

# En intraspesifikk studie av oksygenopptak, hypoksitoleranse, erythrocyttstørrelse og genomstørrelse hos karuss (*Carassius carassius*)

Bendik Kjeverud Erdal



BIOS5960 - Masteroppgave  
Marinbiologi og limnologi  
60 studiepoeng

Institutt for biovitenskap  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

1.6.2020

## Sammendrag

Karpefisken karuss (*Carassius carassius*) har en unik evne til å tolerere svært lave oksygennivåer, og kan leve i helt anoksiske tilstander over flere måneder under isdekke. Dens unike egenskaper innebærer en svært høy hemoglobinaffinitet til O<sub>2</sub>, evnen til å remodelere gjellefilamenter og dermed øke respirasjonsoverflaten opptil 7.5 ganger, og etanolproduksjon som et biprodukt av anaerob metabolisme for å forhindre laktat-selvforgiftning. Det er gjort mye forskning på karussens mekanismer, men få analyser er gjort for å belyse intraspesifikke forskjeller mellom populasjoner med bakgrunn i forskjellige miljøbetingelser.

I denne studien er to populasjoner av karuss sammenlignet, for å se om oksygenopptak, MO<sub>2</sub> og hypoksitoleranse, målt ved PO<sub>2Crit</sub>, kan variere intraspesifikt. En populasjon kommer fra det høy-produktive og svært hypoksiutsatte Tjernsrudtjern, og den andre populasjonen kommer fra det mindre produktive og mer oksygenrike Svartkulp. MO<sub>2</sub> og PO<sub>2Crit</sub> ble undersøkt ved intermitterende respirometri, samt ble erytrocyttstørrelse og genomstørrelse undersøkt ved flowcytometri, for å undersøke hvorvidt dette er egenskaper som kan påvirke MO<sub>2</sub> og PO<sub>2Crit</sub>.

Resultatene viste en signifikant forskjell i rutine metabolsk rate (RMR), standard metabolsk rate (SMR) og kritisk oksygennivå (PO<sub>2Crit</sub>). Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i erytrocyttstørrelse eller genomstørrelse. Dette indikerer at karussen fra Tjernsrudtjern, som hadde lavere RMR, SMR og PO<sub>2Crit</sub>, som følge av sin høyere eksponering til lave oksygennivåer har en varende tilpasning til hypoksi, og en mer effektiv regulering av oksygenopptak enn karussen fra Svartkulp.

## Abstract

The crucian carp (*Carassius carassius*) have a unique ability in tolerating very low levels of oxygen and can live in complete anoxic environments over several months beneath ice covered lakes. These unique traits is a result of having a high level of hemoglobin affinity to oxygen, the ability to remodel the filaments in its gills and thus increase its respiration surface up to 7.5 times and production of ethanol as a byproduct of anaerobic metabolism to prevent lactate poisoning. Several studies have examined the crucian carps methods for hypoxia and anoxia tolerance, but few have done experiments to illuminate potential intraspecific differences between populations originating from varying environmental conditions.

In this study two populations of crucian carp were compared to examine whether  $\dot{M}O_2$  and the hypoxia tolerance might vary between populations. One of the populations in this study was collected from the high-productive, hypoxia exposed lake Tjernsrudtjern. The other populations were collected from the less productive and but oxygen rich lake Svartkulp.  $\dot{M}O_2$  and  $PO_{2crit}$  was examined using intermittent respirometry. Erythrocyte size and genome size was examined by flowcytometry to illuminate whether these factors might affect  $\dot{M}O_2$  and  $PO_{2crit}$  levels in this fish species.

The results of the study showed a significant difference in the routine metabolic rate (RMR), the standard metabolic rate (SMR) and the critical oxygen levels ( $PO_{2crit}$ ). There were no significant differences in erythrocyte or genome size. These results indicate that crucian carp which originated from Tjernsrudtjern with lower RMR, SMR and  $PO_{2crit}$  levels due to its high exposure to low oxygen levels had a lasting adaption to hypoxia, and could regulate its oxygen uptake more effectively than its counterpart fish from Svartkulp.

## **Anerkjennelser**

Jeg vil gjerne uttrykke min takknemlighet til mine veiledere gjennom de siste to årene. Takk for tilliten dere viste ved å ta meg opp som masterstudent. Jeg setter stor pris på all tid og energi gitt til å veilede meg gjennom oppgaven, til tross for både pandemi, nedstengning av lokaler og faglige utfordringer.

