede egg er relativt høy, og at den avtar raskt etter at eggene er overført til saltvann. (Potts & Eddy, 1973). Osmotisk efflux av vann fra eggcellen er sammen med utstrekking av chorion (p.g.a det hydrostatiske overtrykket i egget), ansvarlig for den første dannelsen av PVR. (Potts & Eddy, 1973; Fridgeirson, 1978). Vannpermeabiliteten over vitellinmembranen til aktiverte egg fra rødspette var ca. 20% av verdien før aktivering. (Potts & Eddy, 1973).

c) Herding av chorion

I løpet av det første døgnet egget er i sjøvann skjer det en fysisk endring i chorion. Den blir hard og utspent, og motstandsdyktig overfor ytre påvirkninger. Flere forsøk tyder på at herdingen skjer under påvirkning av et "herdeenzym", som under aktivering blir frisatt i PVR. Det er bare den innerste lamellære delen av chorion som undergår herding. Denne delen av chorion lot seg også fjerne ved tilsetning av proteolytiske enzymer (trypsin og pancreatin) i mediet (Sakai, 1961). Sakai konkluderte at chorion består helt eller delvis av proteiner. Dersom chorion fra uaktiverede rødspetteegg dissekeres fra resten av egget, vil ikke chorion herdes ved overføring til sjøvann (Riis-Vestergaard pers. med.) Uaktiverede egg fra laks (Salmo salar) herder ved tilsetning av PVF fra nyherdede egg. Denne effekten på uaktiverede egg ble svakere dersom PVF fra eldre egg ble benyttet (Zotin, 1958). Fra disse undersøkelsene konkluderte Zotin at corion herdes under

påvirkning av et "herdeenzym", og at dette enzymet er ustabilt. Det viste seg også at herding av lakseeegg er avhengig av en viss konsentrasjon av  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{O}_2$  i mediet. Fysisk stimulering er også rapportert å indusere herding av chorion (Blaxter, 1969).

### Embryogenese

Aktivering av egget med de tilhørende prosesser skjer i løpet av de første timene etter befruktning i sjøvann. Aktivering påfølges av en rask oppkonsentrering av cytoplasma ved den animale polen av egget, og fører til dannelsen av blastodisken som senere gir opphav til embryo. En videre beskrivelse av embryogenesen er gitt i tabell 4 i resultatkapittelet, og er basert på daglige observasjoner.

### 3. MATERIALET

#### 3.1 FORSØKSDYR

Det ble benyttet egg fra kysttorsk (Gadus morhua L.) i forsøkene. Stamfiskene ble hentet på Bontlabo fiskemottak i Bergen, og fraktet levende til Fiskeridirektoratets Havforskningsinstitutt hvor egg og sperm ble strøket av fisken. Eggene ble befruktet ved å røre dem sammen med spermen. Egg fra én hunnfisk ble befruktet av sperm fra én hannfisk for å få så homogene serier som mulig. Det ble i 1981 sesongen gjort 2 forsøksserier (Serie 1: startet 5/3, avsluttet 23/3; Serie 2: startet 7/4, avsluttet 24/4). I 1982 sesongen ble det gjort enkelte forøk på naturlig gydt- og befruktete egg samlet fra Havforskningsinstituttets utekar med torsk (Serie 3: startet 8/2, avsluttet 27/2). Disse eggene ble sortert etter utviklingsstadium og størrelse for å få ensartete egg fra én hunnfisk. I alle seriene ble abnorme eller synlig skadete egg sortert bort under lupe (16X forstørrelse).

#### 3.2 DYREHOLD

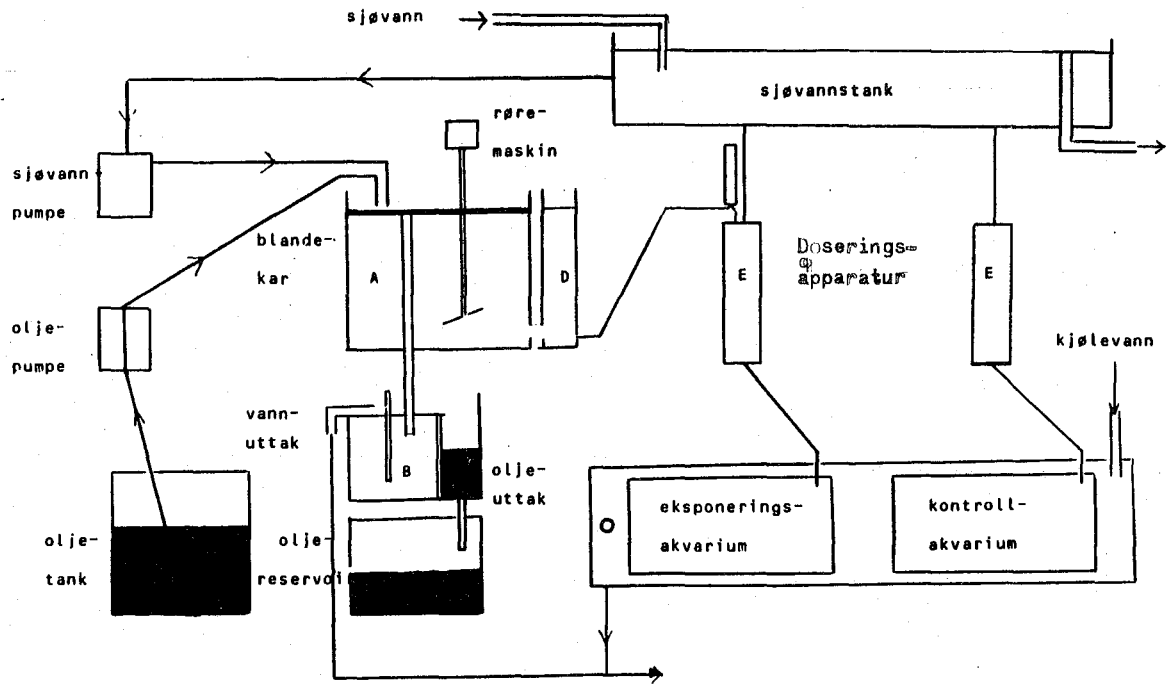
Serie 1 og 2: Ca. 2 timer etter befruktning ble eggene inkubert i 10 liter UV-sterilisert sjøvann (34 ‰) tilsatt 500 000 IE penicillin, 1,5 ml streptomycin og 250 000 IE mycostatin. Inkuberingskarene ble forsiktig gjennomboblet med filtrert luft for å sikre oksygenmetning, og for å skape litt konveksjon i vannet.

Serie 3: Eggene fra utekarene ble transportert direkt til klimarommet på realfagbygget. Eggene ble inkubert i 34‰ sjøvann uten tilsetninger av noen art. Disse eggene ble heller ikke oljebelastet.

### 3.3 OLJEBELASTNING

Etter 7 dagers inkubering ble eggene overført til et biotest-anlegg for oljebelastning. En skisse av anlegget er gitt i figur 3. Nærmere beskrivelse er gitt av Tilseth et al. (1981). Oljebelastningen ble gitt i form av 150 ppb av den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje. Hver eggserie ble fordelt på 2 trakter i biotestanlegget: Den ene ble oljebelastet, og den andre fungerte som kontrollgruppe. Bortsett fra olje var det ingen tilsetninger i biotestvannet.

Egg ble hver dag hentet fra anleggene på havforskningsinstituttet og fraktet i termosflasker til klimarommet på realfagbygget. Temperaturen på klimarommet var termostatert til  $(5,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . Apparaturen som ble benyttet til fruktosebehandling, egenvektsbestemmelser og vasking av egg, var plassert på klimarommet for at behandlingen av egg skulle foregå ved riktig temperatur.



Figur 3. Prinsippskisse av biotestanlegget for oljebelastning.

## 4. METODER

### 4.1 ALDERSBESTEMMELSER

Eggene ble hver dag i embryogenesen betraktet under lupe (Wild Heerbrugg) ved 16X forstørrelse. De lettest observerbare fysiologiske og morfologiske forandringene fra dag til dag ble nedtegnet.

### 4.2 ANALYTTISKE METODER

#### 4.2.1 Osmolalitetmålinger

Til målingene av osmolalitet i plommemasse ble det benyttet et Clifton Direct Reading Nanolitre Osmometer, som tillot måling på plommemasse av enkeltegg. Apparatet bygger på indirekte bestemmelse av osmolalitet ved måling av frysepunkt-nedsettelse (frysepkt  $\stackrel{\text{def}}{=} \text{smeltepkt}$ ), og arbeider etter følgende prinsipp: Instrumentet er en elektronisk kontrollert kjøler som styrer temperaturen i flere prøver av meget små volumer innenfor grenser på  $0,001^{\circ}\text{C}$ . Kjøleelementet som er lite nok til å bli plassert under en lupe, er laget av halvledende termoelektriske koplinger som ifølge den inverse termokoplingseffekten (Peltier effekten) danner en temperaturgradient proporsjonal med den elektriske strømmen som til enhver tid passerer gjennom den (Prager & Bowman, 1963). Apparatet har et temperaturområde som tilsvarer osmolaliteter fra 0 til 5000 mOsm.

Målingene ble utført etter følgende arbeidsprosedyre: Inne sluttet i flytende parafin ble prøver og standarder hurtig frosset ned til ca.  $-40^{\circ}\text{C}$ . Den lave temperaturen var nødvendig for å sikre at alle prøvene krystalliserte. Fra den dyp-frosne tilstanden ble temperaturen i kjøleelementet auto-



matisk hevet til en temperatur som var antatt å ligge under smeltepunktet til prøvene. Når denne temperaturen var nådd, ble det gitt et signal i en kontroll-lampe. På dette tidspunktet i prosedyren ble iskrystallenes tilstand undersøkt. Dersom det fortsatt var iskrystaller i prøvene, ble temperaturen langsomt hevet (ca. 0,005 gr./min.), samtidig som iskrystallene i prøvene ble holdt under kontinuerlig observasjon. Smeltepunktet ble definert ved den temperaturen den siste krystallen smeltet. I hver måling ble det benyttet NaCl-standarder som dekket måleområdet. Prøver av plommemasse ble tatt med håndtrukket micropipetter. Pipettene ble laget av glasskapillærrør som ble trukket ut over en hydrogenflamme slik at spissen ble ca. 0,05 mm i diameter. Spissene ble silikonisert i 2% dimethyldiclorosilane i 1,1,1-tricloroethane, for å minske adhesjonskreftene mellom prøvematerialet og pipetteveggen. Pipettene ble fylt med flytende parafin, og koplet til sugeslanger. Selve prøvetakningen ble utført under lupe for å ha kontroll over pipettespissen mens denne penetrerte chorion, og prøver av plommemasse ble tatt. Det ble hver måledag målt osmolalitet i plommemassen til 8 egg. Prøvetakning fra ett egg gav nok materiale til 3 målinger. Prøver fra 2 egg + 2 osmostandarder ble satt i osmometeret samtidig.

For å undersøke om temperaturen under målingene var jevn i hele prøveplaten, ble en serie med kun én kjent standard målt. Resultatene fra denne målingen er vist i figur 4. Det ble på grunnlag av denne testen avgjort at det ikke var temperaturgradienter i prøveplaten som ville gi gjentatte feil i målingene. Etter at osmometeret var kalibrert med 300-, 500- og 900 mOsm standarder, ble ikke forskyvninger av standard-

kurven registrert. For å kunne korrigere for evnt. variasjoner i den termiske kontakten mellom prøveplaten og termoplatten fra analyse til analyse, ble det for hver måling kjørt standarder sammen med prøver av plommemasse. I praksis viste det seg at dette ikke hadde vært nødvendig, fordi variasjonene viste seg å være ubetydelige. Oppskriften på NaCl Osmostandardene stammer fra Internat. Critical Tables, vol. 4.

289	295	292
285	295	292
290	293	290
293	290	290

*Figur 4. Skisse av osmoprøveplate. Verdiene representerer målt osmolalitet (mOsm) i en 300 mOsm NaCl- standard.*

*Gjennomsnittsmolaliteten i prøvene er:  $(291 \pm 2,8)$  mOsm.*

#### 4.4.2 Kvantitative Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> analyser

##### Utvasking av saltene i PVR

På grunn av chorions høye permeabilitet for vann og ioner, var det mulig å vaske saltene i PVR ut med aq. dest. Apparatet som ble benyttet til utvaskingen er vist i figur 5 (Riis-Vestergaard pers. med.). Hver måledag ble det vasket 2 X 20 egg i gjennomstrømmende vann i 3 minutter. Eggene ble etter vasking overført direkte fra skyllekammeret til et 1,5 ml

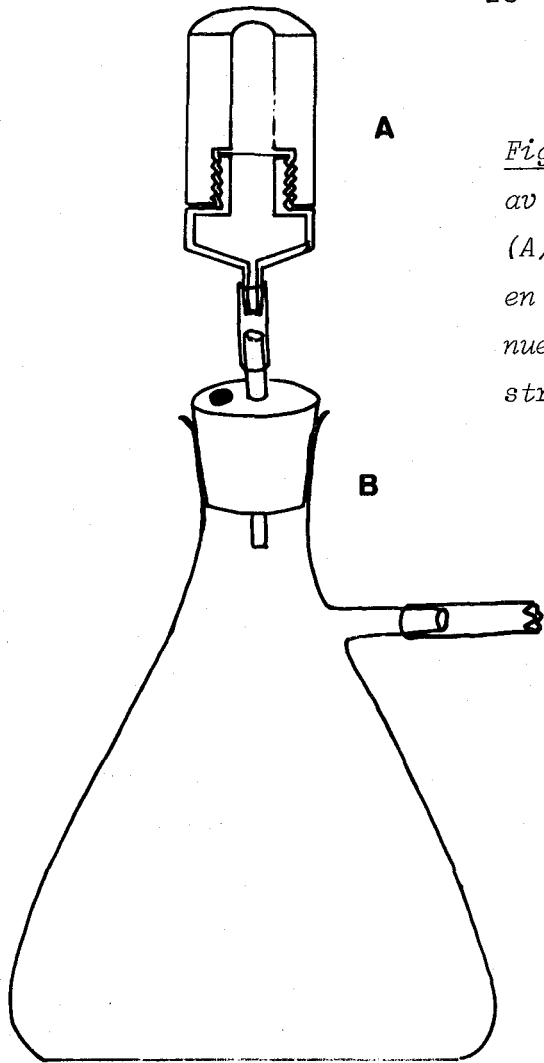
polypropylen sentrifugerør v.h.a. en akvarellpensel. Utvaskingstiden ble bestemt på følgende måte: Grupper á 20 egg ble vasket i 10 sek., 30 sek., 1 min., 2 min., 3 min. og 10 min. Disse eggene ble ekstrahert som beskrevet i neste avsnitt.  $\text{Cl}^-$  konsentrasjonene i ekstraktene ble bestemt ved klorid-titrering. På grunnlag av titeringsresultatene (Fig.6) ble standard vasketid bestemt til 3 minutter.

#### Ekstraksjon av ioner

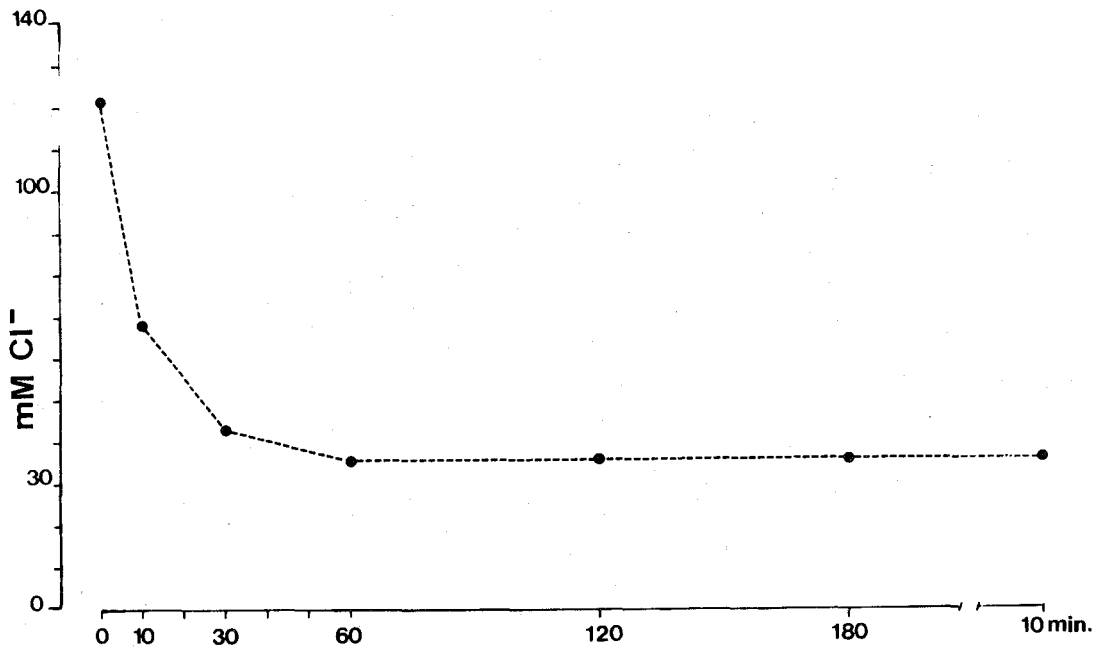
I sentrifugerørene med vaskete egg ble det tilsatt 500  $\mu\text{l}$  1N  $\text{HNO}_3$  med en Carlsbergpipette. Ioner ble ekstrahert fra eggene i 2 døgn ved romtemperatur. Til kvantitative bestemmelser av  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$  ble det benyttet et Pye Unicam SP 192 Atomic Absorbtion Spectrophotometer. Standarder til disse målingene ble laget av tørt  $\text{NaCl}$  og  $\text{KCl}$  i aq. dest. tilsatt  $\text{HNO}_3$ . ( $\text{Na}^+$ -standardene inneholdt også en viss mengde  $\text{K}^+$  og omvendt, for å ta hensyn til interferensen mellom disse ionene under analyser med atomabsorbsjonspektrofotometer). Både  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$  ble målt ved emmisjon.

$\text{Cl}^-$  konsentrasjonene i ekstraktene ble bestemt potensiometrisk ved amperometrisk titrering med en titratot av typen Radiometer modell CMT 10, ved standard prosedyre. Det ble benyttet 30  $\mu\text{l}$  prøve, 3 paralleller, med pipettevoluminnstilling på 1  $\mu\text{l}$ . (Målenøyaktighet =  $\pm$  1%.)

Det ble gjort tester for å bestemme ekstraksjonstider og ekstraksjonseffektivitet av flere ekstraksjonsmidler. Hensikten med testene var å undersøke ulike ekstraksjonsmidlers effektivitet i forhold til hverandre, og hvilke tidsrammer denne typen ekstraksjon krever. Alle eggene som ble benyttet



Figur 5. Skisse av apparatur til vasking av egg. Eggene overføres til vaskekammer (A) som er laget av et plexiglassrør og en filterholder. Aq. dest. tilsettes kontinuerlig. Sugokolben (B) sørger for gjennomstrømming.



Figur 6. Utvaskingskurve for  $\text{Cl}^-$  i PVR i 5 dager gamle egg. Figuren viser  $\text{Cl}^-$  konsentrasjon i syreekstrakt (0,5 ml 1N  $\text{HNO}_3$ ) av 20 egg som funksjon av skylletid.

i dette forsøket var på forhånd vasket i aq. dest. i 3 min. Ekstraksjonsmidlene som ble benyttet var: 5% sulfosalisylsyre, 5% perkloreddiksyre (PCA), 5% trikloreddiksyre (TCA) og 1N salpetersyre. Alle ekstraksjonene ble utført på isbad. Første prøve ble tatt ut etter ca. ½ times ekstraksjon. Med økende tidsintervaller ble prøver tatt ut de neste 3 døgn. Resultatene fra ekstraksjonsseriene er gitt i tabell 1. På bakgrunn av denne testen ble 1N HNO<sub>3</sub> valgt som ekstraksjonsmiddel. Ekstraksjonstiden ble bestemt til 1 time eller mer (Ekstraksjonstiden i serie 1 og 2 ble av rutinemessige årsaker valgt til ca. 2 døgn.)