Takk til min hovedveileder Dag Olav Hessen, for veiledning under feltarbeid og innspill til metoder. Å ro ut i en gummibåt for å ta vannprøver i strålende solskinn er slett ingen verst måte å tilbringe arbeidsdagene på, til tross for at det ved et par anledninger førte til noen våte sko. Takk også for en utømmelig kunnskap om limnologiske systemer!

Takk til Sjannie Lefevre Nilsson, min medveileder, som har vist stor tålmodighet etter utallige spørsmål og lært meg så mye om respirometrisøk. Kunnskapsnivået mitt rundt oksygenopptak har nok hatt en eksponentiell vekst gjennom to år, takket være Sjannie. Takk også for å ha vært på både vellykkede og mindre vellykkede fisketurer.

Jeg vil også takke Dag og Sjannie for skriveveiledning helt opp til siste innspurt!

Jeg vil takke Göran Erik Nilsson, min tredje medveileder, for å ha vært med på innsamling av fisk og lært meg opp i å ta blodprøver av fisk.

Tusen takk til Per-Johan Færøvig, for å ha vært med i felt for å ta CTD-målinger, samt opplæring i flowcytometri. Det ble mange spørsmål til Per gjennom studien!

Takk til Helge Andre Dahl for tidvis delt frustrasjon og samarbeid i forsøk på tyding av resultater. Jeg tror ikke det er mange artikler om flowcytometri og cellestørrelse som vi ikke har vært innom.

Takk til Lucie Gerber og May-Kristin Torp for assistanse på et flertalls fisketurer med variable resultater.

Sist, men ikke minst vil jeg takke venner, studiekamerater og familie for motivasjon og støtte. En spesiell takk til far, Olai Bendik Erdal, for kommentarer til teksten. Og en stor takk til min fantastiske kjæreste, Ragnhild Ryther Grimm Torstensen, som har holdt ut i både oppturer og nedturer, og bidrag med gode råd og kommentarer til teksten.

## Innhold

1 Introduksjon .....	1
1.1 Kroppsstørrelse, celledørrelse og genomstørrelse .....	1
1.2 Karussens biologi .....	2
1.3 Metabolsk rate .....	4
1.4 Variasjon i oksygenkonsentrasjon.....	5
1.5 Prosjektets formål.....	6
2 Materialer og metoder .....	8
2.1 Beskrivelse av områder .....	8
2.2 Miljøovervåkning .....	9
2.3 Innsamling av fisk .....	10
2.4 Respirometri .....	11
2.5 Flowcytometri .....	18
2.6 Statistikk.....	21
3 Resultater.....	22
3.1 Kroppsstørrelse.....	22
3.2 CTD-profiler.....	22
3.2.1 Februar 2020 .....	22
3.2.2 Juni 2020 .....	24
3.2.3 August 2020 .....	25
3.2.4 Oktober 2020.....	26
3.2 Respirometrieforsøk.....	27
3.2.1 Rutine metabolsk rate.....	28
3.2.2 Standard metabolsk rate .....	29
3.2.3 Kritisk oksygennivå.....	30
3.3 Flowcytometri .....	33
3.3.1 Relativ erytrocyttstørrelse .....	34
3.3.2 Relativ genomstørrelse .....	34
4 Diskusjon.....	36
4.1 Miljøbetingelser .....	36
4.1.1 CTD-målinger .....	36
4.1.2 Gassmålinger.....	37
4.2 Metabolsk rate .....	38

4.2.1 Rutine metabolsk rate .....	38
4.2.2 Standard metabolsk rate .....	39
4.3 Kritisk oksygennivå.....	39
4.4 Erytrocyttstørrelse og genomstørrelse.....	41
4.4.1 Har populasjonene forskjellig erytrocyttstørrelse? .....	41
4.4.2 Har populasjonene forskjellig genomstørrelse? .....	42
4.4.3 utfordringer ved FCM-analyse .....	42
4.5 Feilkilder .....	44
4.6 Forslag til videre forskning .....	48
5 Konklusjon .....	49
6 Referanser.....	50
Appendiks.....	56
Vedlegg I – Datasett fra respirometri og FCM .....	56
Vedlegg II – RScript .....	57