#### 4.2.3 Bestemmelser av NPS i torskeegget

Ninhydrin- Positive Substanser (NPS: Lange, 1963) er en felles betegnelse på stoffer som reagerer med ninhydrin og gir et blåfarget reaksjonsprodukt. Felles for NPS er at de inneholder én eller flere frie aminogrupper i  $\alpha$ - posisjon til karboksylgruppen (Lehninger, 1975). De fleste frie aminosyrer er ninhydrin positive, og NPS er derfor vanlig benyttet til kvantitative aminosyrebestemmelser. Det er imidlertid viktig i enkelte sammenhenger å være klar over at andre stoffer enn aminosyrer reagerer med ninhydrin. Dette gjelder bl. a. proteiner, peptider og ammoniakk (selv om sistnevnte ikke inneholder noen karboksylgruppe). Proteiner og peptider fjernes før analyse ved denaturering og pressipitering. NH<sub>3</sub> kan drives av som gass, men dette blir ikke gjort i praksis. NPS- verdiene vil derfor være et mål for både frie aminosyrer og ammoniakk.

Kvantitative bestemmelser av NPS ble utført etter følgende

Ekstraksjonstid	Ekstraksjonsmiddel	Utvikl. stad.	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
½ time	1N HNO <sub>3</sub>	0 dager	0,45	2,31	4,18
1 --	--	--	0,44	2,30	4,23
3 --	--	--	0,45	2,32	4,15
25 --	--	--	0,45	2,30	4,10
78 --	--	--	0,46	2,30	4,12
½ --	--	15 dager	1,35	1,43	3,63
1 --	--	--	1,34	1,43	3,63
3 --	--	--	1,33	1,44	3,56
25 --	--	--	1,30	1,43	3,50
78 --	--	--	1,33	1,43	3,55

Tabell 1a . Ekstraksjon av ioner fra 30 egg i 1 ml ekstraksjonsmiddel. 0- og 15 gruppen er fra forskjellige fisk.

Kkstraksjonstid	Ekstraksjonsmiddel	Utvikl. stad.	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
½ time	5% PCA	0 dager	0,45	2,33	4,13
1 --	--	--	0,40	2,34	4,13
3 --	--	--	0,43	2,35	4,11
25 --	--	--	0,42	2,34	4,08
78 --	--	--	0,41	2,32	4,13
½ --	--	15 dager	1,32	1,47	3,63
1 --	--	--	1,33	1,48	3,58
3 --	--	--	1,33	1,48	3,56
25 --	--	--	1,33	1,48	3,58
78 --	--	--	1,27	1,48	3,53

Tabell 1b . Se s. 25 for tabelltekst.

Ekstraksjonstid	Ekstraksjonsmiddel	Utvikl. stad.	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
½ time	5% sulfosal.syre	0 dager	0,44	2,34	4,10
1 --	--	--	0,44	2,33	4,18
3 --	--	--	0,44	2,31	4,10
25 --	--	--	0,39	2,31	4,05
78 --	--	--	0,40	2,31	4,13
½ --	--	15 dager	1,32	1,43	3,40
1 --	--	--	-	1,42	-
3 --	--	--	1,30	1,42	3,46
25 --	--	--	1,29	1,42	3,46
78 --	--	--	1,32	1,42	3,48

Tabell 1c. Se s. 25 for tabelltekst.



Ekstraksjonstid	Ekstraksjonsmiddel	Utvikl. stad.	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
½ time	5% TCA	0 dager	0,56	2,30	4,28
1 --	--	--	0,57	2,30	4,25
3 --	--	--	0,59	2,30	4,30
25 --	--	--	0,55	2,30	4,23
78 --	--	--	0,56	2,30	4,28
½ --	--	15 dager	1,34	1,49	3,68
1 --	--	--	1,33	1,48	-
3 --	--	--	1,33	1,48	3,63
35 --	--	--	1,33	1,47	3,66
78 --	--	--	1,36	1,48	3,66

Tabell 1d . Se s. 25 for tabelltekst.

arbeidsprosedyre: 20 egg ble homogenisert i 1 ml sulfosalisylysyre (5%). Homogenatet ble sentrifugert i 3 minutter ved 2000 X g i en Beckman Microfuge B. Av supernatanten ble det tatt ut 2 X 20 µl til NPS- analyse.

Til analysene ble det benyttet norleucin standarder. NPS er derfor i realiteten mol nle- ekvivalenter. For enkelthets skyld blir imidlertid NPS- konsentrasjoner oppgitt som molare størrelser. Etter at prøvene med standarder og blanker var tilsatt kjemikalier, varmet på vannbad og fortynnet (Moore & Stein, 1948), ble fargeutviklingen målt på et SP 8-100 UV/VIS Recording Spectrophotometer ved 570 nm. Utfra nle- standardkurven ble NPS- innholdet i homogenatet beregnet. Metodens feilgrense ble bestemt til mindre enn  $\pm$  1%.

#### 4.2.4 Bestemmelse av perivitellint volum

Volumet av PVR ble beregnet utfra fruktose-space i egget (Riis-Vestergaard, 1981). Metoden er basert på at chorion er fritt permeabel for molekyler med molekylvekt på opptil ca. 300-400 Dalton (Davenport et al., 1981). Fruktose har molekylvekt på ca. 180 Dalton, og er vist å være egnet. I tillegg er det enkelt å bestemme fruktose kvantitativt (Kulka, 1956).

Metoden for volumberegning av PVR, går i prinsippet ut på la en kjent konsentrasjon av fruktose (i dette tilfellet 15 mM fruktose i 34% sjøvann), diffundere inn i PVR i et kjent antall egg under forsiktig omrøring. Etter en gitt innvaskings-~~tid~~taes eggene ut av fruktoseløsningen og legges enkeltvis på et tørt filterpapir. Dette gjøres for å fjerne adherende fruktosemedium på utsiden av chorion. Eggene overføres deretter til et kjent volum fruktosefritt 34% sjøvann v.h.a. en fin akvarellpensel. Etter en gitt utvaskingstid (også her med

forsiktig magnetrøring), bestemmes fruktosekonsentrasjonen i sjøvannet kvantitativt etter Kulka's metode.

I forsøkene ble det benyttet 2 paralleller á 20 egg. Standardene til målingene ble laget ved å fortynne en 15 mM fruktoseløsning med sjøvann. Parallelle målinger av fortynningsserien viste at analyseunøyaktigheten lå innenfor den oppgitte usikkerheten på  $\pm 1\%$ . Parallelle målinger på utvaskingsvann fra 20 egg (tabell 2) viste variasjoner på ca. 5%. Denne verdien ble siden benyttet som usikkerhet i målingene. Ved å variere eggens oppholdstid i inn- og utvaskingsmediene, ble inn- og utvaskingstidene bestemt til 60 minutter (tabell 2). For å finne hvilket antall egg som samlet gav absorpsjon innenfor standardkurven, ble et tilfeldig antall på 20 egg valgt som utgangspunkt. Det samlede PVR- volumet i disse eggene gav et fruktosespace som var kvantitativt målbart innenfor standardkurven. For å bevege eggene mellom de ulike mediene ble det benyttet en bremsepipette med stor indre motstand (Fig. 8). Eggene som skulle fruktosebehandles ble nøye besiktiget under lupe før de ble sugd inn i pipetten.

En annen metode for å bestemme volumet av PVR, er basert på at PVF har samme konsentrasjon av salter som det ytre mediet. Differansen i ioner mellom vaskete og uvaskete egg vil derfor utgjøre ionene i PVR. Dersom konsentrasjonene av de ulike ioner i sjøvannet er kjent, kan volumet av PVR beregnes etter formelen:

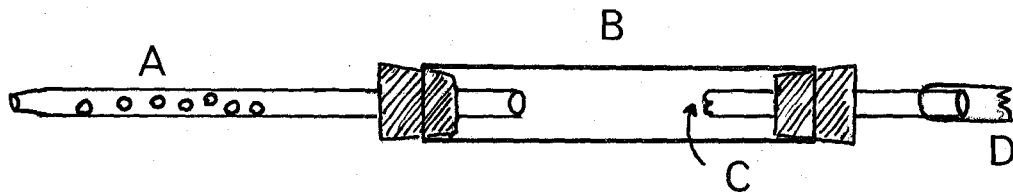
$$\text{Vol av PVR} = \frac{\text{mol X i PVR}}{\text{Mol X/liter sjøvann}} \quad (1)$$

der X er det målte ionet.

I forsøkene ble  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  benyttet. Kvantitative bestemmelser

Tabell 2 . Kvantitativ bestemmelse av fruktose til utvaskingsmedium etter forskjellig inn- og utvaskingstider. (20 egg + 1 ml sjøvann).

Gruppe	Inn/utvaskingstid	Absorbsjon
a <sub>1</sub>	30 minutter	0,14
a <sub>2</sub>	30 --	0,15
b <sub>1</sub>	60 --	0,15
b <sub>2</sub>	60 --	0,16
c <sub>1</sub>	120 --	0,16
c <sub>2</sub>	120 --	0,15

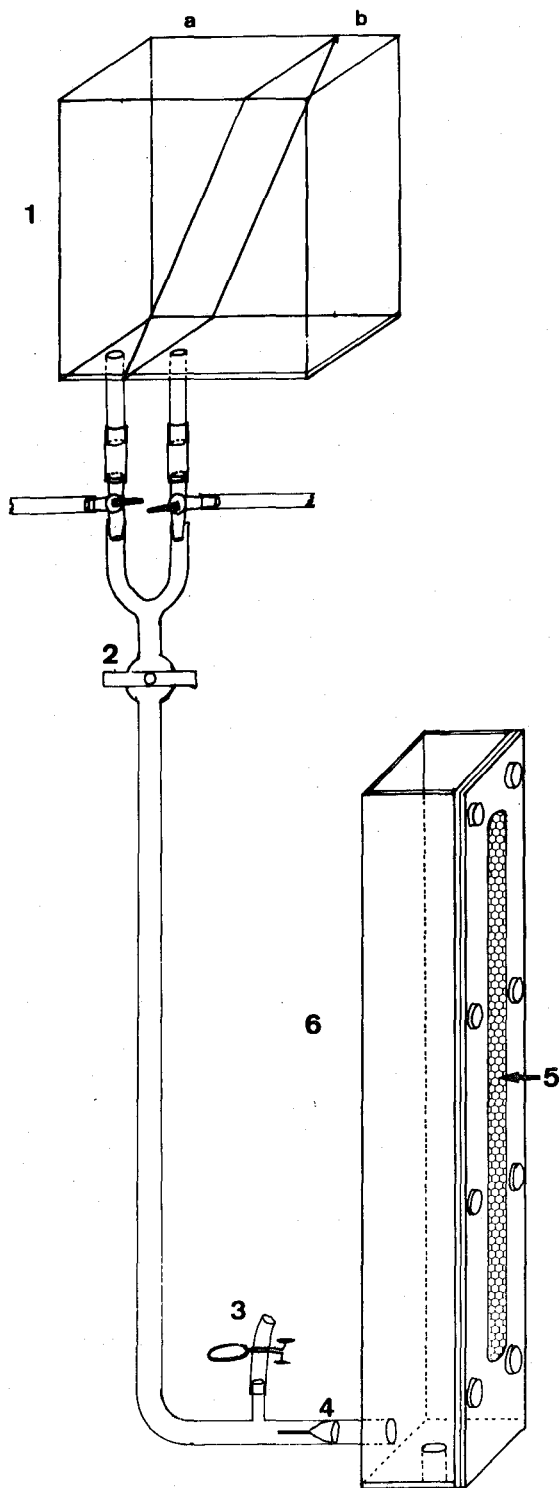


Figur 7. Skisse av bremsepipette. A: Del av pasteurpipette. B: glassrør åpent i begge ender. C: Gjensmeltet glassrør med meget trang åpning. D: Sugelangse.

av disse ionene ble gjort som beskrevet tidligere.  $K^+$  ble ikke benyttet i dette forsøket på grunn av den relativt lave konsentrasjonen av dette ionet i sjøvannet i forhold til i egget ( $K^+$ - konsentrasjonen i 34% sjøvann er ca. 10 mM).

#### 2.4.5 Egenvektsbestemmelser

Til bestemmelse av egenvekt ble det benyttet en tetthetsgradient basert på saltvann av ulik saltholdighet ved 5°C. 2 stamløsninger på henholdsvis 27% og 34% saltholdighet ble blandet i varierende forhold og ført ned i en kolonne på en slik måte at det ble dannet en saltholdighetsgradient (Fig. 8). Påfyllingshastigheten i kolonnen ble regulert ned til ca. 10 ml/min. for å unngå turbulens (Dette ble tilpasset ved å blande fenolrødt i den ene stamløsningen slik at vannbevegelsene ble gjort synlige). Til egenvektsbestemmelsene ble det benyttet 8 egg i kolonnen samtidig. Disse eggene var på forhånd bragt i likevekt med 27% sjøvann for at synkehastigheten skulle bli så lav som mulig. Etter ca. 5 minutter hadde eggene stabilisert seg i gradienten. Sjøvannet i PVR vil få samme konsentrasjon av salter som det omkringliggende mediet i alle nivå av kolonnen, på grunn av chorions høye permeabilitet. Gjennom membranen i kolonneveggen ble det med en kanyle tatt ut vannprøver (ca. 1 ml) fra eggens flotasjonsnivå.  $Cl^-$ -konsentrasjonen i prøvene ble bestemt ved titrering som tidligere beskrevet. Utfra en standardkurve som var laget ved innbyrdes bestemmelse av  $Cl^-$ - konsentrasjon og saltholdighet (saltholdighetsbestemmelsene ble utført av Havforskningsinstituttets laboratorium) ble eggens egenvekt bestemt som saltholdighet ved 5°C. Hver måledag ble ny gradient satt opp.

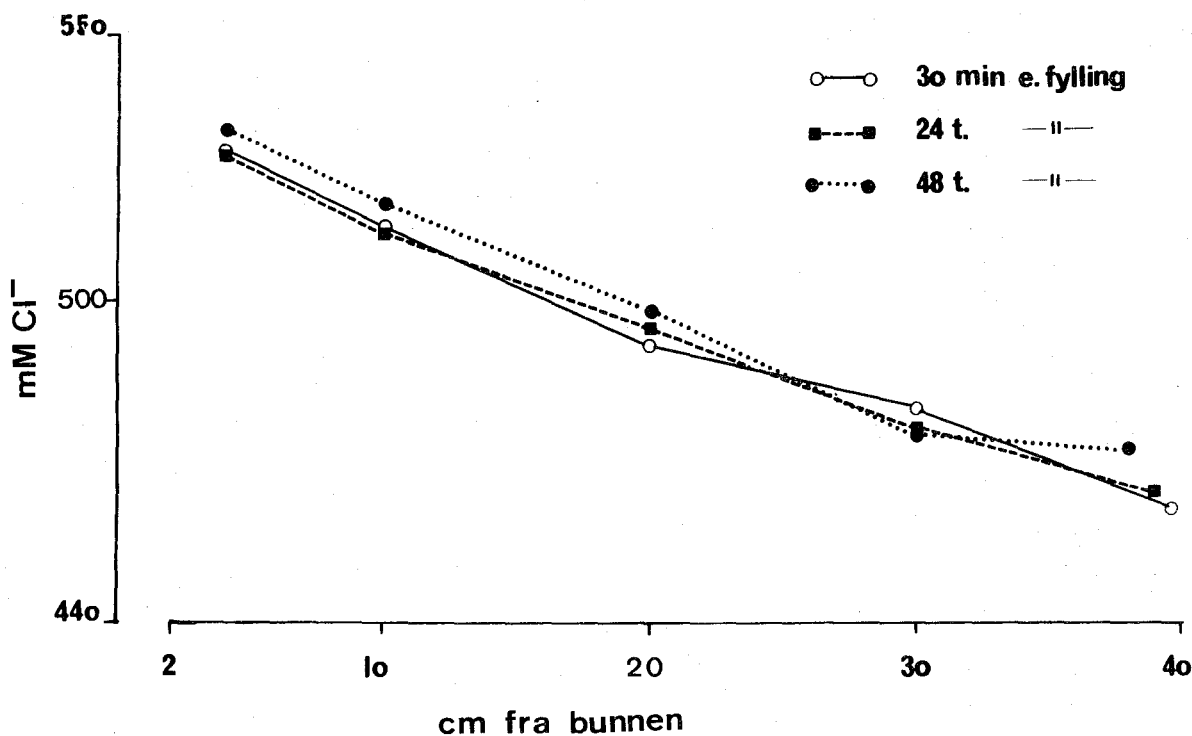


1. Vannreservoir for:
  - a) høy saltholdighet ( $V = 125 \text{ ml}$ )
  - b) lav saltholdighet ( $V = 125 \text{ ml}$ )
2. Kran.
3. Lufteventil
4. Dyse for å redusere vannflow
5. Gummimembran
6. Kolonne ( $V = 250 \text{ ml}$ )

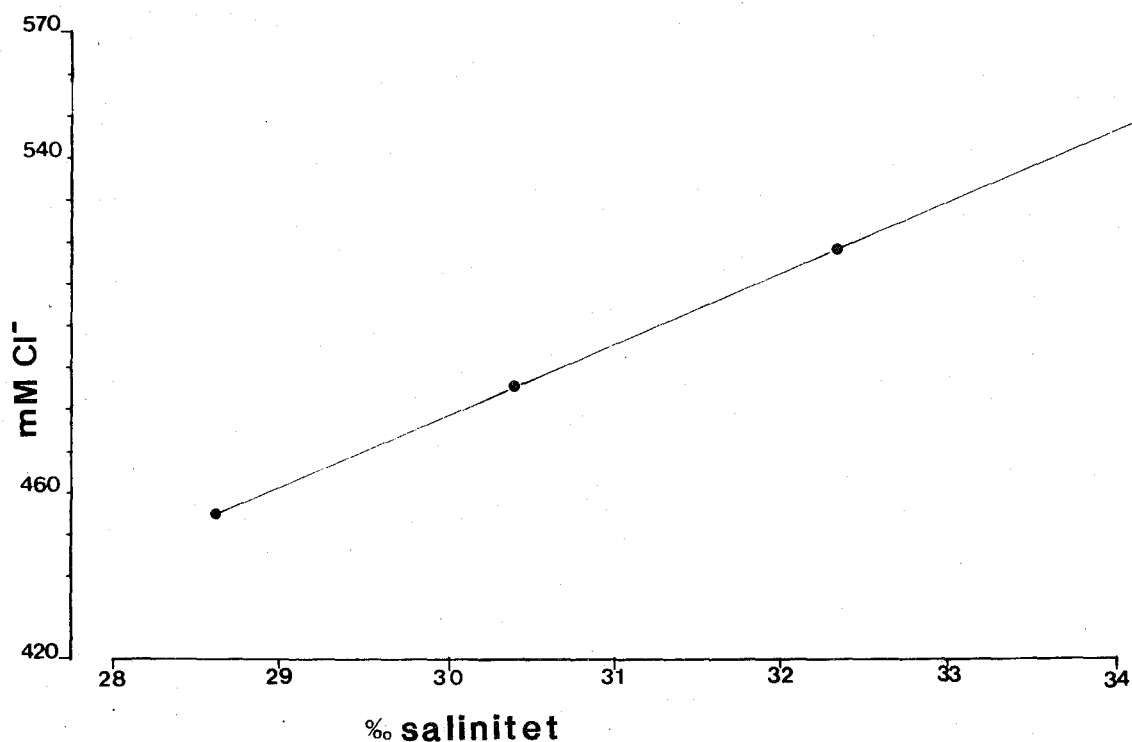
*Figur 8. Apparat for fremstilling av tetthetsgradient. Eggene ble sluppet ned i kolonnen og instilte seg i gradienten på et nivå som tilsvarte eggens spesifikke vekt. Gradienten ble bestemt ved  $\text{Cl}^-$ -titrering av prøve som ble tatt ut via gummimembranen. Prinsippet for fremstilling av tetthetsgradient er hentet fra Svensson (1960).*

For å undersøke gradienten med hensyn på både stabilitet og linearitet ble følgende kontrollforsøk gjort: Etter fylling av kolonnen på vanlig måte med sjøvann av varierende saltholdighet, ble vannprøver á 1 ml tatt ut fra 5 forskjellige nivå i kolonnen. Nivåene ble bestemt utfra en innebygget cm-skala i kolonnens vegg, og ble valgt til å være 4-, 10-, 20-, 30- og 40 cm fra bunnen av kolonnen. Dette ble gjentatt på samme gradienten etter 24- og 48 timer etter fylling av kolonnen.  $\text{Cl}^-$ -konsentrasjonen i vannprøvene ble bestemt ved titrering som tidligere beskrevet. Figur 9 viser  $\text{Cl}^-$ -konsentrasjonene over tid i de forskjellige nivåene av kolonnen. Gjentatte titreringer av én sjøvannsprøve gav et standardavvik på 0,5%. Omregnet til saltholdighet representerer dette ca. 0,17%. Med en saltholdighetsdifferanse mellom stamløsningene på 8% i en kolonne på 40 cm, vil 1 cm i kolonnen dekke en variasjon i saltholdighet på ca. 0,2%. Sett på bakgrunn av titreringsusikkerheten, vil saltholdigheten kunne bestemmes analyttisk til nærmeste cm i kolonnen. Fordi eggene i de fleste tilfellene viste en spredning i kolonnen på mer enn  $\pm 1$  cm, var det ikke hensiktsmessig å prøve å øke nøyaktigheten ved å ekspandere gradienten.