# 1 Introduksjon

## 1.1 Kroppsstørrelse, cellestørrelse og genomstørrelse

Cellestørrelse og kroppsstørrelse er to faktorer som er tett knyttet sammen i dyreriket. Det er i hovedsak to måter å øke kroppsstørrelse på; å øke antall celler, eller å øke cellestørrelsen, eventuelt en blanding av disse (Hessen, Daufresne, & Leinaas, 2013). Det grunnleggende arbeidet som ga opphav til temperatur-størrelses-regelen (TSR) ble gjort av den tyske fysiologen Carl Bergmann. Denne regelen påstår at ektoterme dyr vokser saktere ved lavere temperaturer, men oppnår en større kroppsstørrelse ved kjønnsmodning (Aguilar-Alberola & Mesquita-Joanes, 2014; Bergmann, 1848). Dette skjer ved at biologiske prosesser går saktere ved lavere temperaturer, men kjønnsmodning oppnås på et senere stadium, slik at lengre tid på å vokse muliggjør en økt kroppsstørrelse til tross for tregere vekst (Angilletta, Steury, & Sears, 2004). Det er vist at populasjoner av karpfisk karuss, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758), kan ha stor variasjon i kroppsstørrelse imellom individer og populasjoner. Dette kan være delvis forklart ved temperatur-størrelses regelen, da karuss forekommer over et stort breddegradsintervall, og dermed også temperaturintervall. En annen årsak til variasjon i kroppsstørrelse mellom populasjoner er at ved tilstedeværelse av predatorarter som abbor og gjedde vil karussen ofte vokse seg større, som en forsvarsmekanisme mot gapet til predatoren (Brönmark & Miner, 1992; Vinterstare, 2021).

Cellestørrelse varierer betydelig mellom arter. Databasen genomesize.com, utarbeidet av Gregory et al. (2006) viser at erythrocytter hos fisk kan være fra 8.8 til 17.1  $\mu\text{m}$  lange langs den lengste aksen. Erythrocytter tar opp oksygen fra omgivelsene, og transporterer dette til alle vev i kroppen hvor oksygenet brukes i aerob metabolisme. Effektiviteten av denne gassutvekslingen avhenger av faktorer som hemoglobinet oksygenaffinitet, konsentrasjon av hemoglobin og respirasjonsoverflate. Det er et inverst forhold mellom erythrocyttstørrelse og oksygenopptak. Dette er forklart med at mindre celler har større overflate-volum ratio enn større celler, og dermed er diffusjonslengden fra omgivelsene til hemoglobinet kortere (Holland & Forster, 1966). I underklassen *Teleostei* er det blitt gjort studier som viser at erythrocyttstørrelse er mer korrelert med oksygenopptak enn kjernestørrelse (Lay & Baldwin, 1999).

Karuss har, som andre fisk og fugler, beholdt cellekjerner, og dermed DNA i erythrocyttene (Gregory, 2005). Det er en signifikant korrelasjon imellom cellestørrelse og genomstørrelse i mange dyr (Jalal, Wojewodzic, Laane, & Hessen, 2013), inkludert beinfisker (Hardie &



Hebert, 2003). Teleoste fisk har stor interspesifikk variasjon i genomstørrelse (Gregory et al., 2006), blant annet forklart med en teleost-spesifikk genomduplikasjon. Noen karpefisk har i tillegg vært gjennom en ekstra helgenomduplikasjon, som har resultert i et haploid kromosomantall  $n=50$ , i motsetning til de fleste andre beinfisker, som har 24 eller 25 kromosompar (Wang, Li, Zhang, & Sun, 2012). En måte å bestemme ploidi-nivå (antall kromosomsett) i erytrocytter på er å studere den lengste cellediameteren mellom individer (Onozato, Torisawa, & Kusama, 1983). Cellestørrelse og genomstørrelse kan dermed undersøkes sammen, for å studere hvorvidt de korrelerer med andre faktorer, og om det også er mulig å observere intraspesifikk variasjon mellom populasjoner.