I serie 2 ble det hver måledag benyttet 8 egg i hver måling. vannprøvene ble tatt ut i eggenes innbyrdes flotasjonsnivå. Kun én vannprøve ble tatt ut og analysert. Av denne grunn vil ikke resultatene fra disse målingene gi noen informasjon om den biologiske spredningen i materialet. I serie 3 ble dette rettet på ved å ta ut 3 vannprøver som dekket eggenes spredning i gradienten. Måling på enkeltegg ble ikke gjort fordi dette ville ha medført et enormt titreringsarbeid.



Figur 9.  $\text{Cl}^-$  konsentrasjon i ulike nivå av kolonnen  $\frac{1}{2}$ , 24- og 48 timer etter at tetthetsgradienten ble laget. Hvert punkt på kurven er et gjennomsnitt av 3 parallelle målinger på samme vannprøve ( $\overline{S.D.} = 2,2$ ). Kolonnen var plassert i termostatert kjølerom.



Figur 10. Konsentrasjon av  $\text{Cl}^-$  som funksjon av salinitet i sjøvann.



### 4.3 VEIINGER OG MÅLINGER

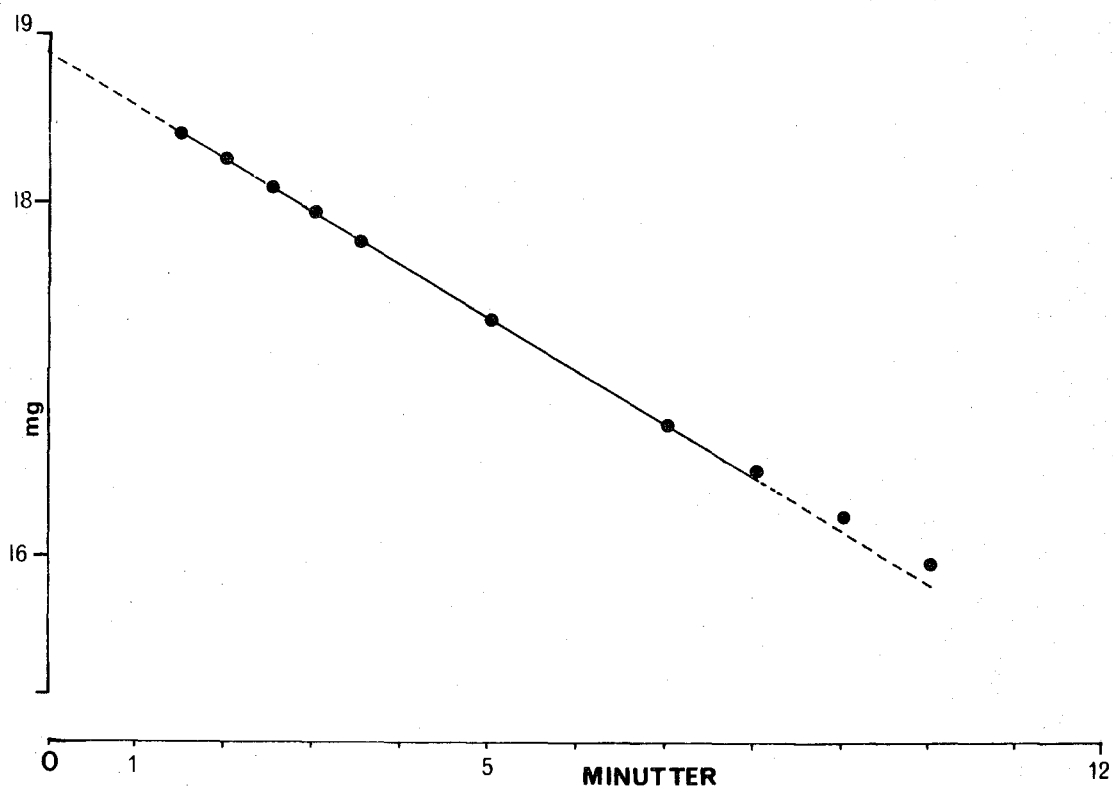
#### 4.3.1 Måling av eggdiameter

Til måling av eggdiameter ble det benyttet en Wild Heerebrugg lupe med måleokkularer. Med bremsepipetten ble 20 egg overført til et målekammer fylt med 34% sjøvann. Diameteren til eggene ble målt ved 40X forstørrelse. Målingene ble gjort ved 5°C. I serie 2 ble eggdiameteren målt i 2 retninger normalt på hverandre, for å undersøke om eggene var sfæriske.

#### 4.3.2 Våtvektmålinger

20 egg ble lagt enkeltvis på et tørt filterpapir for å fjerne adherende vann på utsiden av chorion. Tiden ble satt til  $T = 0$ . Eggene ble deretter hurtig overført til en på forhånd innveid veieskål v.h.a. en finbustet akvarellpensel. Når eggene er i luft, vil det hele tiden fordampe vann fra eggets overflate. For derfor å kunne beregne eggets våtvekt ved  $T = 0$ , ble vekten av eggene registrert hvert 30. sek. over en periode på 5 min. Ved å stille våtvekt mot tid, framkom en fordampningskurve som ble ekstrapolert tilbake til  $T = 0$ .

Fordampningskurvens linearitet ble testet ved å registrere våtvekten til 20 egg hvert 30. sek. over en periode på 10 minutter. (Fig. 11). Først etter 8 minutter viser kurven tendens til å flate ut. Fordampning av vann fra egget er en funksjon av overflatearealet. Selv om eggene taper så mye vann at de blir deformerte fra sfæren, vil dette idéelt sett ikke endre på overflatearealet. Derav følger en linear fordampningskurve. Alle veiingene ble utført på en elektronisk mikrovekt av typen CAHN 25 Automatic electrobalance, med en oppgitt nøyaktighet på  $\pm 1 \mu\text{g}$ .



*Figur 11 . Vekttap hos 20 egg i luft ved romtemperatur. Ved tid = 0, ble eggene lagt enkeltvis på et tørt filterpapir for å fjerne adherende vann på utsiden av chorion. Ved å ekstrapolere kurven til skjæring med ordinaten, kan våtvekt ved tid = 0 bestemmes.*

### 4.3.3 Tørrvektmålinger

Eggene fra våtvektmålingene ble benyttet til måling av tørrvekt. Egg og veieskål ble etter bestemmelse av våtvekt overført til varmeskap og inkubert ved 86°C i 70 minutter. Etter tørking ble eggene veid på tidligere omtalt mikrovekt, og vekt av veieskål ble subtrahert.

For å bestemme tørketid, ble en gruppe egg tatt ut av varmeskapet med jevne mellomrom og veid (tabell 3 ). Dette forsøket viste at 70 minutter i varneskap ved 86°C er nok til å tørke eggene fullstendig. Veieskålene som var laget av aluminiumsfolie endret ikke vekt etter 70 minutter i varmeskap v/86 C.

Tabell 3 . Tørking av 2 grupper å 20 egg i varmeskap ved 86°C.

Tørketid	Gruppe A	Gruppe B
0 minutter	21,13 mg	21,38 mg
25 --	1,82 -	1,92 -
50 --	1,78 -	1,80 -
70 --	1,77 -	1,78 -
12 timer	1,77 -	1,78 -

#### 4.4 BEREGNINGER

##### 4.4.1 Beregning av vanninnhold i embryo

Vanninnhold i embryo beregnes utfra følgende parametre:

1. Eggets våtvekt
2. Eggets tørrvekt
3. Volum av PVR
4. Vanninnhold i PVF

Metodene for å bestemme disse parametrene med unntak av den siste, er tidligere beskrevet. Dersom det antas at PVF består av saltvann av samme konsentrasjon som det ytre mediet, kan vanninnholdet i PVF finnes ved følgende forsøk: 1,0 liter aq. dest. tilsettes 34 gr. tørt sjøsalt. Etter at alt saltet er oppløst, leses volumøkningen direkte av i en målesylinder. Vanninnholdet i sjøvann ble på denne måten bestemt til 98,7 volum%. Dersom vanninnholdet i PVF settes til 100%, vil dette føre til en overestimering av vann i PVF med 1,3 volum%. Den totale volumfeilen i et egg med et PVR på 20% av totalvolumet, vil bli mindre enn 0,3%. I de følgende metodebeskrivelsene er derfor vanninnholdet i PVF satt til 100%, med egenvekt 1,000. Vanninnholdet i embryo beregnes utfra formelen:

$$\text{Vanninnhol} = (\text{våtvekt} - \text{tørrvekt}) - \text{vol. PVR} \quad (2)$$

Differansen (våtvekt - tørrvekt) har benevnelsen mg og representerer det totale vanninnholdet i egget (PVF inkl.). I beregningene over vanninnhold ble våtvekt og tørrvekt omregnet til  $\mu\text{l}$  vann/embryo. I beregningene ble middelveidier for våtvekt og tørrvekt benyttet.

#### 4.4.2 Beregnete konsentrasjonsforhold i embryo

På grunnlag av de kvantitative analysene av salter og NPS i embryo, kan det utfra kjenskap til embryo's vanninnhold beregnes konsentrasjoner av disse stoffene. Beregningene forutsetter at vann og oppløste stoffer er fordelt etter et "én-kammer prinsipp" som tilsier at de oppløste stoffene er jevnt fordelt på hele vannvolumet. Denne modellen er god for de tidligste utviklingsstadiene når embryo hovedsaklig består av plomme-masse. Senere i embryogenesen er ikke modellen like god på grunn av dannelsen av ulike strukturer og vev i embryo.

#### 4.4.3 Beregning av permeabilitet

Vitellinmembranens vannpermeabilitet kan beregnes som en funksjon av observerte volumendringer og osmotiske gradienter. For disse beregningene forutsettes følgende:

1. Embryo betraktes som en kule m.h.t. overflateareal.
2. Overflatearealet regnes som konstant gjennom embryogenesen.
3. Osmolaliteten i plommemassen regnes for å være konstant 330 mOsm for både serie 1 og serie 2.
4. Chorion's diameter er konstant.
5. Væskenes vannaktivitet er proporsjonale med damptrykket  $p$ , som beregnes utfra Raoult's lov (4).
6. Vannfluxene inn og ut av egget er proporsjonale med vannaktivitetene  $i$  og utenfor egget.
7. Membranene er idéelt semipermeable (d.v.s impermeable for oppløste stoffer).

Av pkt. 6 følger:

$$J^i \times p^i = J^u \times p^u \quad (3)$$

der  $J^i$  og  $J^u$  er vannflux henholdsvis inn og ut av egget.  $p^i$  og  $p^u$  er vannaktiviteten i og utenfor embryo uttrykt som væskenes vanndamptrykk.  $p^i$  og  $p^u$  beregnes utfra Raoult's lov:

$$p = p' \times (1-X) \quad (4)$$

der  $p'$  er damptrykket til aq. dest., og  $X$  er molbrøken for oppløst stoff i en idéell løsning med samme damptrykk som den reelle.  $X$  kan bestemmes utfra kjenskap til løsningens osmolalitet:

$$X = \frac{Osm}{Osm + 55,6} \quad (5)$$

der molaliteten til aq. dest. er 55,6. Av (2) følger:

$$J^i = J^u \times p^u/p^i \quad (6)$$

Volumendring pr. tidsenhet for et embryo med diffusjonsarealet  $A$ , vil være differansen mellom vannflux inn og vannflux ut. Av dette følger:

$$\frac{dV}{dt} = (J^i - J^u) \times A \quad (7)$$

Ved innsetting av (6) i (7):

$$\frac{dV}{dt} = (p^u/p^i - 1) \times J^u \times A \quad (8)$$

Ved å løse (8) med hensyn på  $J^u$  finnes filtrasjonspermeabiliteten:

$$P_f = \frac{dV}{dt} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{(p^u/p^i - 1)} \quad (9)$$

$\frac{dV}{dt}$  beregnes utfra endringene i embryo's vanninnhold. Diffusjonsarealet finnes på bakgrunn av forutsetning 1 side 40.

#### 4.4.4 Beregning av diffusjonsareal

Volumet av embryo finnes av formelen:

$$\text{Volum av embryo} = \text{eggvolum} - \text{PVR-volum} \quad (10)$$

Ved å kombinere formlene for volum og areal av en kule, kan diffusjonsarealet i embryo beregnes av formelen:

$$A = (36\pi \times V^2)^{1/3} \quad (11)$$

#### 4.4.5 Usikkerhetsberegninger

I det neste kapittelet er resultatene presentert som sammenlikninger mellom kontroll- og oljebelastet gruppe. På grunn av eggens størrelse og volum, var det med unntak av osmo- og egenvektsmålingene nødvendig å gjøre målingene på grupper av egg. I de fleste målinger ble grupper á 20 egg benyttet, fordi dette antallet ga kvantitativt målbare mengder. Av denne grunn representerer hver måling et idéelt gjennomsnitt av 20 egg, selv om de ikke gir noe bilde av den biologiske spredningen i materialet.

For derfor å kunne påvise eventuelle forskjeller mellom kontroll- og oljebelastet gruppe, må usikkerhetene i målingene vurderes på grunnlag av apparaturens nøyaktighet og de foreliggende resultatene.

Dersom det kun foreligger ett sett målinger av størrelsene

x, y og z, beregnes den sammensatte funksjon direkte som  $R = f(x, y, z)$ . Usikkerheten i målingene beregnes til å være  $S_x$ ,  $S_y$  og  $S_z$ . Den totale usikkerheten i den sammensatte funksjonen beregnes etter formelen (Rasmussen, 1968):

$$S_R = \left[ \left( \frac{df}{dx} \times S_x \right)^2 + \left( \frac{df}{dy} \times S_y \right)^2 + \left( \frac{df}{dz} \times S_z \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

Dersom funksjonen er en sum eller differanse av typen  $f(x) = x + y + z$ , forkortes formel (12) til:

$$S_R = \left[ (S_x)^2 + (S_y)^2 + (S_z)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (13)$$

### Statistikk

Forskjellen mellom data ble beregnet etter Student's tohaletet t-test (Woolf, 1968). Signifikansnivået ble valgt til  $p < 0,05$ . Denne testen er kun benyttet i noen tilfeller der det foreligger parallelle målinger.



## 5. RESULTATER

### 5.1 Aldersbestemmelser

Resultatene fra daglige observasjoner av egg er sammenfattet i tabell 4. I løpet av det første døgnet etter befruktning vil mitotiske delinger av blastodisken gi opphav til et økende antall blastomerer. Antall blastomerer vil ved 5°C være et sikkert alderskriterium fram til 64-cellestadiet. Etter at dette stadiet er nådd (ca. 1 døgnet etter befruktning), vil blastomerene etterhvert bli så små at en videre aldersbestemmelse basert på disse vil være uhensiktsmessig. I stedet benyttes betegnelsen "mangecellestadiet" om utviklingsstadiene fra 64-cellestadiet og fram til de første tegn på epiboli, som innledes ca. 36 timer etter befruktning. På dette stadiet i utviklingen kalles embryo for morula. Epiboli består i at celler fra kimskiven brer seg som et sammenhengende lag over plommesekken for tilslutt å omslutte denne fullstendig. Graden av omvoksning angis ofte som % epiboli før plommesekken etter ca. 7 døgnet etter befruktning er fullstendig omvokst (100% epiboli).

### 5.2 Osmolalitet i plommemasse

Osmolaliteten i plommemassen til torskeembryo under utvikling er gitt i figur 12. Osmolaliteten faller gjennom hele embryogenesen. Like før klekking er det tendenser til at den stabiliserer seg på ca. 300 mOsm. Dette er lavere enn plasmaosmolaliteten til en voksen fisk som ligger på ca. 350 mOsm (Parry, 1965). Osmolalitetmålinger på plommemasse i uaktiverte egg som ikke hadde vært i kontakt med sjøvann, ga verdier tett opptil plasmaosmolalitet til voksen fisk (fig. 12). Den

*Tabell 4. Utviklingsstadier av torskeembryo i sjø-  
vann (34‰) ved 5 °C.*

Tid etter befruktning	Stadium
4 timer	Encellestadiet.
8 timer	Tocellestadiet.
.	
.	
.	
24 timer	64-cellestadiet.
36 timer	Begynnende epiboli.
2 døgn	Ca. 30% epiboli.
5 døgn	Ca. 60% epiboli.
7 døgn	Epiboli avsluttes. Embryo viser tydelige øyeanlegg og myotomer. Embryo rekker halvveis rundt plommesekken.
10 døgn	Begynnende pigmentering. Hjerteanlegg.
12 døgn	Embryo begynner å bevege seg inne i egget. Hjertet er ferdig anlagt, men foreløpig ingen hjerteaktivitet.
14 døgn	Hjertet slår hos ca. 80% av embryoene.
16 døgn	Begynnende klekking.
17 døgn	Over 50% klekking.

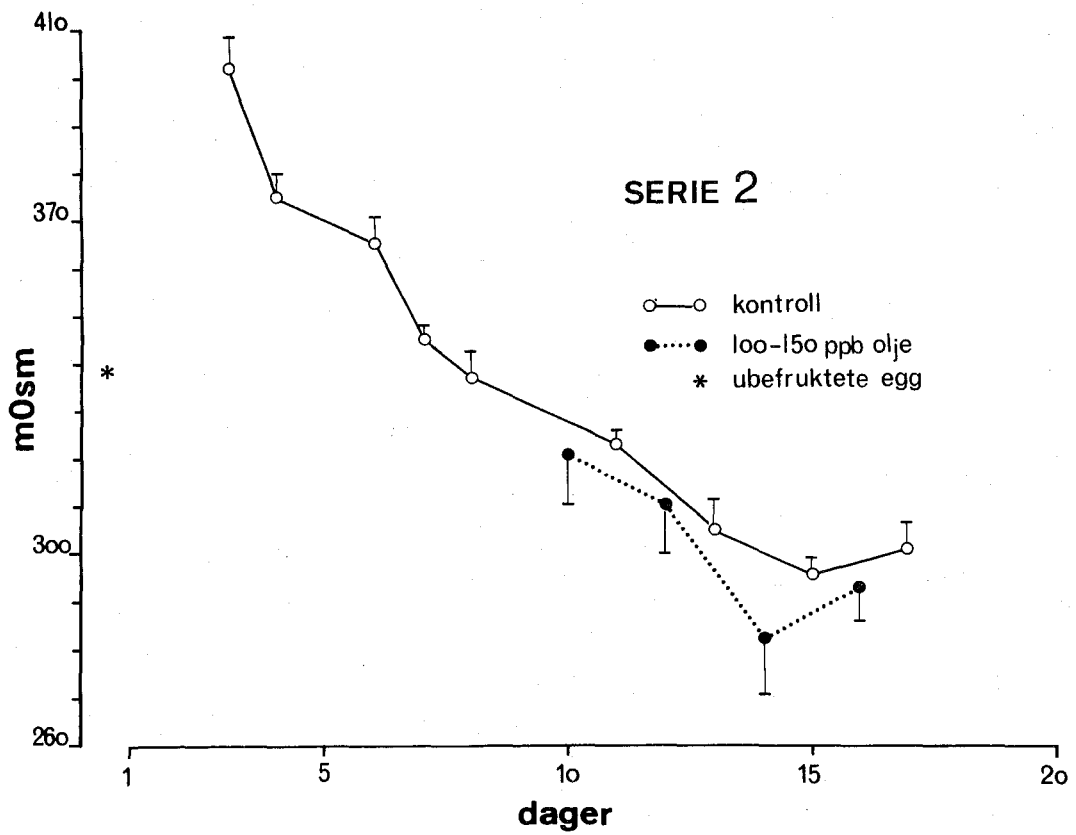
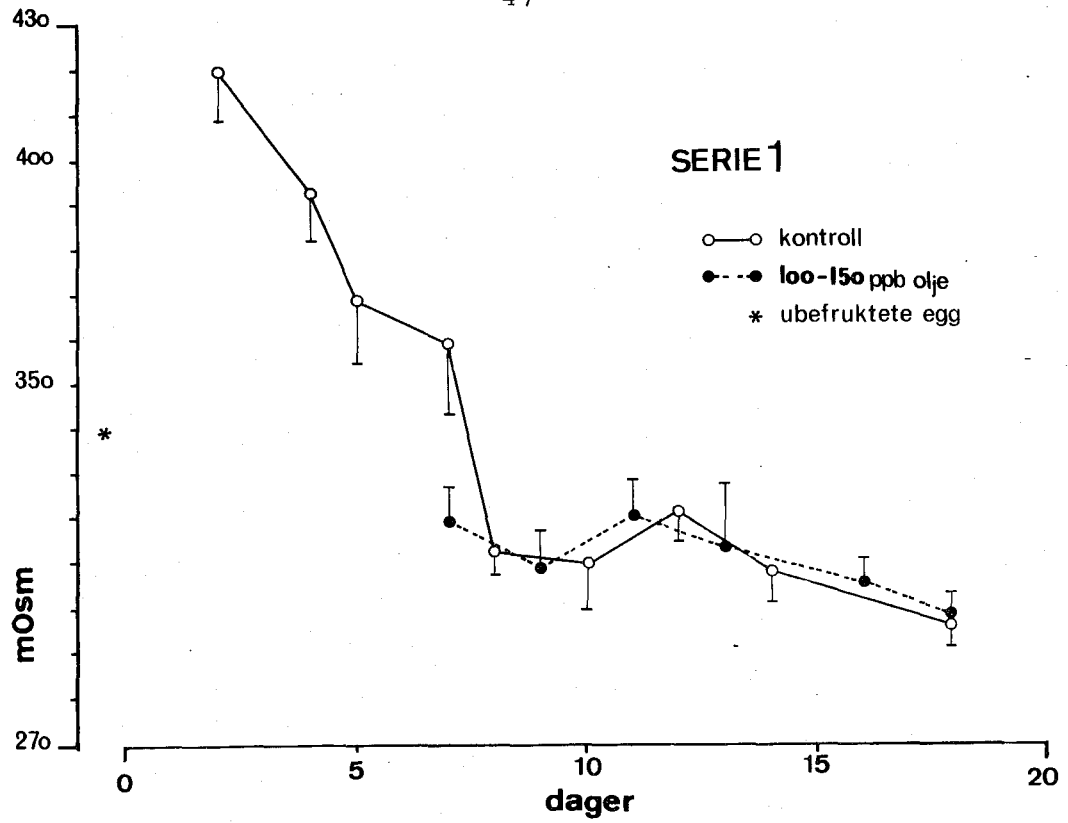
metodiske usikkerheten er tidligere bestemt til å være ca.  $\pm 1\%$  av verdiene. Standardavvikene i målingene (fig. 12) viser at den biologiske spredningen i de fleste tilfellene er større enn metodeusikkerheten.

Isolert sett vil enkelte målinger av oljebelastete egg være signifikant forskjellige fra kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ). Likevel kan det ikke utelukkes at det er en effekt av oljen som er årsaken til at osmolaliteten i oljebelastete egg i serie 2 ligger lavere enn kontrollverdiene. Denne forskjellen finnes ikke igjen i serie 1.

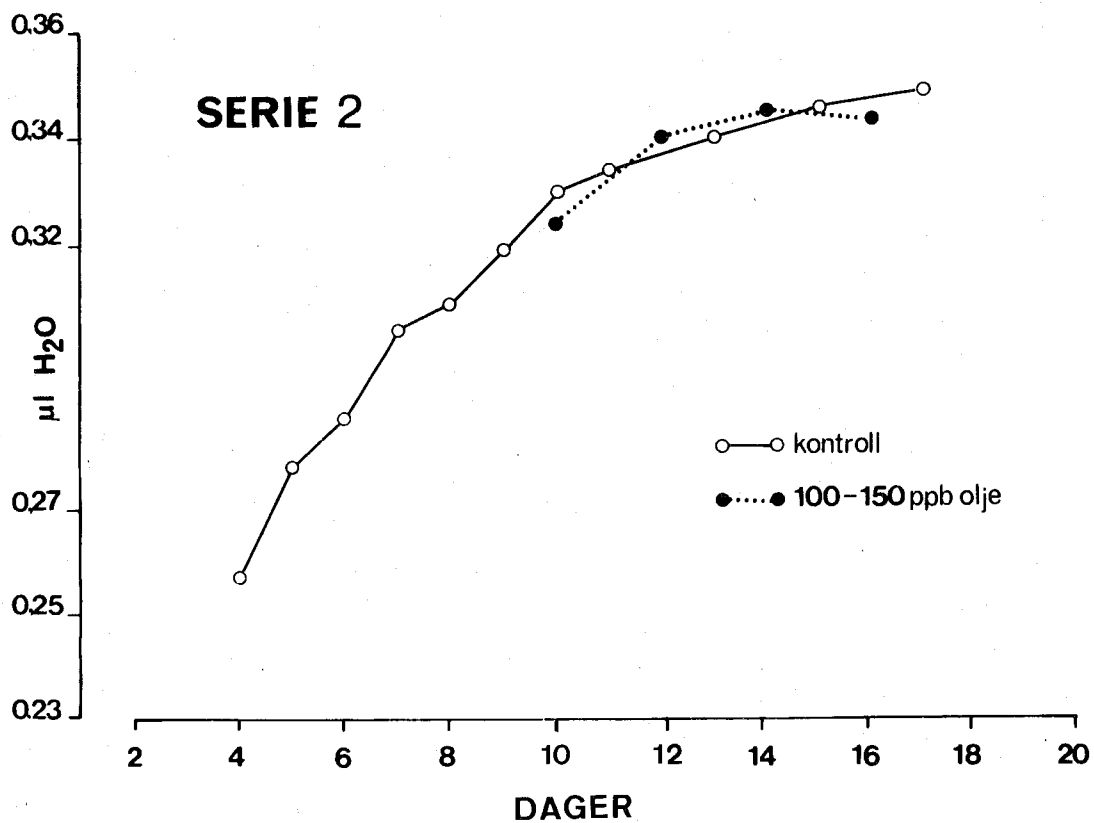
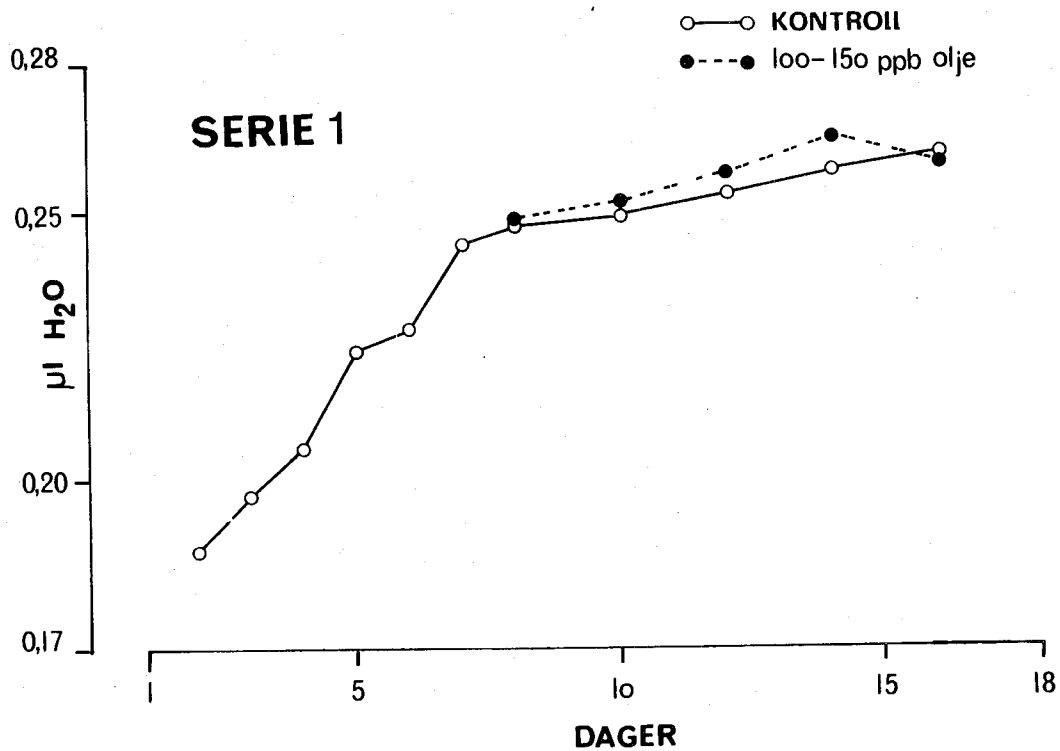
### 5.3 Volum av PVR

Volumet av PVR som funksjon av tid etter befruktning (dager) beskriver en hyperbolsk kurve (fig. 13 og 14). Dette viser at økningen av PVR er størst like etter befruktning for så å avta senere i embryonalutviklingen. Dette kan sees i sammenheng med dannelsen av epithel rundt plommesekken (epiboli) som sannsynligvis reduserer det osmotiske vanntapet. Hvert punkt på kurvene for serie 1 og 2 representerer gjennomsnittet av 2 parallelle målinger. Det maksimale avviket mellom paralleller var 5%. Hver måling ble gjort på grupper á 20 egg. Det er derfor vanskelig å si noe om den biologiske variasjonen. På bakgrunn av den målte usikkerheten ( $\pm 5\%$ ), kan det ikke sies å være forskjell i dannelsen av PVR mellom kontroll- og oljebelastet gruppe.

Figur 14 beskriver dannelsen av PVR som funksjon av dager etter befruktning for serie 3. Volumet av PVR er beregnet ut fra forskjeller i  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  konsentrasjoner mellom vaskete og uvaskete egg. Også eggene i denne serien viser redusert



Figur 12 . Plommeosmolalitet i serie 1 og 2 som funksjon av tid etter befruktning. Hvert punkt på figuren representerer et gjennomsnitt av 4-8 parallelle målinger..



Figur 13. Volum av PVR/egg som funksjon av dager etter befruktning. Volumene er beregnet som fruktose-space (beskrevet i teksten).

økning av volum PVR etter epiboli. Selv om PVR-volumet varierer fra serie til serie, vil det likevel utgjøre omtrent samme del av totalvolumet til eggene i hver serie.

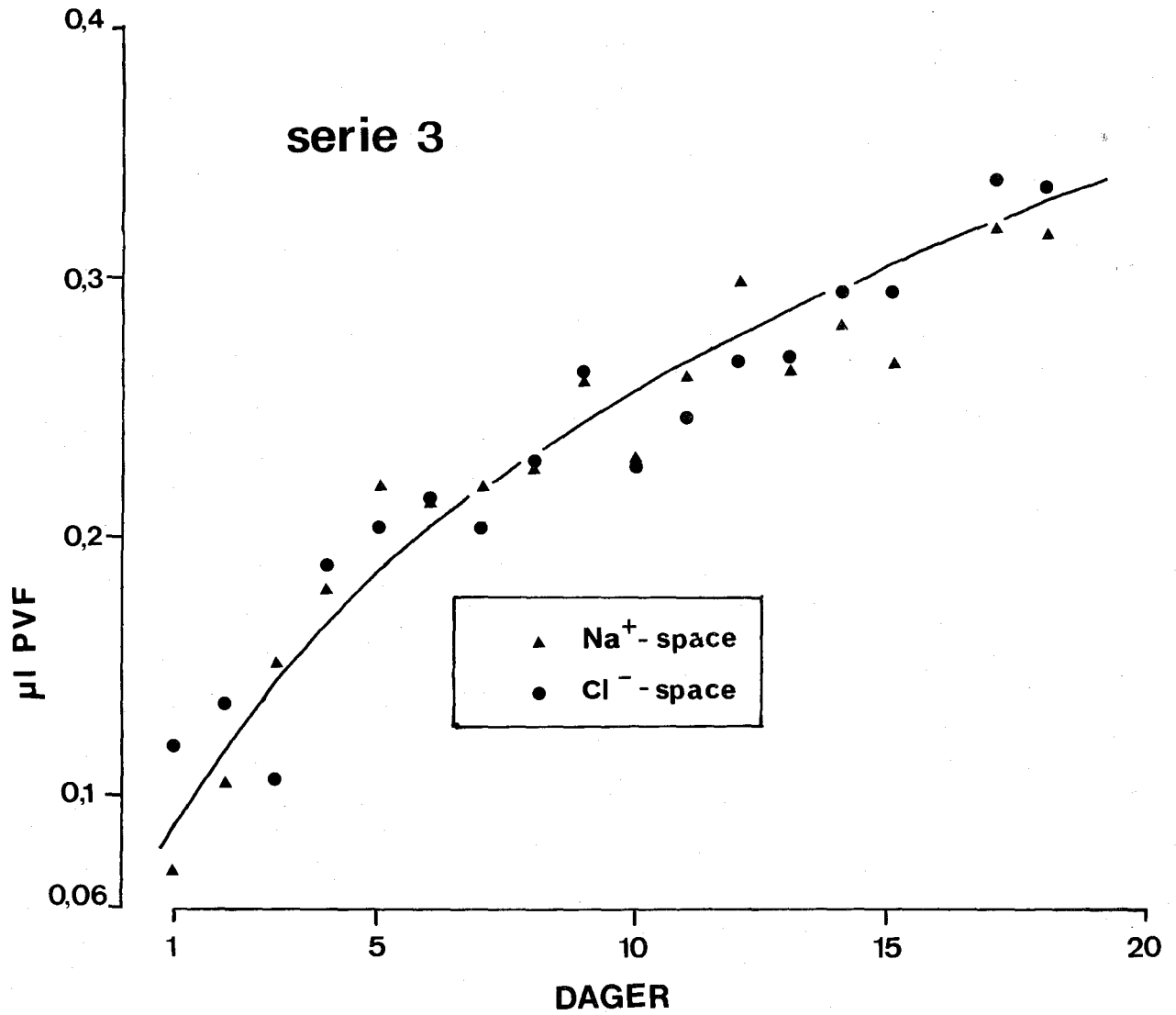
*Tabell 5. Volum av PVR i egg fra de forskjellige seriene like før klekking.*

Serie	vol. PVR	% av eggvol.	målemetode
1	0,26 ul	26,0	fruktose
2	0,35 -	28,2	fruktose
3	0,33 -	28,6	Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>

Idéelt sett skulle beregningene av PVR-volum på grunnlag av Na<sup>+</sup>- og Cl<sup>-</sup> space være identiske. En høy konsentrasjon av negativt ladete ikke-permeerende kolloider i PVF ville kunne forskyve likevekten mellom Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup> etter Gibbs-Donnan prinsippet. Dette er imidlertid ikke særlig sannsynlig fordi denne effekten er ubetydelig i løsninger med så høy ionestyrke som i 34% sjøvann (Bull, 1971). Dessuten er det ingen systematisk forskjell mellom Na<sup>+</sup>- og Cl<sup>-</sup> space, slik at avvikene må tilskrives måleunøyaktigheter. Likevel, de oppnådde data stemmer i hovedsak overens med fruktosemålingene i serie 1 og 2.