## 1.2 Karussens biologi

Karpefiskens karuss er en art med stor geografisk spredning, høy overlevelsesrate i oksygenfattige miljøer, samt god resistens mot sykdommer (Xiao et al., 2011). Den har en unik evne til å tolerere svært lave oksygennivåer, hypoksi, og kan leve i helt oksygenfritt miljø, anoksi, over lengre perioder. Individene er ofte små av størrelse grunnet intraspesifikk konkurranse. Karussen forekommer ofte som eneste fiskeart i små, grunne tjern hvor oksygenivået når veldig lave nivåer om vinteren og sensommeren. I denne typen tjern, hvor predasjon ikke er en faktor, vil det også ofte være mange, men små individer. I større innsjøer hvor det er tilstedeværelse av rovfisk som abbor og gjedde vil det som regel være lavere tetthet av individer, og de vil være større i størrelsen, grunnet predasjonsseleksjon (Brönmark & Miner, 1992).



Figur 1: Karuss, *Carassius carassius*. Illustrasjonsfoto: Colourbox.no

En av mekanismene karuss anvender for å øke hypoksitoleransen er å remodelle gjellefilamentene ved eksponering for lave oksygennivåer. Det vil si at ved normale oksygenforhold, normoksi, stikker ikke lamellene ut av gjellefilamentene, slik at det ved mikroskopi kun kan observeres glatte, tubulære filamenter. Dette er mulig fordi karuss, i likhet med dens nære slektning gullfisk, (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758), viser svært høy oksygenaffinitet i hemoglobinet. Dermed kan den ved svært lave oksygennivåer allikevel klare seg med en lavere respirasjonsoverflate sammenlignet med andre fisk. Allerede ved et partialtrykk av O<sub>2</sub> på 2.6 mmHg når hemoglobinet 50 % oksygenmetning (Burggren, 1982). Lavere respirasjonsoverflate ved tubulære gjellefilamenter i normoksi bidrar til å redusere energikostnader ved osmoseregulering, da ion- og vannutvekslingen mellom gjellene og omgivelsene er redusert. Dette bidrar til at karussen kan lagre mer energi i form av glykogen i leveren, som øker tiden den kan overleve med anaerob metabolisme i anoksiske forhold (Sollid, De Angelis, Gundersen, & Nilsson, 2003). Ved eksponering til hypoksi skjer det en remodelling hvor cellene som ligger imellom lamellene gjennomgår programmert celledød, apoptose, slik at vevet forsvinner, og lamellene kommer frem. Dette øker respirasjonsoverflaten opptil 7.5 ganger, slik at fisken kan ta opp O<sub>2</sub> mer effektivt enn ved normaltilstanden. Denne mekanismen bidrar til å utsette tidspunktet hvor fisken må gå over til anaerob metabolisme, og øker dermed overlevelsesraten (Sollid et al., 2003). Studier viser også at økt temperatur kan indusere remodelling av gjellene, grunnet økt oksygenopptak ved en raskere metabolisme (Sollid, Weber, & Nilsson, 2005).

Ved lave oksygennivåer i omgivelsene vil det i en organisme på et punkt oppstå hypoxemia, det vil si lavt oksygeninnhold i arterieblod. Dette fører til at aerob metabolisme byttes ut med anaerob metabolisme. Karuss og gullfisk unngår akkumulering av laktat, som kan lede til acidose, syreforgiftning, ved å produsere etanol som hovedprodukt av anaerob metabolisme i skjelettmuskulaturen (Shoubridge & Hochachka, 1980). Det er gjort funn som viser at karuss har to sett med paraloge E1-enzymet, som er underenheter av pyruvat dehydrogenase-komplekset (PDHc), som katalyserer omdanningen fra pyruvat til acetyl-CoA i sitronsyresyklusen. Acetyl-CoA kan ikke fortsette metabolismeprosessen under anoksiske forhold, og sitronsyresyklusen stopper opp. Paralogene har oppstått som et resultat av en helgenomduplikasjon, eller tetraploidisering hos en stamfar-art i *Cyprinidae*-familien (Wang et al., 2012). Disse alternative underenhetene endrer funksjonen til PDHc-komplekset slik at det fungerer som pyruvat dekarboksylase (PDC), og produserer acetaldehyd i stedet for acetyl-CoA (Fagernes et al., 2017). Karuss har svært lave nivåer av aldehyd dehydrogenase i

skjelettmuskulaturen, i motsetning til andre dyr. Aldehyd dehydrogenase vil vanligvis oksidere acetaldehyd til acetat, men hos karuss, hvor alkohol dehydrogenase-aktiviteten er dominerende i skjelettmuskulaturen, reduseres acetaldehyd heller til etanol (Nilsson, 1988). Etanol kan fritt diffundere over gjellene, og karussen unngår dermed acidose, slik at denne mekanismen er sentral for overlevelsesraten ved eksponering til anoksi (Fagernes et al., 2017).