#### 5.4 Eggets våtvekt

Våtvektmålingene på grupper á 20 egg viser ingen signifikant endring i løpet av emryogenesen (fig 15). De tilsynelatende store fluktuasjonene i figur 15, er et resultat av valg av akse og metodiske unøyaktigheter. På grunnlag av resultatene



*Figur 14. Volum av PVR/egg som funksjon av dager etter befruktning. Volumene er beregnet på grunnlag av konsentrasjonsforskjeller av Na<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> mellom vaskete og uvaskete egg.*

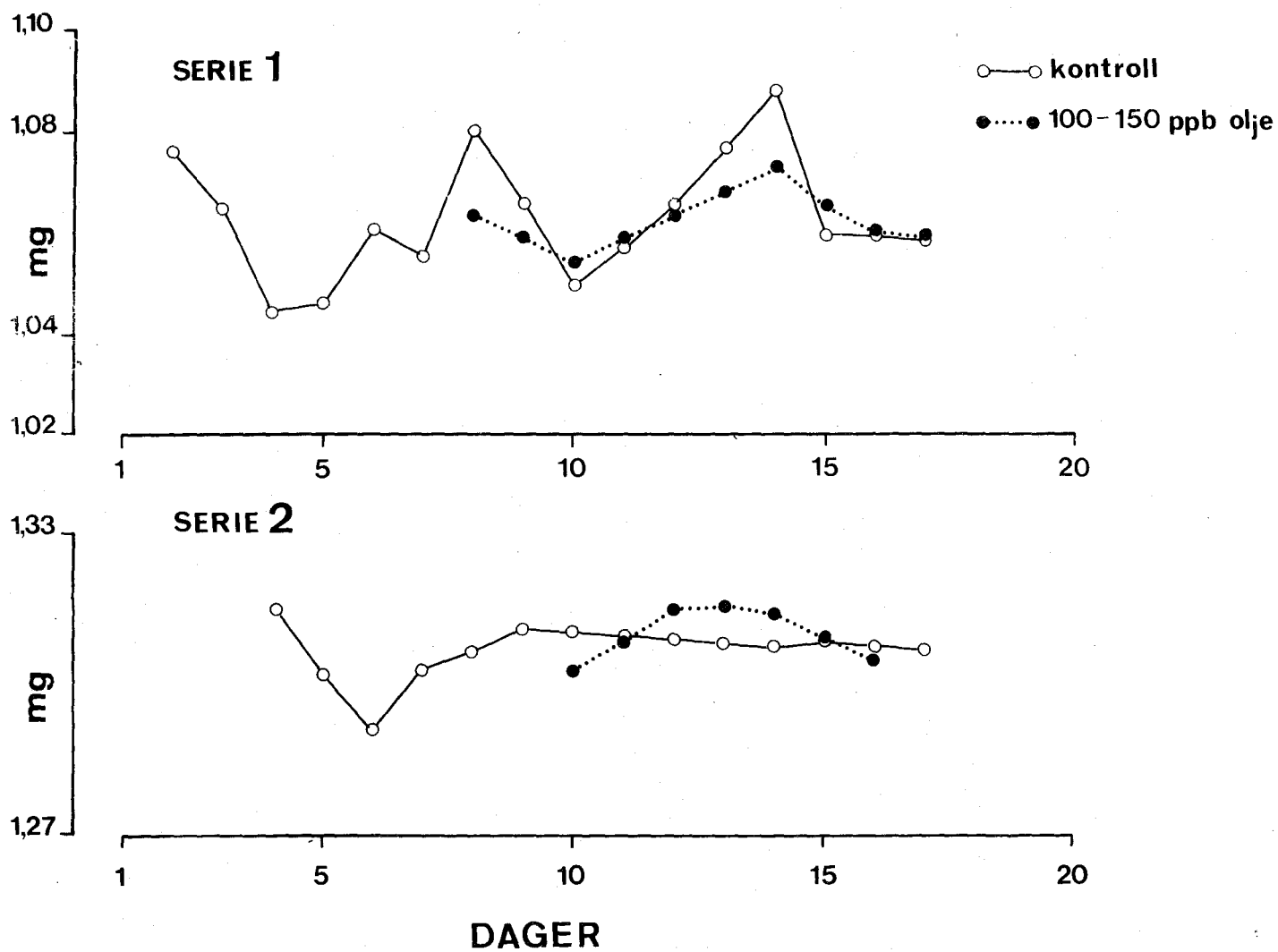
ble det i beregningene av eggets vanninnhold benyttet  
gjennomsnittsverdier for våtvekt : Serie 1,  $(1,06 \pm 0,04)$  mg/egg.  
Serie 2,  $(1,30 \pm 0,02)$  mg/egg.

#### 5.5 Eggets tørrvekt

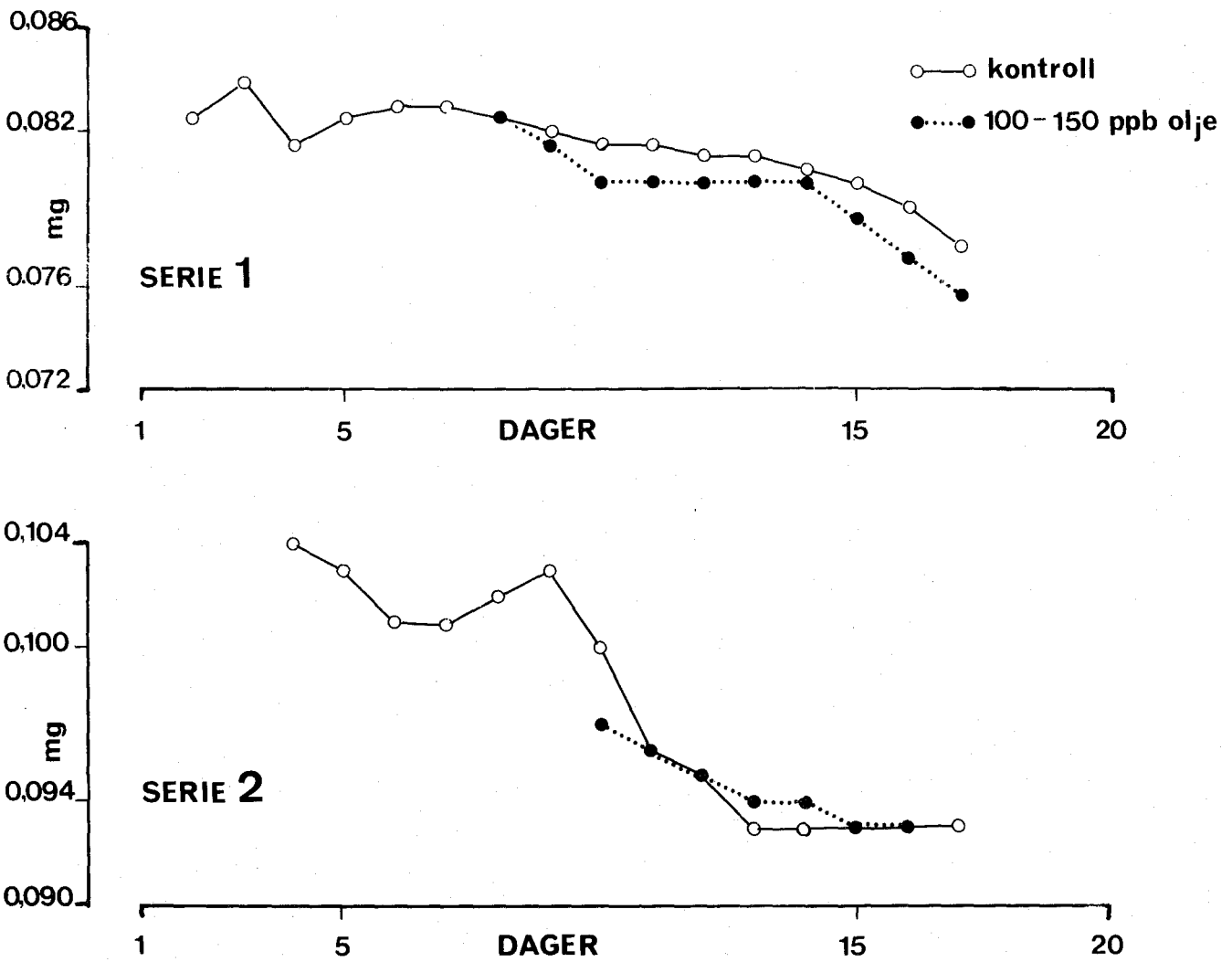
Resultatene fra tørrvektmålingene er gitt i figur 16. Eggets tørrvekt viser en synkende tendens gjennom embryogenesen (fallet i tørrvekt er 7% og 10% for henholdsvis serie 1 og serie 2.) Selv om den prosentvise nedgangen i tørrvekt er markert, vil en tørrvektsendring på ca. 10% utgjøre mindre enn 1% av eggets våtvekt. I de videre beregninger av vanninnhold i egget er derfor følgende gjennomsnittsverdier for tørrvekt benyttet:  
Serie 1,  $(0,080 \pm 0,003)$  mg/egg. Serie 2,  $(0,095 \pm 0,004)$  mg/egg.

I både våtvekt- og tørrvektmålingene ligger verdiene for oljebelastete egg innenfor kontrollverdiens usikkerhet. I serie 1 kan det likevel ikke utelukkes at det er en oljeeffekt som er årsaken til at de oljebelastete eggene har gjennomgående lavere tørrvekt. Denne forskjellen finnes ikke igjen i serie 2.





*Figur 15. Våtvekt/egg for serie 1 og 2 i ulike stadier av embryogeneresen (dager etter befruktning).*



Figur 16. Tørrvekt/egg for serie 1 og 2 i ulike stadier i embryogenesen (dager etter befruktning).

### 5.6 Eggdiameter

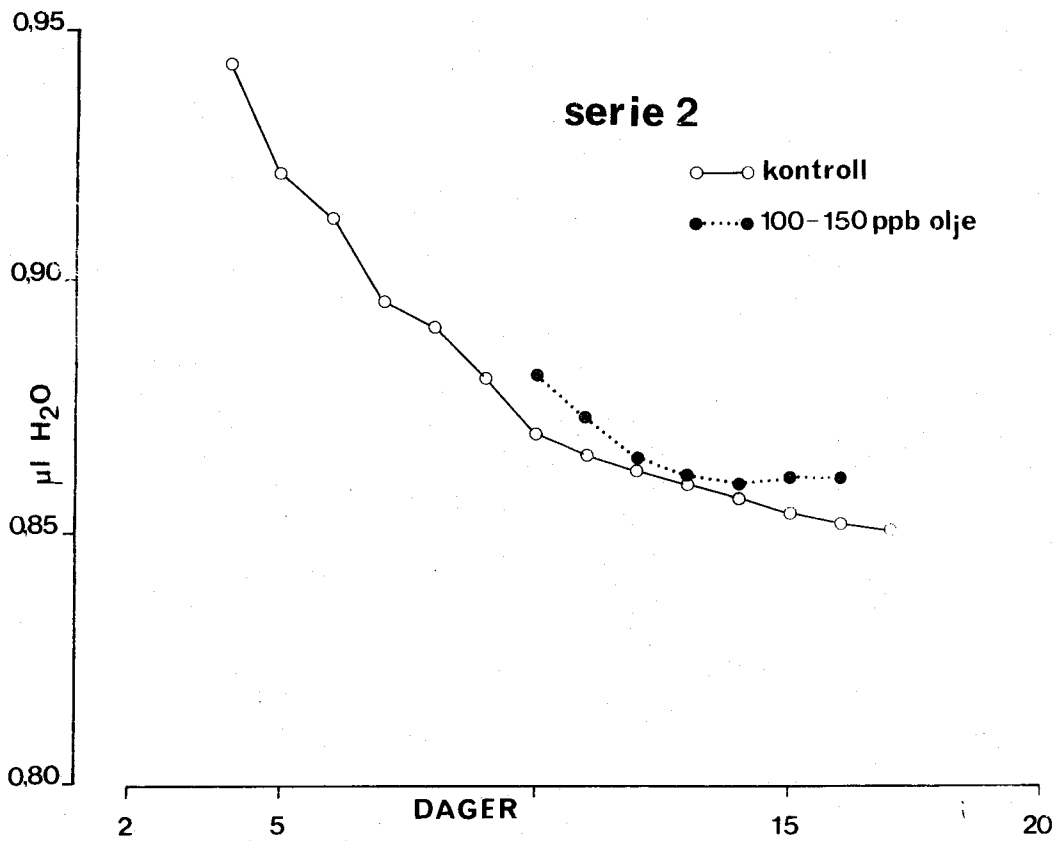
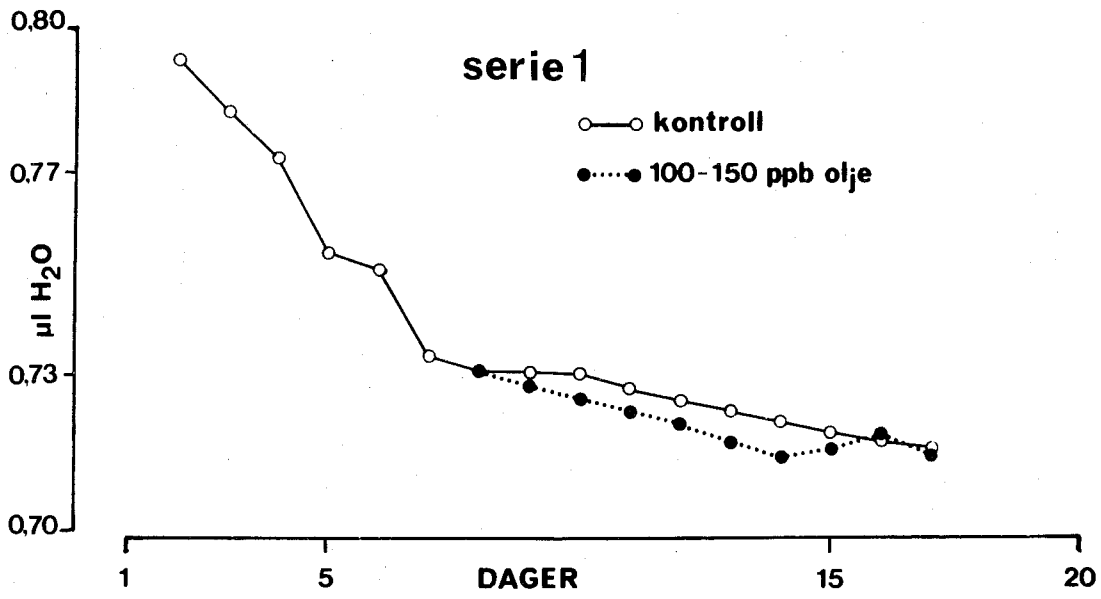
Daglige målinger av eggdiameter viste at denne er konstant gjennom hele embryogenesen (tabell 6). Det ble v.h.a kryssmålinger heller ikke påvist avvik fra sfærisk form.

*Tabell 6. Eggdiameter i serie 1 og 2.*

Serie	dag	gruppe	(diameter $\pm$ Sd) mm
1	5	kontroll	1,25 0,01
1	9	kontroll	1,26 0,01
1	7	olje	1,25 0,01
1	9	olje	1,25 0,01
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
2	3	kontroll	1,33 0,01
2	10	kontroll	1,34 0,02
2	16	kontroll	1,34 0,02
2	9	olje	1,33 0,02
2	15	olje	1,34 0,02

### 5.7 Vanninnhold i embryo

Figur 17 viser endringer i embryo's vanninnhold i løpet av embryogenesen. Beregningene bygger på data fra våtvekt-, tørrvekt- og PVR målinger. Vanntapet fra embryo gir seg utslag i et økende PVR-volum. Figur 17 viser at vanntapet er størst i de første 7-10 dagene etter befruktning. Dette kan som tidligere nevnt skyldes en antatt større osmotisk barriere mellom plommemassen og sjøvannet etter epiboli. I løpet av hele embryonalutviklingen er vanntapet fra embryo omtrent likt for serie 1 og 2 (regnet som % av våtvekt). Fra dag 3



Figur 17. Vanninnhold i embryo i ulike stadier av embryogenesen (dager etter befruktring). Se tekst s. 39 for beregning av vanninnhold.

etter befruktning og fram til klekking er vanntapet i serie 1 9,0%, mens egg i serie 2 taper 9,5%.

Beregningene av vanninnholdet i egget er en funksjon med én variabel (PVR-volum), fordi verdiene for våtvekt og tørrvekt er gjennomsnittsverdier for hele embryogenesen. Usikkerheten i beregningene over vanninnhold vil likevel være en funksjon av usikkerhetene i målingene av våtvekt, tørrvekt og PVR-volum. Usikkerheten i den sammensatte funksjonen beregnes v.h.a. formel (13) side 43: Serie 1,  $\pm 6,0\%$ . Serie 2,  $\pm 6,2\%$ . Disse verdiene representerer den totale usikkerheten i beregningene over vanninnhold i embryo. Individuelle variasjoner fra egg til egg kan det utfra de eksperimentelle data ikke sies noe om.

## 5.8 KONSENTRASJONER AV OPPLØSTE STOFFER I EMBRYO

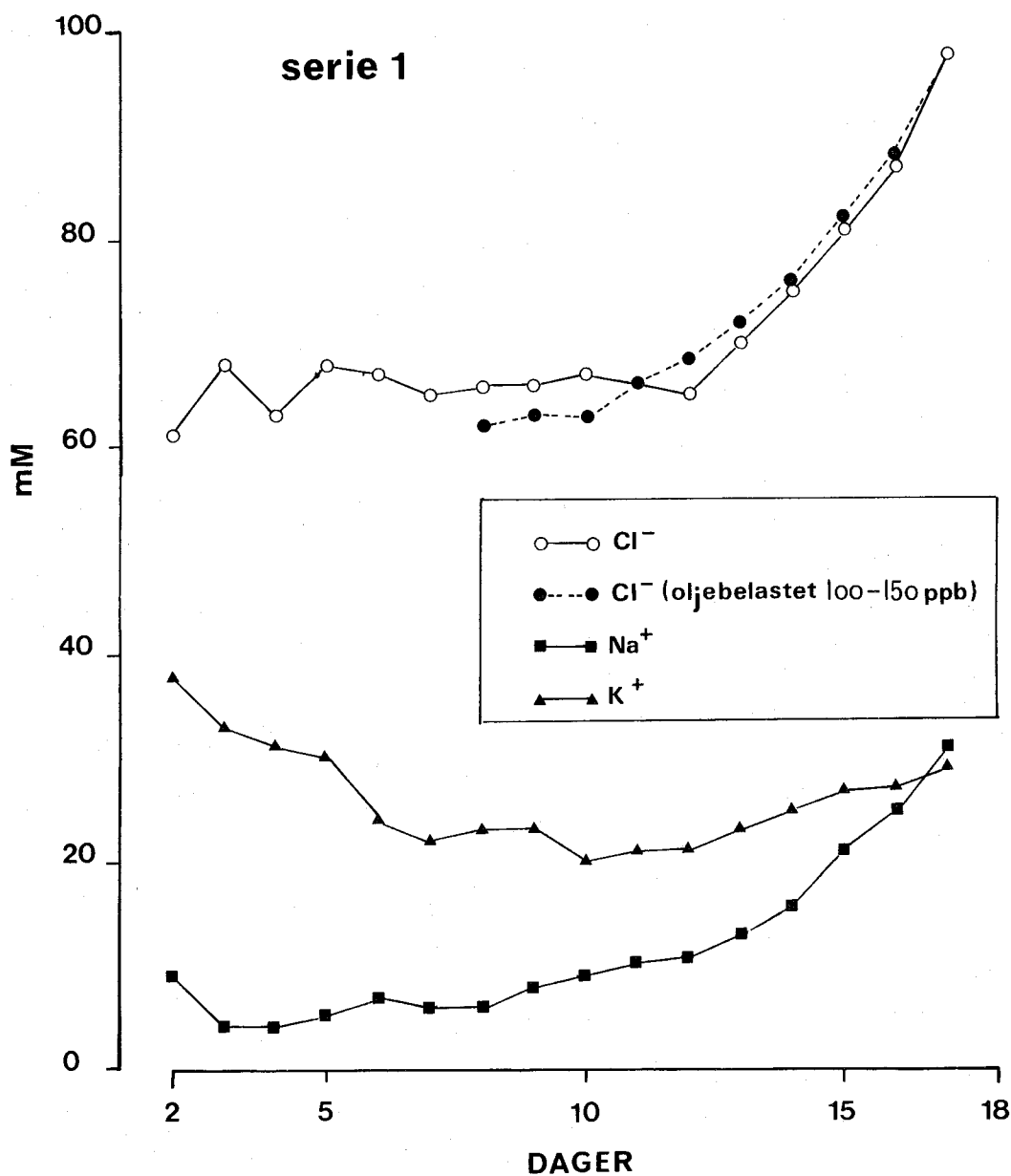
### 5.8.1 Uorganiske ioner

Konsentrasjonene av de uorganiske ionene  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Cl}^-$  er vist som funksjon av tid etter befruktning i figur 18 og 19. Hvert punkt på kurvene representerer et idéelt gjennomsnitt av 20 egg, fordi de kvantitative analysene er gjort på syre-ekstrakter av grupper á 20 egg. Konsentrasjonene i embryo av de ulike ionene er beregnet etter formelen:

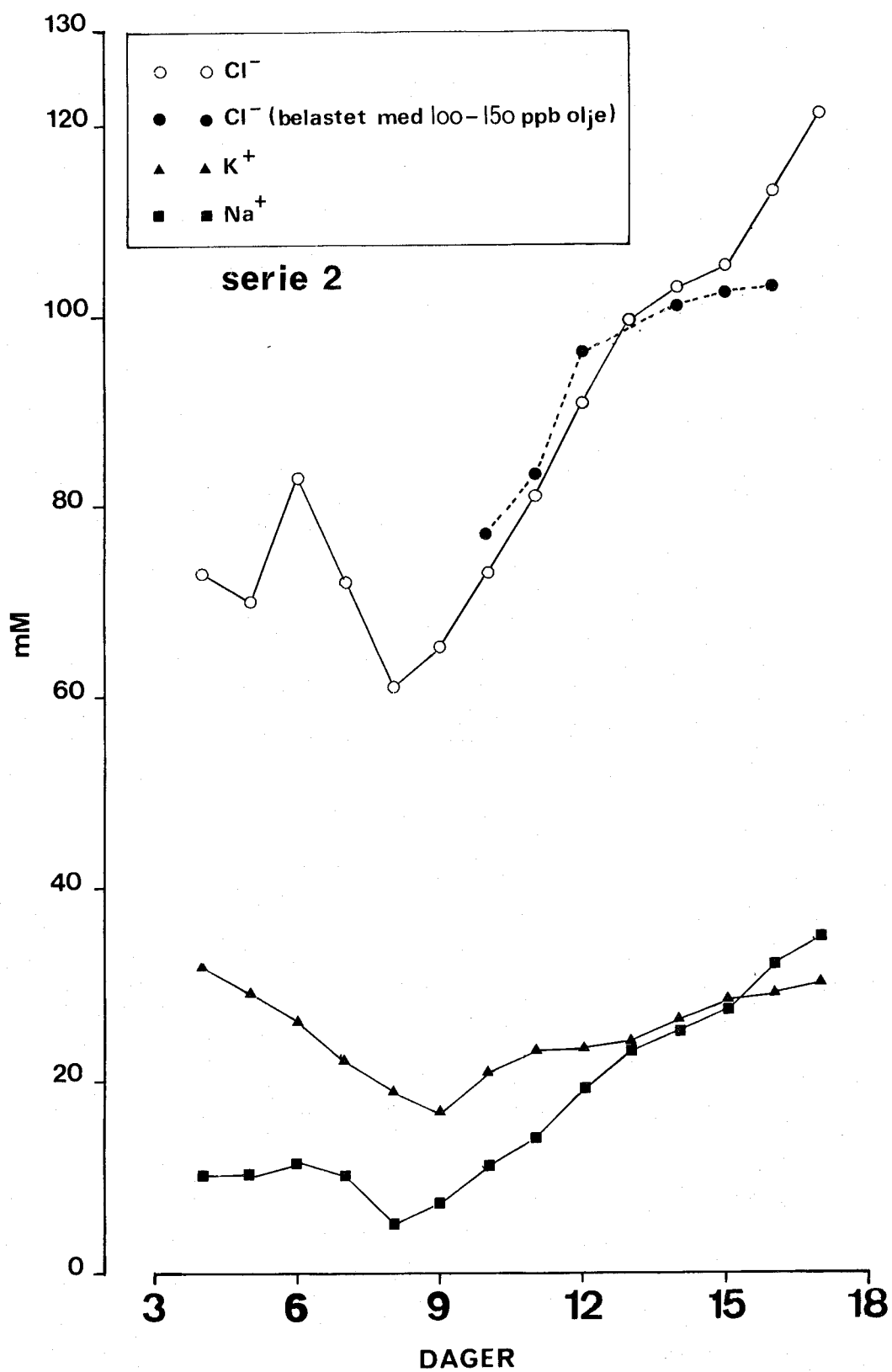
$$\text{Kons. i embryo} = \frac{\text{antall mol pr. vasket egg}}{\text{Vanninnhold i embryo}} \quad (14)$$

Konsentrasjonene av  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$  i oljebelastete egg er identiske med kontrollverdiene, og er derfor ikke vist i figurene.

Usikkerheten i de kvantitative ionanalysene er meget liten



Figur 18. Konsentrasjoner av Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> i torskembryo som funksjon av tid etter befruktning. Konsentrasjonene er gitt som mmol pr. liter vann i embryo.



Figur 19 . Konsentrasjoner av Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> i torskembryo som funksjon av tid etter befruktning. Konsentrasjonene er gitt som mmol pr. liter vann i embryo.

i forhold til usikkerheten i volumberegningene. Feilgrensene for ionekonsentrasjonene i embryo vil derfor være ca.  $\pm$  6,0%.

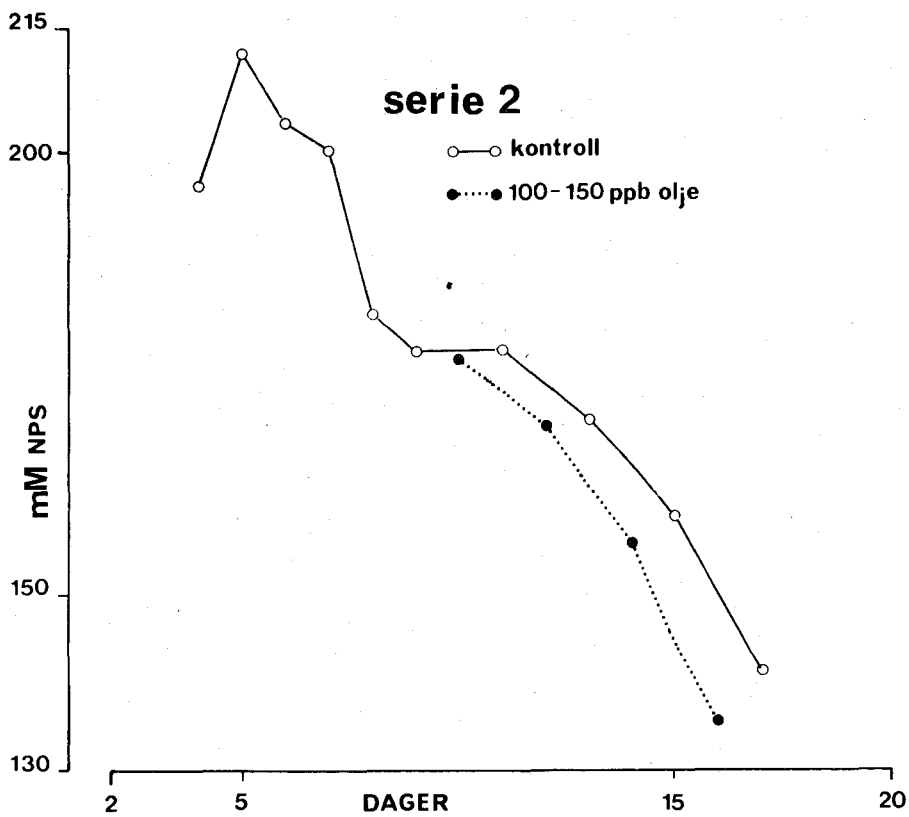
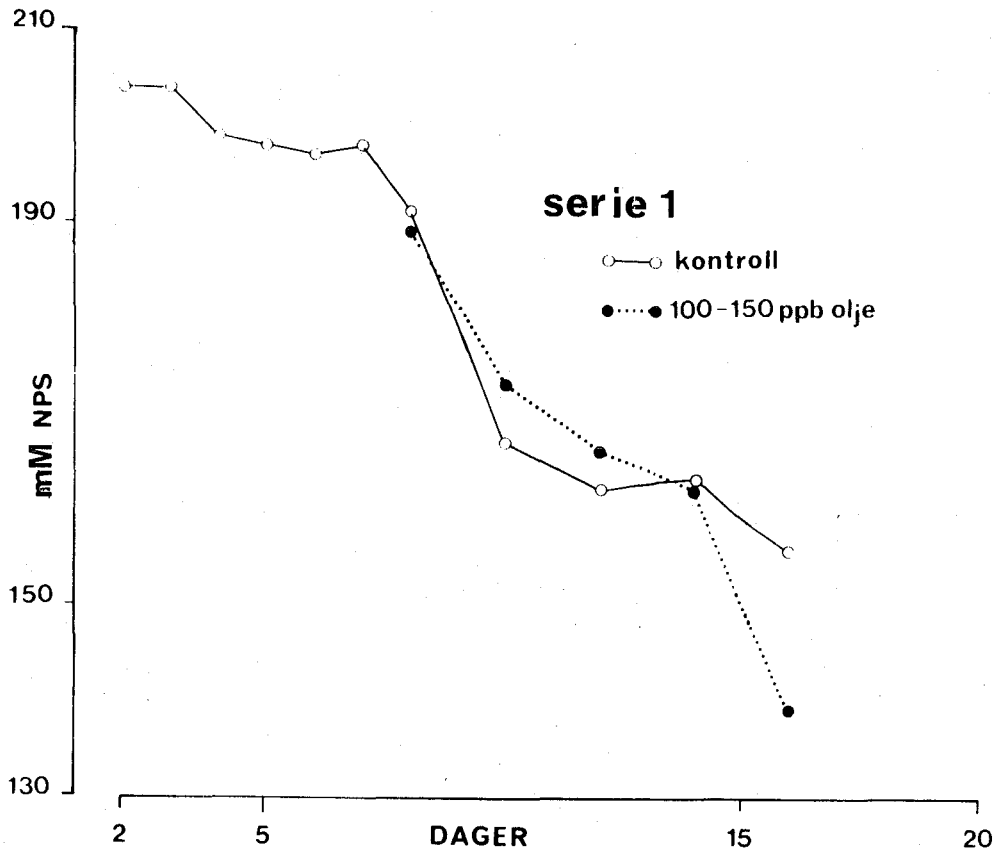
### 5.8.2 NPS

Konsentrasjonene av NPS i embryo beregnes utfra kvantitative NPS-analyser og vanninnhold i embryo på samme måte som for uorganiske ioner. Figur 20 viser konsentrasjoner av NPS i embryo som funksjon av tid (dager) etter befruktning. Forskjellene mellom kontroll og oljebelastet gruppe er ikke et resultat av usikkerheten i beregningene over vanninnhold i embryo. Den samme forskjellen mellom kontroll- og oljebelastet gruppe er vist i figur 21 som  $\mu\text{mol NPS/egg}$ .

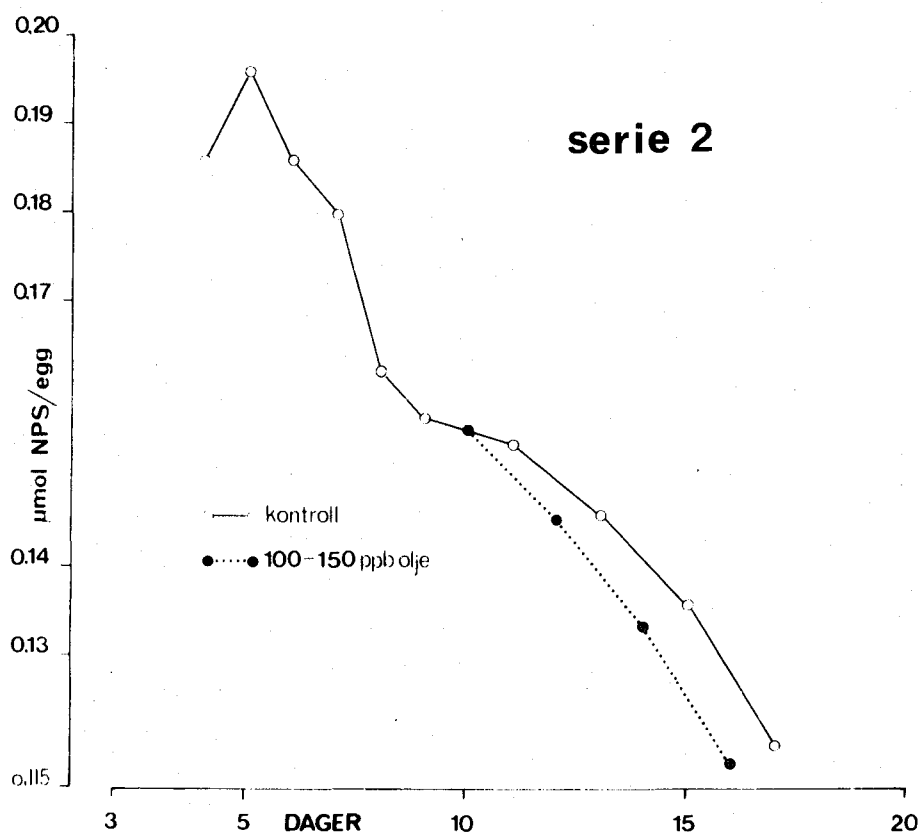
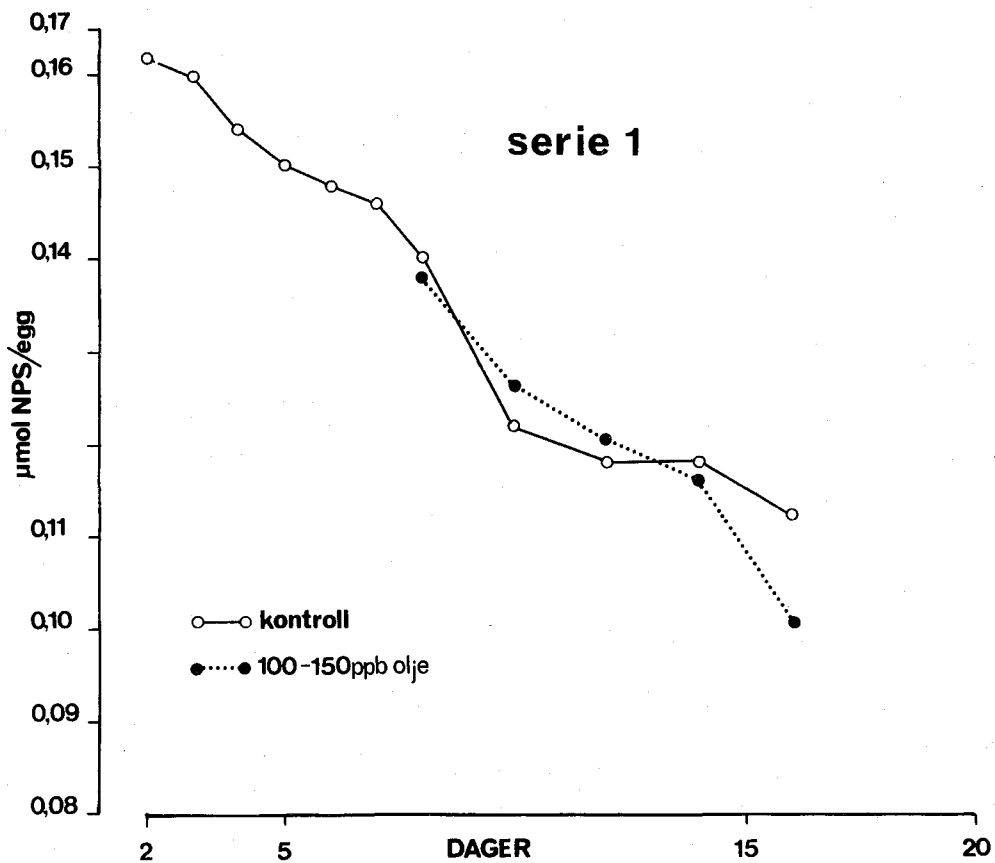
### 5.9 TORSKEEGGETS EGENVEKT

Figur 22 viser endringer i egenvekt av egg i serie 2. Disse resultatene kan av metodiske hensyn ikke tilegges samme nøyaktighet som for serie 3 (fig. 23). Selv om et relativt stort antall egg ( $n = 8$ ) ble benyttet i hver måling, ble ikke eggens spredning registrert i form av et standardavvik. Dette skyldes at kun én vannprøve ble tatt ut av kolonnen for hver måling. Denne prøven ble tatt i eggens flotasjonstygdepunkt. Figur 23 er derfor en metodisk forbedret utgave av figur 22, selv om disse eggene ikke ble oljebelastet. Dersom serie 3 (fig. 23) sammenliknes med serie 2 (fig. 22), er det et visst samsvar i forløp. Den sterke økningen i egenvekt i de siste dagene før klekking i serie 3, er sannsynligvis ikke kommet med i serie 2. Dette skyldes at egenvekstmålingene av metodiske problemer ble avsluttet ca. 2-3 dager før klekking.

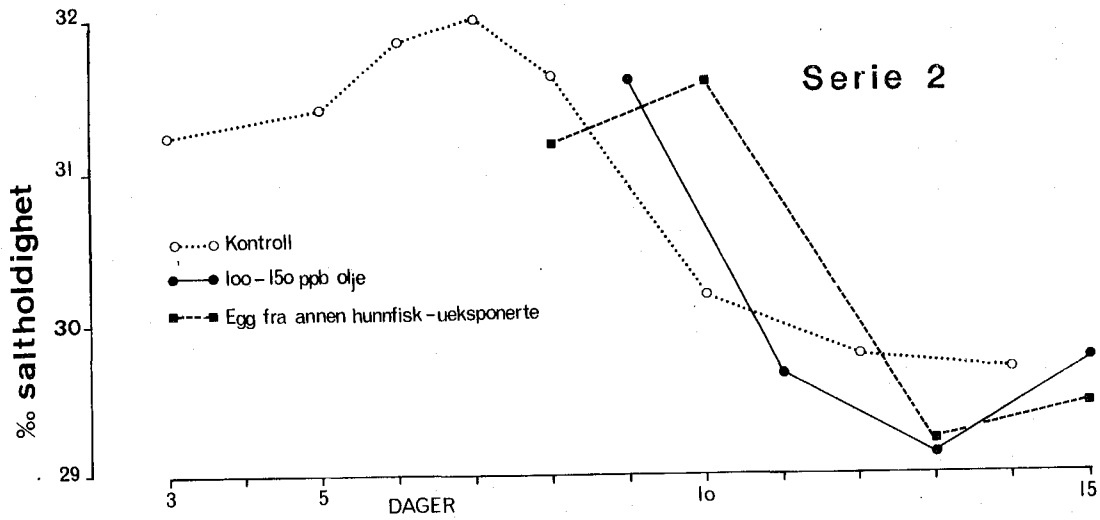




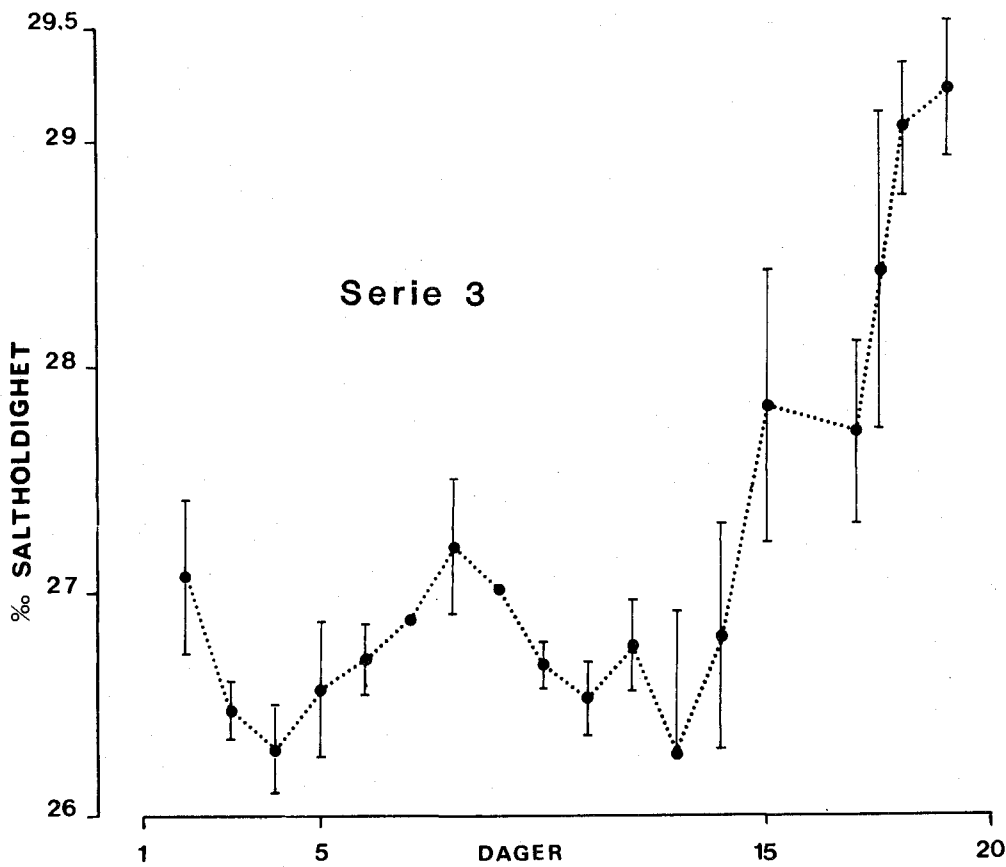
Figur 20. NPS-konsentrasjon i embryo. NPS er uttrykt som mmol pr. liter vann i embryo. Figuren viser endringer i NPS-konsentrasjon i løpet av embryogenesen.