### 1.3 Metabolsk rate

Metabolsk rate er et mål på energibruk per tidsenhet. Det kan måles med forskjellige variabler, deriblant oksygenopptak ( $MO_2$ ). Hastigheten av denne prosessen er avhengig av mange faktorer; fysisk aktivitet, døgnsyklus, stress, fordøyelse, kroppsstørrelse, vekt, vekstrate, hemoglobinkonsentrasjon, hemoglobinetts bindingsevne, kroppstemperatur, ambient temperatur og respirasjonsoverflate (McNab, 1997).  $MO_2$  gir et mål på energibruken når dyret er i en situasjon hvor det kan bruke aerob metabolisme. Om aktivitet, stress eller temperatur gjør at energibruken er høyere enn den maksimale aerobe metabolske raten, og tilgangen på oksygen dermed ikke er tilstrekkelig for energikravet, vil dyret også bruke anaerob metabolisme, og  $MO_2$  vil underestimere den faktiske energibruken.  $MO_2$  fungerer altså som en proxy for metabolsk rate ved aerob metabolisme (Fry & Hart, 1948).

Karuss kan leve over et stort temperaturintervall, noe som vil påvirke den metabolske raten, (Kamshilov & Kamshilova, 2007). Som nevnt tidligere er det vist at en plastisk endring i respirasjonsoverflaten kan skje både ved eksponering til hypoksi, og økning i temperatur (Sollid et al., 2005). Det er kjent at økt temperatur fører til at de biologiske prosessene skjer raskere, og den metabolske raten øker. Videre sier temperatur-størrelses regelen at dyr som lever ved lavere temperaturer har en langsommere metabolsk rate (Bergmann, 1848).

Det er forskjellige former å måle metabolsk rate på. For ektoterme dyr brukes standard metabolsk rate (SMR) som et mål på oksygenopptak fra omgivelsene korrigert for løseligheten av oksygen i vann ved en gitt temperatur, Henrys lov (Henry, 1803), og endringen i metabolsk rate basert på temperatur (Mundim, Baraldi, Machado, & Vieira, 2020). SMR er hvilende metabolsk opptak, det vil si når organismen ikke er i fysisk aktivitet eller er stresset. Det måles som kroppsmassespesifikt opptak av oksygen per tidsenhet. For å sammenligne individer av ulik størrelse kan det være nyttig å standardisere målingene til en gitt vekt innenfor spekteret av kroppsmasse, for eksempel 100 g (Beamish & Mookherjee,

1964). Et annet mål som er interessant når oksygenopptak og hypoksitoleranse studeres, er kritisk oksygentrykk,  $PO_{2crit}$ . Dette er det laveste oksygentrykket hvor en organisme klarer å opprettholde normal metabolsk aktivitet ved aerob respirasjon. Ved oksygenivåer under  $PO_{2crit}$  blir opptaksraten av  $O_2$  betinget av  $O_2$ -konsentrasjonen (Ultsch & Regan, 2019). For karuss er det forventet at både hvilende metabolsk rate og kritisk oksygenivå ligger på et lavt nivå, da dette gir grunnlag for en økt toleranse mot hypoksiske oksygenivåer (Lefevre, Damsgaard, Pascale, Nilsson, & Stecyk, 2014). Om en populasjon er mer utsatt for hypoksi sammenlignet med en annen populasjon, er det interessant å studere hvorvidt SMR og  $PO_{2crit}$  avviker mellom populasjonene.

#### 1.4 Variasjon i oksygenkonsentrasjon

Oksygen,  $O_2$ , er en livsviktig gass for alt aerobt liv, og inngår i respirasjonsprosessen hvor glukose,  $C_6H_{12}O_6$  og oksygen brytes ned til karbondioksid,  $CO_2$  og vann,  $H_2O$ . Energien som frigjøres når glukose og oksygen spaltes blir overført til ATP-molekyler, som fungerer som energileverandør i kroppen (Hill, Wyse, & Anderson, 2018).

Konsentrasjonen av oksygen i vann er bestemt av gassers løselighet i væske (Henrys lov), og er avhengig av temperatur. Akvatiske organismer er avhengig av tilgang på oksygen på samme måte som terrestriske organismer, men er utsatt for en høyere variasjon i oksygentilgang, både på temporal og spatial skala. Oksygen tilføres stående vannmasser hovedsakelig gjennom to mekanismer som beskrevet av Brönmark and Hansson (2005); 1) atmosfærisk oksygen diffunderer fra luftmassene til vannmassene gjennom overflaten, og blandes så inn ved sirkulasjon av vannmassene, 2) fotosyntetiserende organismer som alger og vannplanter produserer oksygen når det er tilstrekkelig med lys som trenger gjennom vannet. Samtidig foregår det kontinuerlig en respirasjonsprosess av bakterier, invertebrater, dyr og planter som forbruker oksygenet. Om våren, når vannmassene varmes opp, og tetthetsstratifisering opphører, vil vannet sirkulere og oksygenrikt vann fra overflaten vil blandes med de mer oksygenfattige nivåene i dypet, samtidig som fotosynteseprosessen øker med økt tilgang på lys i de øvre lagene. Utover sommeren øker temperaturen slik at det danner seg klare stratifiseringslag. I tillegg vil innholdet av organisk materiale i vannet øke, slik at respirasjonsprosesser og nedbrytning fører til at netto produksjonen av oksygen er negativ. Det vil si at produksjonen er lavere enn forbruket, og resulterer i at oksygenivåene faller i de dypere lagene. Om høsten faller temperaturen, og det skjer igjen en resirkulering av

vannsøylen, slik at oksygenrikt vann fra overflaten blandes med dypere vannmasser. Om vinteren oppstår tetthetsstratifisering på nytt, og det er lite blanding i vannsøylen. Ved dannelse av is i overflaten blokkeres diffusjonen av oksygen mellom vann og luftmasser fullstendig. Om det ligger snø på isen vil også fotosynteseprosessen blokkeres i mangel på lys, og oksygenproduksjonen faller mot nærmere null, slik at oksygenivået kan bli svært lavt. Dette resulterer i katastrofale følger for fiskebestander som ikke får tilgang på oksygen, og kan føre til massedød (Brönmark & Hansson, 2005).

### 1.5 Prosjektets formål

Formålet med denne studien er å undersøke hvorvidt egenskaper som cellestørrelse, genomstørrelse, metabolsk rate og hypoksitoleranse hos karuss kan endres med miljøbetingelser, primært oksygenforhold. Dette ble gjort ved å sammenligne karuss fra to populasjoner med ulike oksygenforhold. Eventuelle forskjeller mellom populasjonene kan skyldes både fenotypisk plastisitet og/eller evolusjonære tilpasninger. Fenotypisk plastisitet er et konsept som omhandler hvordan egenskaper innenfor morfologi, fysiologi og adferd kan variere på bakgrunn av forskjellige miljøbetingelser, uten at det skjer en endring i genomet. Slik variasjon kan altså forekomme innenfor én generasjon, uten at rekombinering, overkrysning og mutasjoner i reproduksjonen skaper nye genotyper. På en annen side kan endret morfologi, fysiologi og adferd føre til nye seleksjonspress, og dermed virke som en driver for genetisk evolusjon (Price, Qvarnström, & Irwin, 2003). Genomstørrelse kan i seg selv betraktes som en fenotypisk respons, som i visse tilfeller kan induseres av miljøforhold, selv om det normalt vil være et resultat av evolusjonære endringer (Hessen, Jeyasingh, Neiman, & Weider, 2010). Erytrocyttstørrelse forventes å ha tett sammenheng med genomstørrelse (Gregory, 2005), og størrelse og antall blodceller er knyttet til diffusjonsrate (Lay & Baldwin, 1999), og dermed oksygenopptak som en proxy for metabolsk rate (Fry & Hart, 1948). Karussens evne til å tolerere ekstremt lave oksygenivåer gjør den til en spesielt relevant art for slike studier.

Selv om det i denne analysen legges vekt på at populasjonene er eksponert for forskjellige oksygenkonsentrasjoner, er det også andre faktorer som kan påvirke kroppsstørrelse, som igjen vil ha betydning for ovennevnte variabler. I denne studien er populasjoner fra to tjern i Oslo-området analysert. Det er på forhånd kjent at i et av tjernene som ble undersøkt, Svartkulp, er det andre fiskearter som gjedde og abbor, og det forventes her at kroppsstørrelsen vil være større, basert på størrelsesseleksjon. I det andre tjernet som ble

undersøkt, Tjernsrudtjern, er karuss eneste fiskeart, og det forventes flere, og mindre individer, basert på intraspesifikk konkurranse (Brönmark & Miner, 1992). Ved å undersøke oksygenkonsentrasjon, samt temperatur, fotosyntese og gassnivåer kan dette legges til grunn for å studere forskjeller mellom populasjonenes egenskaper.