*Figur 21 . NPS i torskeembryo. Figuren viser endringer i totalt NPS innhold i løpet av embryogenesen.*



Figur 22. Egenvekt av egg i serie 2. Figuren viser egenvekt av egg uttrykt i salinitet som funksjon av tid etter befruktning. Serien ble avsluttet 15 dager etter befruktning (ca. 2-3 dager før klekking).



Figur 23. Egenvekt av egg i serie 3. Figuren viser egenvekt av egg uttrykt i salinitet som funksjon av tid etter befruktning.

### 5.10 VANNPERMEABILITET

Fra beregningene over vanninnhold i embryo, går det fram at vanntapet ikke er konstant, men har et "knekkpunkt" omkring dag 7-10 etter befruktning. Tidspunktet for "knekken" varierer fra serie 1 til serie 2 noe som kan skyldes biologisk variasjon. Permeabilitetsberegningene er gjort for de perioder av embryogenesen der vanntapet viser et tilnærmet rettlinjert forløp ( se fig. 17 )

*Tabell 7. Volumendringer og beregnet filtrasjonspermeabilitet i løpet av 2 forskjellige utviklingsfaser til torskeembryo.*

Serie	Tidsrom (dager)	dV	Permeabilitet cm/sek
1	2-7	0,06 mm <sup>2</sup>	2,21 x 10 <sup>-7</sup>
1	8-17	0,02 -	0,55 x 10 <sup>-7</sup>
2	4-10	0,07 -	2,27 x 10 <sup>-7</sup>
2	11-17	0,02 -	0,65 x 10 <sup>-7</sup>

Gjennomsnittspereabiliteten for begge seriene er:

1,42 x 10<sup>-7</sup> cm/sek.

## 6. DISKUSJON

### 6.1 Endringer i plommeosmolalitet

Osmolaliteten i en løsning er et uttrykk for løsnings vannaktivitet, og kan kvantifiseres ved målinger av f. eks. smeltepunkt. Vannaktiviteten er en funksjon av temperatur, trykk og konsentrasjon av oppløste stoffer. Vandamptrykket til en væske er et relativt mål for vannaktiviteten, og beregnes empirisk av Raoult's lov (§ 4.4.3). I følge denne loven vil en løsnings vandamptrykk heves ved å øke det totale trykket. Dette vil ha konsekvenser for den reelle osmolaliteten i plommemassen. Ved å ta en prøve ut fra egget og dermed bringe den i likevekt med lufttrykket, vil den målte osmolaliteten kun gi et bilde av løsnings vannaktivitet ved dette trykket. Det har tidligere vært nevnt at det dannes et kolloidosmotisk overtrykk i PVR på grunn av kolloider frisatt fra de cortikale vesiklene under aktiveringsfasen. Det resulterende hydrostatisk trykk i egget har vært kvantifisert for flere arter (se s. 13). Dette medfører at det hydrostatisk trykk inne i egget vil være høyere enn i de omgivende vannmassene. I følge Raoult's lov vil dette tendere til å øke vannaktiviteten i plommemassen i forhold til mediet. I et egg som allerede på forhånd er strkt hypoosmotisk i forhold til det ytre mediet, vil et høyt kolloidosmotisk trykk i PVR være ugunstig. For et egg i ferskvann som er hyperosmotisk i forhold til mediet, vil et høyt kolloidosmotisk trykk i PVR tendere til å minske det reelle osmotiske stresset. Dette stemmer godt overens med rapporterte data for kolloidosmotisk trykk i PVR for salt- og ferskvannsararter (se s. 13).

I en artikkel fra 1981 (Davenport et al.) er osmotiske- og strukturelle forandringer i torskkeegget beskrevet. Resultatene fra osmomålingene fra dette arbeidet varierer noe fra resultatene i figur 12. Forskjellene kan imidlertid forklares ved å sammenlikne de benyttede metoder. Til osmolalitetmålingene benyttet Davenport seg av et "egg-squash" av hele egg. Dette medfører at det ikke er plommeosmolaliteten, men middelosmolaliteten av hele egget (PVF medregnet) som måles. I sine resultater har Davenport tatt hensyn til, og kompensert for et geometrisk beregnet PVR som antas å inneholde sjøvann. Resultatene viser at eggets osmolalitet ikke endres i løpet av embryogenesen.

I figur 12 er det et fall i plommeosmolalitet fra ca. 400 mOsm på de tidligste stadiene til ca. 300 mOsm like før klekking. Dersom disse verdien sees i sammenheng med med et økende PVR-volum, kan det til en viss grad forklare Davenport's verdier for "mean egg osmolality".

Verdiene for plommeosmolalitet i figur 12 kan ikke direkte overføres på embryo. Selv om det er lite sannsynlig, kan det ikke utelukkes at det finnes osmotiske gradienter mellom plommen og embryo per. se.

Dersom det antas at endringene i vanninnholdet i embryo skyldes et osmotisk vanntap, kan den teoretiske osmolaliteten i plommemassen egget ville hatt på slutten av eggstadiet beregnes. Disse beregningene forutsetter at det ikke forekommer osmoregulering og at membranene er idéelt semipermeable. Dessuten blir det som en tilnærming sett bort fra at den osmotiske koeffisienten til stoffer i løsning endres noe ved endret konsentrasjon. Den beregnete osmolaliteten vil i dette tilfellet være et direkte resultat av oppkonsentrering av osmo-

tisk aktive partikler. Den beregnete osmolaliteten finnes av formelen:

$$\text{Osm}_x = \text{Osm}_1 \times dV \quad (15)$$

der  $\text{Osm}_x$  er den beregnete osmolaliteten ved klekking,  $dV$  er endringene i embryo's vanninnhold fra 1. måledag til klekking, og  $\text{Osm}_1$  er plommeosmolalitet målt 1. måledag (1. måledag : Serie 1, dag 2 etter befruktning. Serie 2, dag 3 etter befruktning).

*Tabell 8. Teoretisk beregnet osmolalitet i embryo på grunnlag av osmotisk volumendring sammenliknet med målt plommeosmolalitet.*

Serie	Beregnet $\text{Osm}_x$	målt Osm	Differanse
1	435 mOsm	302 mOsm	133 mOsm
2	414 mOsm	302 mOsm	113 mOsm

Verdiene i tabell 8 viser at det er stor forskjell mellom den teoretisk beregnete, og den faktisk målte osmolaliteten i plommen. Dette indikerer sterkt at embryo har evnen til aktiv osmoregulering. Det jevne fallet i osmolalitet (fig 12) fra gyting til klekking tyder på at osmoreguleringsmekanismer er funksjonelle på et meget tidlig stadium i embryogenesen.

## 6.2 TORSKEEGGETS VANNBALANSE

### 6.2.1 Dannelse av PVR

Volumet av PVR er den viktigste parameteren i beregningene over vanninnholdet i embryo. Den målte økningen av PVR-volumet

skjer som følge av et vanntap fra embryo, fordi eggdiameteren ikke endres målbart i løpet av utviklingstiden (tabell 6). Det er beskrevet mange måter å beregne PVR-volum på. De fleste metodene går ut på å beregne PVR-volum på grunnlag av innførte eller naturlig forekommende stoffers konsentrasjon i et utvaskingsmedium. Et eksempel er fruktosemetoden som er benyttet i mine målinger av PVR-volum i egg i 1981-sesongen (serie 1 og 2). Volumberegninger med radioaktivt merkete "tracere" er også beskrevet, bl. a. av Potts & Eddy (1973). Det ble i disse forsøkene benyttet  $^{125}\text{I}$  som ble brakt i likevekt med PVF. Dessverre oppgir ikke forfatterne verdier for PVR-volum. Rene geometriske bestemmelser er også benyttet (Davenport et al., 1981). Det eksakte volumet av PVR vil med denne metoden være vanskelig å beregne på grunn av strukturen til embryo. Resultatene fra slike beregninger viser også avvikende verdier sammenliknet med beregninger av PVR-volum basert på en utvaskingsmetode.

Endringene i PVR-volum vil i praksis være omvendt proporsjonale med endringene i vanninnhold i embryo, fordi eggene endrer seg lite m.h.t. våtvekt. Endringene i tørrvekt vil ha liten betydning i det totale regnskapet.

### 6.2.2 Permeabilitet

I store trekk vil det energetiske kravet til osmo- og ioneregulering variere med raten av passiv vann- og ionetransport over epithelene. De energetiske kostnadene som er forbundet med å motvirke passive prosesser øker proporsjonalt med fluxhastighetene. 3 faktorer er bestemmende for det energiforbruk som er nødvendig for å opprettholde en osmotisk



gradient til det ytre mediet:

1. Gradienten mellom det ytre- og det indre miljø.
2. Overflatens permeabilitet.
3. Diffusjonsarealet.

En økning av hver av disse parametrene vil øke den totale utvekslingsraten. Torskeembryo har i forhold til andre organismer som opprettholder en stor osmotisk gradient til mediet, f.eks. en voksen teleost, et relativt stort overflate/volumforhold. For et embryo som er avhengig av begrensede energiresurser, ville det være uhensiktsmessig å forbruke en stor del av disse på å motvirke passive fluxer av vann og oppløste stoffer. For å minimalisere det osmotiske vanntapet har det pelagiske fiskeegget utviklet en, etter biologisk målestokk, nær impermeabel membran som omslutter plommen. Vitellinmembranen er i de første dagene etter befruktning den eneste osmotiske barriæren mellom plommen og det hyperosmotiske sjøvannet i PVR. Permeabilitetsforsøk med tritium-merket vann (THO) på rødspetteegg gir middelveier på ca.  $0,3 \times 10^{-6}$  cm/sek (Riis-Vestergaard 1981). Disse resultatene gir diffusjonspermeabiliteten, mens den beregnete permeabiliteten for torskeegg gir filtrasjonspermeabiliteten (også kalt osmotisk permeabilitet). I praksis viser det seg at filtrasjonspermeabiliteter gir noe høyere verdier enn diffusjonspermeabiliteter (Prosser, 1973). Grunnen til at rødspetteegg viser litt høyere vannpermeabilitet enn torskeeggene, kan være rødspetteeggens lavere overflate/volumforhold (rødspetteeggens volum er ca. 3X større enn torskeeggens). Dessuten gyter rødspetten vanligvis i vann med lavere saltholdighet enn tilfellet er

for torsk. En konsekvens av lavere osmolalitet i det ytre mediet er en nedsatt osmotisk gradient mellom det indre og ytre miljø. Dette kan medføre at kravet til lav permeabilitet endres.

Membranpermeabiliteter er i alle kjente biologiske systemer svært temperaturavhengige. Dette er også tilfellet for vitellinmembranen i torskeegg (Riis-Vestergaard pers. med.). Det er derfor sannsynlig at temperaturendringer i embryonalperioden kan forskyve eggets vann- og ionebalanse. Det gjenstår å undersøke om økt vannpermeabilitet over vitellinmembranen som følge av økt omgivelsestemperatur, står i samsvar med en tilsvarende forkortet embryonalperiode, slik at netto vanntap fra gyttig til klekking er den samme ved forskjellige inkubasjonstemperaturer.

### 6.3 SAMMENSETNING AV OPPLØSTE STOFFER

I løpet av embryogenesen endres konsentrasjonene av de ulike oppløste stoffene i embryo. Dannelse av vev og ekstracellulærveske er sannsynligvis delvis årsak til dette. I muskelvevet og plasma til en voksen fisk er det tilnærmet elektrokjemisk likevekt mellom  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Cl}^-$ . Torskeembryo avviker sterkt fra dette bildet. De kvantitative analysene av uorganiske elektrolytter viser et stort overskudd av  $\text{Cl}^-$  i forhold til  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$  (fig. 18 og 19). Dersom det i torskeembryo ikke finnes store transepitheliale elektriske potensialer, må det foreligge et kation annet enn  $\text{Na}^+$  eller  $\text{K}^+$  for å oppveie anionoverskuddet som målingene viser.

På de tidligste stadiene etter befruktning kan innholdet i egget betraktes som intracellulært. Plommemassen er i denne

antatt å være i elektrokjemisk likevekt med cellens cytoplasma. Med utgangspunkt i denne modellen er det naturlig å sammenlikne de målte konsentrasjonene av  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$  i embryo, med rapporterte verdier for de samme ionene i intracellulær-væsken til en voksen fisk (tabell 9).

*Tabell 9. Konsentrasjoner av  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$  i torskeembryo i 2 ulike utviklingstrinn, sammenliknet med intra- og ekstracellulær-væskene til voksen fisk.*

	$\text{Na}^+$ (mM)	$\text{K}^+$ (mM)
Tidlige egg (100% intracellulært)	10	40
Egg like før klekking	40	30
Intracell. hos voksen fisk <sup>1)</sup>	19	171
Ekstracell. hos voksen fisk <sup>2)</sup>	160	5

1) Parry, 1965.      2) Eliassen et al., 1960.

En sammenlikning mellom tidlige egg og intracellulærveske hos voksen fisk, viser at  $\text{Na}^+$  konsentrasjonene er relativt like, mens  $\text{K}^+$  konsentrasjonene i intracellulærvesken er mer enn 4X høyere enn i embryo. Den lave konsentrasjonen av  $\text{K}^+$  i embryo sammenliknet med intracellulærvesken til en voksen fisk, kan skyldes et passivt tap av  $\text{K}^+$  til omgivelsene under den permeable fasen like etter gyting. Dette vil isåfall føre til et elektrokjemisk disekvilibrium som må kompenseres for med en influx av et annet kation (f.eks.  $\text{Mg}^{2+}$  som har en molar konsentrasjon i sjøvann på ca. 50 mM). Et slikt fall i  $\text{K}^+$ -konsentrasjon er vist å være tilfellet for kveiteegg (Riis-vestergaard pers. med.)

Frie aminosyrer har lenge vært betraktet som viktige effektorer i intracellulær volumregulering. Hos organismer som er osmokonformere, har ekstracellulærvæsken samme osmolalitet som det ytre mediet. Dette medfører at cellene i vevet utsettes for en osmotisk belastning tilsvarende endringene i det omgivende mediet. Det er vist at intracellulær regulering av aminosyrekonsentrasjon opprettholder isosmotiske forhold mellom intra- og ekstracellulærvæskene slik at cellenes volum og vanninnhold ikke endres vesentlig (Fugelli, 1967). Denne reguleringsmekanismen kalles isosmotisk intracellulær regulering, og finnes først og fremst hos marine evertebrater (Gilles, 1975), men er også påvist hos euryhaline teleoster (Fugelli, 1967).

Frie aminosyrer som osmotiske effektorer har den fordel framfor uorganiske ioner at de kan foreligge i høye konsentrasjoner i cellen uten å ha toksiske effekter.

Det er i denne sammenheng interessant å finne at torskeembryo, som er en osmoregulator, inneholder NPS i konsentrasjoner som svarer til omtrent halvparten av den totale mengden osmotisk aktive partikler (fig. 20). De fleste aminosyrene har sitt iso-elektriske punkt på den sure siden av nøytralpunktet (Lehninger, 1975), og vil derfor foreligge som kationer ved pH under 7,0. Før pH-målinger og kvalitative aminosyreanalyser er foretatt, er det ikke mulig å si noe om hvilke innflytelser frie aminosyrer vil ha på den elektrokjemiske likevekten i torskeembryo.