Studiens sentrale hypotese er: «Ulike oksygenivåer i de to lokalitetene har hatt en observerbar fenotypisk effekt på egenskaper knyttet til respirasjon mellom to populasjoner karuss.»

Det forventes at populasjonen fra Tjernsrudtjern har en lavere hvilende metabolsk rate, og dermed lavere kritisk oksygenivå, da de er antatt å være mer eksponert til hypoksi og anoksi, og dermed har større behov for hypoksitoleranse. Ved kritiske oksygenivåer vil fisken være avhengig av å ta opp O<sub>2</sub> så effektivt som mulig, og det forventes derfor også at populasjonen fra Tjernsrudtjern har mindre erythrocytter, og dermed større respirasjonsoverflate per volum (Lay & Baldwin, 1999). Hvorvidt da også genomstørrelsen er forskjellig mellom populasjonene blir også undersøkt, da den er korrelert med erythrocyttstørrelsen.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Beskrivelse av områder

Fokus i denne studien er å gjøre en sammenligning av to populasjoner av karuss, fra to ulike habitater. Den første populasjonen kommer fra Tjernsrudtjern, i Bærum kommune.

Tjernsrudtjern er et lite tjern og blir helt anoksisk i de lavere sjiktene om vinteren og sensommeren. Den maksimale dybden ligger rundt 2.5 m, og arealet er 0.0106 km<sup>2</sup> (NVE Innsjødatabase). Det har svært høye verdier av næringssalter, og høye verdier av karbon, som indikerer at vannet er humuspåvirket. Dette er illustrert i tabell 1, med data samlet inn i regi av «100-sjøers prosjektet» ved Universitetet i Oslo, Institutt for biovitenskap (IBV), AQUA-seksjonen. I denne studien fokuseres det imidlertid mest på løste gasser og vertikale CTD-profiler i beskrivelsen av miljøbetingelsene.

Tabell 1: pH, totalt organisk karbon, løst karbon og næringssaltverdier (totalt nitrogen, løst nitrogen og totalt fosfor) i Tjernsrudtjern. Data samlet inn i regi av «100-sjøers prosjektet» ved Universitetet i Oslo, Institutt for biovitenskap (IBV), AQUA-seksjonen

Dyp (m)	pH	TOC (mg/L)	DOC (mg/L)	TN (mg/L)	DN (mg/L)	TOT-P (µg/L)
0.5	8.6	12.59	9.06	2.44	1.53	124
1	9	12.4	9.59	2.51	1.81	97
1.5	8.4	12.66	10.96	2.49	2.14	85
2	9	11.95	9.56	2.48	2.1	111

Den andre populasjonen kommer fra Svartkulp, som er et større tjern i Nordmarka. Det er påvirket av humusstoffer, men med lavere påvirkning av næringssalter. Det har en større dybde opp mot 10 m, og et areal på 0.0643 km<sup>2</sup> (NVE Innsjødatabase). Lokalitetene ble valgt da de har kjente bestander av karuss, og forskjellige oksygenforhold og økologiske betingelser. Erytrocyttstørrelsen og genomstørrelsen vil bli undersøkt ved flowcytometri. MO<sub>2</sub> og PO<sub>2</sub>Crit vil bli undersøkt ved respirometri. I tillegg vil oksygennivå, temperatur og fotosyntetisk aktivitet bli målt ved hver lokasjon ved hjelp av en CTD-sensor.



Figur 2: Kart over Oslo-området, med lokalitetene Tjernsrudtjern og Svartkulp markert. Koordinatene for Tjernsrudtjern er 59,9218045N 10,6096494Ø. Koordinatene for Svartkulp er 59,975702N 10,739480Ø. Kartet er fremstilt i ArcGIS.