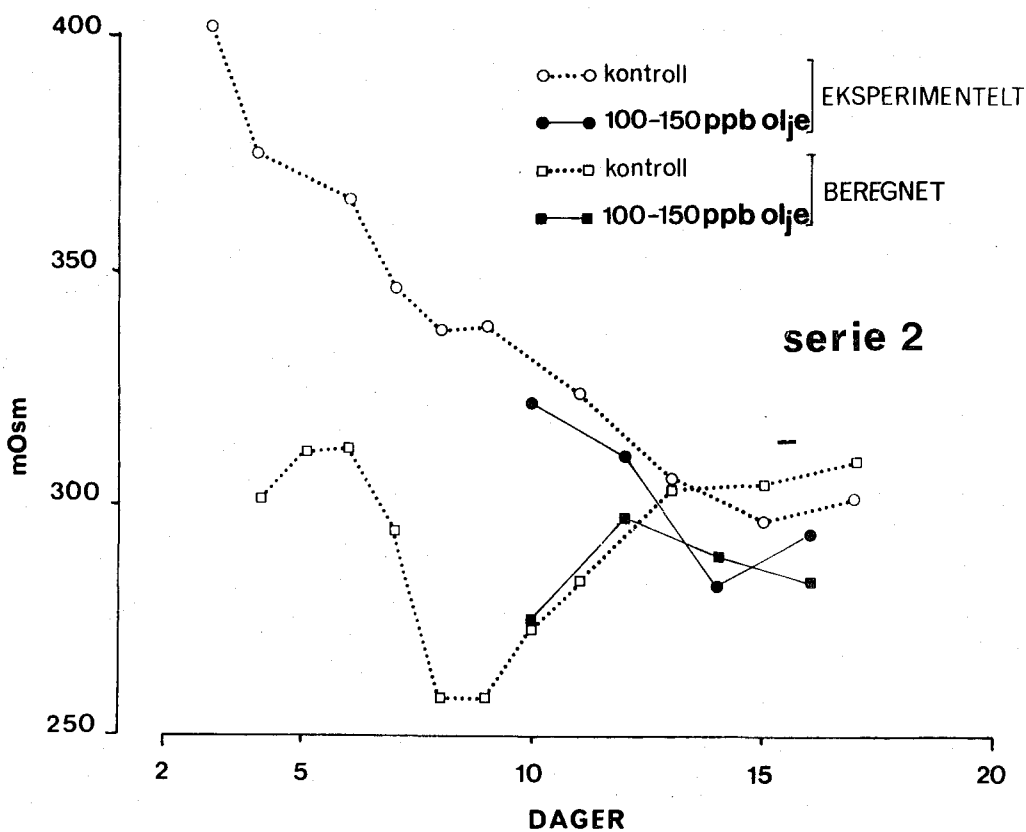
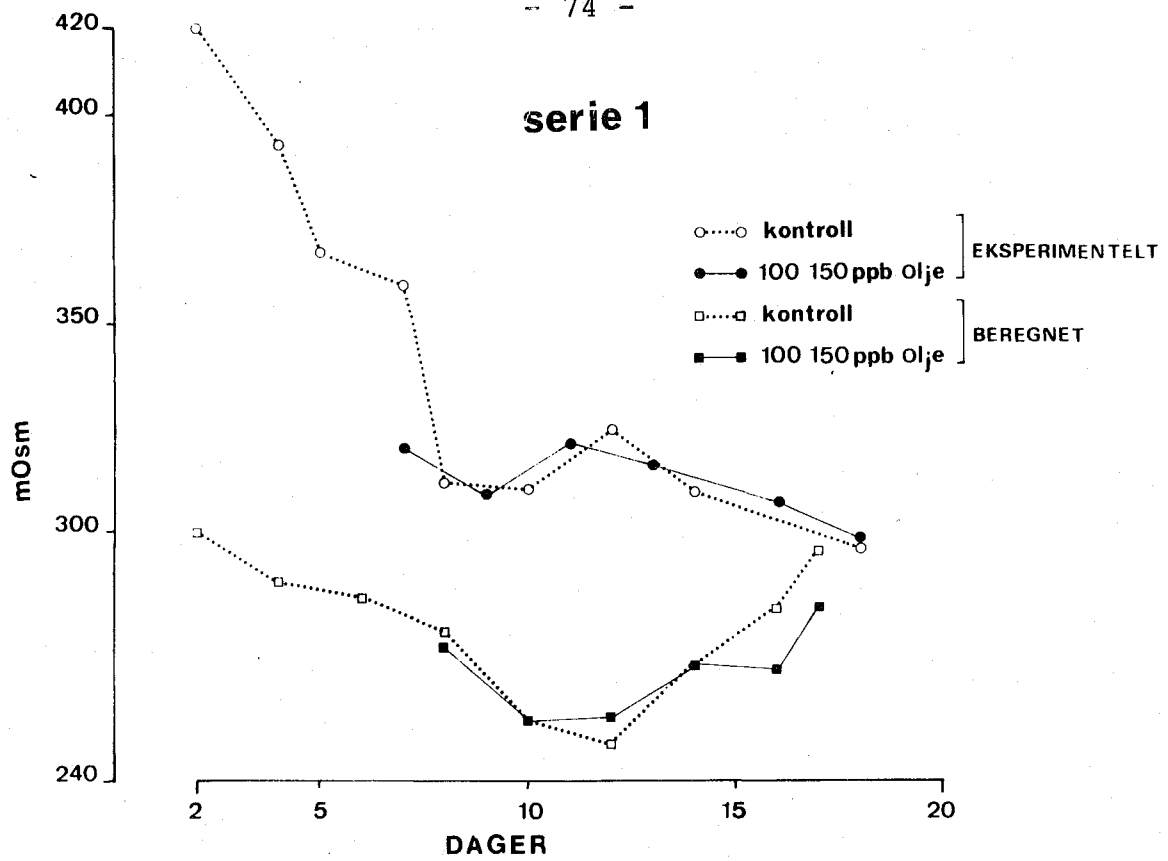
Det ble nevnt innledningsvis at også andre molekyler enn frie aminosyrer gir fargereaksjon med ninhydrin. Bl. a. gjelder dette  $\text{NH}_4^+$ . Det er i oppdrifts-sammenheng beskrevet arter som benytter eksklusjon av tunge ioner ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ )

og erstatter dem med lettere (bl.a.  $\text{NH}_4^+$  og  $\text{H}^+$ ). I dinoflagellaten Noctiluca miliaris er det målt intracellulære konsentrasjoner av  $\text{NH}_4^+$  på 58,8 mM (Kesseler, 1966). Denton (1971) beskriver oppdriftsmekanismen til en blekksprutart som er basert på et stort volum isoton væske der kationene til en viss grad er erstattet med ammonium. Dersom torskembryo inneholder frie aminosyrer ville disse bli registrert som NPS. Det er derfor en teoretisk mulighet for at de målte NPS-konsentrasjonene i tillegg til frie aminosyrer inneholder ammonium. Ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) er det vanligste ekskresjonsproduktet hos vannlevende dyr (ammonicotelisme). Dette ekskresjonsproduktet krever ikke spesielle ekskresjonsorganer fordi det på grunn av sin høye løselighet i fett, lett diffunderer over biologiske membraner.  $\text{NH}_4^+$  og  $\text{NH}_3$  er i pH-avhengig likevekt med hverandre. I sure løsninger vil denne likevekten forskyves mot en høyere konsentrasjon av  $\text{NH}_4^+$ . Ammoniumionet er lite løselig i fett, og kan lett fanges i en elektrokjemisk "felle" ved aktiv sekresjon av kationer slik at  $\text{H}^+$  holdes tilbake og pH synker (Denton, 1971). Akkumulering av  $\text{NH}_4^+$  kan være årsaken til det målte  $\text{Cl}^-$  overskuddet. Flere innvendinger kunne reises mot en slik hypotese; bl. a. vil et slikt system kreve nedsatt pH. For dinoflagellaten Noctiluca miliaris betyr en  $\text{NH}_4^+$ -konsentrasjon på 58,8 mM en senkning av pH intracellulært til 4,35. Tilsvarende hadde sannsynligvis vært lethalt for torskembryo. Det er heller ikke påvist aktiv sekresjon av kationer i torskembryo. Om den lave  $\text{Na}^+$ -konsentrasjonen i embryo skyldes aktiv sekresjon eller impermeabilitet for dette ionet er uvisst. Resultatene fra NPS-målingene (fig. 20) viser at det skjer en betydelig nedgang i embryo's NPS-konsentrasjon. På bakgrunn av én-kammer prinsippet (se pkt. 4.4.2), kan fallet i NPS-

konsentrasjon settes i forbindelse med endringene i plomme-osmolalitet. Det må her presiseres at osmolalitet er målt på plommemasse, mens konsentrasjon av NPS er målt i et homogenat av hele egg. I dette homogenatet finnes NPS fra intra- og ekstracellulærvæsken, og fra plommemassen oppløst.

#### 6.4 OSMOTISK REGNSKAP

I hvilken grad et oppløst stoff påvirker vannets kolligative egenskaper, bestemmer stoffets osmotiske koeffisient. Denne koeffisienten, som er avhengig av løsnings konsentrasjon, beregnes empirisk ved f.eks. osmometri. På grunnlag av de målte konsentrasjonene av uorganiske ioner og NPS i embryo, kan deres osmotiske koeffisienter bestemmes utfra tabellverk (Internat. Critical Tables vol. 4, s. 258). Den totale osmolaliteten disse stoffene sammenlagt vil utgjøre er vist i figur 24. De osmotiske koeffisientene til uorganiske ioner og NPS er bestemt til henholdsvis 0,9 og 1,0. Osmolaliteten som disse stoffene sammen utgjør, ligger gjennom hele embryogenesen fra 50 - 100 mOsm lavere enn den målte, bortsett fra de siste 2-3 dagene før klekking da den målte og den beregnete osmolalitet nærmer seg hverandre. Disse beregningene tyder på at det finnes uidentifiserte oppløste stoffer i tildels høy konsentrasjon i embryo. Like før klekking ser det ut til at de osmotisk aktive partiklene i torskembryo utgjøres av  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  og NPS.



Figur 24. Observert og beregnet osmolalitet. Den observerte osmolaliteten er målt på plommemasse direkte. Den beregnede osmolaliteten er summen av det osmotiske trykket til  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  og NPS. Se teksten for videre diskusjon.

### 6.5 ENDRINGER I EGENVEKT

For å holde seg i flotasjonslikevekt med sjøvann har den voksne torsk utviklet en gassfylt svømmeblære. Uten dette organet ville fisken på grunn av sitt høye proteininnhold og velutviklede beinstruktur, måtte svømme aktivt for ikke å synke. Dette er tilfellet for fisk som har fått svømmeblæren punktert. Torskeembryo har hverken svømmeblære eller evne til aktiv svømming. Det som gir egget den nødvendige oppdrift er det høye vanninnholdet i plommemassen. I tillegg til plommen har larver fra pelagiske egg utviklet store sub-dermale rom fylt av hypoosmotisk væske (Shelbourn, 1956). Shelbourn påpeker at disse strukturene bidrar til oppdrift ikke bare hos larver, men også allerede på embryonalstadiet. I løpet av embryogenesen skjer det et kontinuerlig tap av vann fra embryo til omgivelsene (fig. 17). Samtidig vokser embryo og øker sin spesifikke vekt. Disse prosessene skulle teoretisk sett øke eggets spesifikke vekt og forskyve nøytral flotasjon mot en høyere saltholdighet. Figurene 22 og 23 viser at dette ikke er tilfellet. Bortsett fra de helt siste dagene før klekking, er det bare små variasjoner i eggets spesifikke vekt. Den økologiske betydningen av økt spes. vekt like før klekking er usikker.

Dersom endringene i egenvekt er et direkte resultat av endret osmolalitet/volum kunne dette vises ved en korrelasjonsanalyse. På grunnlag av de eksperimentelle data ble egenvekt stilt opp mot osmolalitet/volum. Denne testen ga en korrelasjonskoeffisient på 0,55, som er ensbetydende med at det ikke er noen sammenheng mellom parametrene.



## 6.6 OLJEBELASTNING

Kromatografiske analyser har vist at ca. 70% av den vannløselige fraksjonen av Ekofisk råolje består av lavmolekylære aromatiske forbindelser som benzener, toluener og xylener. Disse forbindelsene skulle utfra sin lave molekylvekt (100 - 150 Dalton) være istand til å passere gjennom porene i chorion. Selv om oljekomponenter er påvist å bli oppkonsentrert i embryo (Solbakken pers. med), synes dette utfra de foreliggende resultatene ikke å påvirke embryo's vann- og ionebalanse. NPS-analysene derimot, tyder på at konsentrasjonene av frie aminosyrer er lavere i oljebelastete egg enn i kontrollgruppene, uten at dette har observerbare effekter på optimal embryonalutvikling eller klekking.

Selv om undersøkelsene i denne oppgaven indikerer at torskeembryo har høy toleranse overfor en akutt oljebelastning, må dette likevel sees i sammenheng med forsøkenes omfang. Det er f.eks. ikke undersøkt mulige langtidseffekter av oljen. Heller ikke er oljebelastning under forskjellige temperaturforhold undersøkt. For derfor å få full insikt i oljens effekter på torskeembryo's evne til å osmoregulere, er det nødvendig med undersøkelser av langt større omfang enn det som her er gjort.

Det ble registrert tildels stor bakterievekst på chorion til de oljebelastete eggene i tiden før klekking. Dette medførte at eggene hadde tendens til å bli "fanget" i overflatehinnen til inkubasjonsmediet. Bakterieveksten syntes å være begrenset til chorion, og negative effekter på embryo's utvikling ble ikke registrert.

## 7. KONKLUSJON

Fra det foreliggende arbeidet trekkes det følgende konklusjoner:

1. Torskeembryo er gjennom hele embryogenesen sterkt hypoosmotisk til sjøvannet. For å opprettholde et hypoosmotisk indre miljø, har embryo utviklet evnen til å osmoregulere på et meget tidlig stadium i embryogenesen.
2. Konsentrasjonene av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  i embryo er gjennom hele embryogenesen lavere enn i sjøvannet. Om dette skyldes aktiv ioneregulering eller lav permeabilitet er ikke kjent.
3. Embryo inneholder høy konsentrasjon av NPS. Under embryogenesen faller NPS-konsentrasjonen med ca. 50%. NPS utgjør en vesentlig del av de osmotisk aktive partiklene i embryo. Fallet i NPS finnes igjen som et fall i osmolalitet.
4. De siste dagene før klekking endres eggens spesifikke vekt uten at dette kan settes i sammenheng med noen av de andre fysiologiske parametrene.
5. Embryo's vannpermeabilitet er meget lav i biologisk målestokk. Dette kan være årsaken til det lave vanntapet og de små endringene i ionekonsentrasjon.
6. Plommemassen ser ut til å ha 3 funksjoner:
  - a) Lager for næringsstoffer.
  - b) Vannreserve til å erstatte det osmotiske vanntapet.
  - c) Flytelegeme for å sikre adekvat oppdrift i sjøvannet.
7. Eksponering av egget for sub-lethale konsentrasjoner av Ekofisk råolje synes ikke å påvirke embryo's evne til osmoregulering eller normal embryonalutvikling.

REFERANSELISTE

ANDERSON, J.W. (1979). An assessment fo knowledge concerning the fate and effects of petroleum hydrocarbons in the marine environment. I: Marine pollution: functional responses (Eds. Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P., Vernberg, F.J.) Academic Press, New York, s. 3-21.

BLAXTER, J.H.S. (1969) Development of eggs and larvae s.178-252. I: Fish Physiology, vol 3. Eds: Hoar, W.S. & Randall, D.J. Academic Press, New York and London.

BRUN, T. og MORILD, E. (1977) (Eds.) Fysikalsk kjemi II. Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen.

BULL, H.B. (1971) (Ed.) An Introduction to Physical Biochemistry. F.A. Davis Company, Philadelphia, Pa. 469 ss.

DAVENPORT, J., LØNNING, S., KJØRSVIK, E. (1981). Osmotic and structural changes during early development of eggs and larvae of the cod, Gadus morhua L. J. Fish Biol 19, 317-331.

DENTON, E.J. (1971). Examples of the use of active transport of salts and water to give buoyancy in the sea. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 262, 277-287.

EDDY, F.B. (1974). Osmotic properties of the perivitelline fluid and some properties of the chorion of Atlantic salmon eggs (Salmo salar). J. Zool., London. 174, 237-243.

ELIASSEN, E., LEIVESTAD, H. og MØLLER, D. (1960). The effect of low temperatures on the freezing point of plasma and the potassium/sodium ratio in the muscels of some boreal and subarctic fishes. Acta Universitas Bergensis 14, 1-24.

FRIDGEIRSON, E. (1978). Embryonic development of the five species of gadoid fishes in the Icelandic waters. Rit Fiskideilar 5, no. 6.

FUGELLI, K. (1967). Regulation of cell volume in flounder (Pleuronectus flesus L.) erythrocytes accompanying a decrease in plasma osmolarity. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 253-260.

GILLES, R. (1975) Mechanisms of ionic and osmoregulation. I: *Marine Ecology*, (Ed. Kinne, O.) ss. 259-347. Wiley Interscience, London- New York.

GOLDRACE, R.J. (1968). The effects of detergents and oils on the cell membrane. *Fld. studies* 2, 131-138.

GRAHL-NIELSEN, O. (1978). The Ekofisk Bravo blowout: Petroleum hydrocarbons in the sea. I: Proceedings of the 1978 Oil Spill Conference (Prevention, Behavior, Control, Cleanup). American Petroleum Inst., U.S. Coast Guard, Washington D.C. s. 629-632.

GUGGINO, W. (1980). Water balance in the embryos of Fundulus heteroclitus and Fundulus bermudae in sea water. *Am. Journ. of Physiol.* 238 (I), R36-R47.

HAGSTRØM, B.E. og LØNNING, S. (1968). Electron microscopic studies of unfertilized eggs from marine teleosts. *Sarsia* 33, 73-80.

HOLLIDAY, F.G.T. (1965). Osmoregulation in marine teleost eggs and larvae. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest.* 10, 89-95.

KAO, C.Y. & CHAMBERS, R. (1954). Internal hydrostatic pressure of the Fundulus egg. 1. The activated egg. *J. Exp. Biol.* 31, 139-149.

KESSELER, H. (1966). Beitrag zur Kenntnis der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Zellsaftes von Noctiluca miliaris. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven* 2, 357-368.

KERR, J.G. (Ed) (1919) Text-book of embryology, vol. II. Macmillan and co., Limited St. Martin's street, London. 591 ss.

KEYS, A.B. & WILLMER, E.N. (1932) "Chloride secreting cells" in the gills of fishes, with special reference to the common eel. *J. Physiol.* 76, 368-378.

KROGH, A., KROGH, A. & WERNSTEDT, C. (1938). The salt concentration in the tissues of some marine animals. *Scand. Arch. Physiol.* 80, 214-222.

KULKA, R.G. (1956). Colorimetric estimation of ketopentoses and ketohexoses. *Biochem. J.* 63, 542-548.

LANGE, R. (1963). The osmotic function of amino acids and taurine on the mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 10, 173-179.

LEHNINGER, A.L. (1975) (Ed.). *Biochemistry*. 2. utg. Worth Publishers, Inc. 1104 ss.

LEIVESTAD, H. (1971). Osmotic and ionic conditions in pelagic teleost eggs. *Acta Physiol. Scand.* 82, 12 A.

LOEFFLER, C.A. (1971) Water exchange in the pike egg. *J. Exp. Biol.* 55, 797-811.

LØNNING, S. (1972). Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs with special reference to the chorion. *Sarsia* 49, 41-48.

M'INTOSH, W.C. & PRINCE, E.E. (1890). On the development and life histories of the teleostean. *Trans. R. Soc. Edinb.* 35, 665-946.

MOORE, S. & STEIN, W.H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176, 367-388.

PARRY, G. (1965). Osmotic adaption in fishes. *Biol. rev.* 41, 392-444.

- POTTS, W.T.W. & EDDY, F.B. (1973). The permeability to water of the eggs of certain marine teleosts. *J. Comp. Physiol.* 82, 305-315.
- POTTS, W.T.W. & PARRY, G. (1964). Osmotic and ionic regulation in animals. Oxford: Pergamon Press, s.423
- POTTS, W.T.W. & RUDY, P.P. (1968). Water balance in the egge of Atlantic Salmon salar. *J. Exp. Biol.* 50, 223-237.
- PRAGER, D.J. & BOWMAN, R.L. (1963). Freezing-Point Depression: New method for measuring ultramicro quantities of fluids. *Science* vol. 142, 237-237.
- PROSSER, C.L. (1963) (Ed.). *Comparative Animal Physiology*. W.B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto. 966 ss.
- RASMUSSEN, R.E.H. (1968) (Ed.). *Elementær måleteori*. 5. Udg.
- RICE, S.D., JEFFREY, W., SHORT, J.W. & KARINEN, J.F. (1977). fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine organisms and ecosystems. Pergamon Press.
- RIIS-VESTERGAARD, J.J. (1981) Vandbalance hos rødspetteæg. Spesiale-oppgave i zoofysiologi ved Aug. Krog Inst., København universitet.
- RIIS-VESTERGAARD, J.J. (1982). Water and salt balance of Halibut eggs and larvae. (manus.).
- RUDY, P.P. & POTTS, W.T.W. (1969). Sodium balance in the eggs of the Atlantic salmon, Salmo salar. *J. Exp. Biol.* 50, 239-246.
- SAKAI, Y.T. (1961). Method for removal of chorion and fertilization of the naked egg in Oryzias latipes. *Embryologia* 5, 357-368.
- SHELBOURNE, J.E. (1965). The effect of water conservation on the structure of marine fish embryos and larvae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 35, 275-286.

STEHR, C.M. & HAWKS, J.W. (1979). The comparative ultra-structure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, Platichthys stellatus, and pink salmon, Oncorhynchus gorbuscha. Cell Tissue Res. 202, 347-356

SVENSSON, H. (1960). Zonal density gradient electrophoresis. I: Laboratory manual in analytical methods in protein chemistry. (Eds: Alexander, P. & Block, R.J.). Vol. 1. s. 195-217. Pergamon Press, Oxford.

TILSETH, S. og SOLBERG, T.S. (1981). Effekter av olje på torskeegg og larver. FOH- årsrapport 1980.

YAMAMOTO, T.O. (1961). Physiology of fertilization in fish eggs. Int Rev. of Cyt. XII 1961, s. 361-402.

ZOTIN, A.I. (1958). The mechanism of hardening of the salmonid egg membrane after fertilization or spontaneous activation. J. Embryol. Exp. Morph. 6, 546-568.