## 2.2 Miljøovervåkning

For å se på vertikal sonering og vannkjemi ble det gjort feltarbeid ved de to tjernene gjentatte ganger over ett år, fra november 2019 til oktober 2020. Vertikalmålinger ble tatt ved CTD-målinger (Conductivity, Temperature, Density). Dette ble gjort med en XRX-620 CTD-sensor (RBR Ltd., Canada), som ble senket ned i vannsøylen i et rolig tempo, fra en oppblåsbar gummibåt om vår, sommer og høst. Om vinteren ble sensoren senket gjennom borehull i isen. I alt ble det gjort henholdsvis 4 og 5 målinger ved hver lokalitet; se tabell 2. Målingene ble overført fra sensoren til programvaren Ruskin 6.81, og deretter ekstrahert som .xls-filer. CTD-dataen ble brukt til å lage profiler av oksygeninnhold langs dybden av vannsøylen.

Temperatur ble også registrert med CTD-sensoren. Ved å plote temperatur mot dyp kan en studere stratifiseringslag i vann. En rask endring i temperatur over en liten endring i dyp indikerer at vannsøylen er delt i seksjoner som ikke blandes med hverandre, grunnet forskjellige tetthet (Brönmark & Hansson, 2005). Slike stratifiseringslag kan ha stor forskjell i O<sub>2</sub>-konsentrasjon, da den eufotiske sonen med en netto positiv O<sub>2</sub>-produksjon ikke blandes med de dypere lagene med netto negativ O<sub>2</sub>-produksjon. PAR, fotosyntetisk aktiv stråling ble også registrert. Dette gir et mål på hvor mye lys i spekteret 400-700 nm som penetrerer gjennom vannsøylen. Lave verdier av PAR betyr at lyset blokkeres raskt, og er knyttet til høyt innhold av organisk materiale i vannet (Jones, 1992). «Conductivity», eller ledningsevne, ble også registrert. Ledningsevne er direkte korrelert med mengden løste salter (elektrolytter), og gir dermed et innblikk i næringssaltinnholdet i vannsøylen (Wetzel, 2001).



Tabell 2: Oversikt over datoer for miljøovervåkning og prøvetakning gjennom ett år.

29.11.2019	5.2.2020	12.2.2020	10.6.2020	26.8.2020	13.10.2020
CTD (Tjersrud)	CTD (Svartkulp)	CTD (Tjersrud)	CTD + gassprøver (begge lokaliteter)	CTD + gassprøver (begge lokaliteter)	CTD + innsamling av fisk (begge lokaliteter)

Det ble også tatt vertikale gassprøver fra begge lokalitetene på forsommeren og sensommeren (tabell 2). Ved Tjersrudtjern, med en maksimal dybde på ca. 2.5 meter, ble gassprøvene tatt ved 0, 0.5, 1, 1.5 og 2 meters dybde. Ved Svartkulp, med en maksimal dybde på ca. 10 meter, ble gassprøvene tatt ved 1, 2, 4 og 6 meters dybde. Dette ble gjort ved å samle 60 ml vann i en 100-ml-sprøyte. Det ble så festet en treveis-ventil til sprøyten, ventilen ble åpnet, og sprøyten tømt til det var igjen 30 ml vann i sprøyten. 20 ml luft ble trukket inn, og ventilen ble stilt inn til å ha sideporten åpen. Her ble 0.6 ml 3% HCl, saltsyre, tilsatt fra en 1-ml-sprøyte festet til sideporten, for å drive ut CO<sub>2</sub> fra vann til luftrommen over vannet («headspace»). For å sørge for at all syren havnet i prøven ble det trukket inn omtrent 0.5 ml på den store sprøyten, for å skape et negativt trykk. Etter tilsetning av saltsyre ble ventilen lukket, og sprøyten ristet i ett minutt, etterfulgt av 30 sekunder pause. Dette ble repetert 3 ganger. Etter ristingen ble en sprøytespiss festet til utgangsporten på ventilen. Fra dette punktet ble sprøyten alltid holdt oppreist, for å forhindre at vann skulle kunne inn i sprøytespissen, og dermed inn i selve gassprøven. Nålen ble stukket inn gjennom gummihinnen, septum, på en evakuert serumflaske, og 15 ml gass ble suget ut fra «headspace», og inn i flasken (Yang et al., 2015). For å ha replikerte data, ble det for hver prøve gjort to målinger. I tillegg ble det trukket inn gass direkte fra luft, for å ha kontrollprøver. Prøvene ble sendt til et laboratorium ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) for analyse av CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> og N<sub>2</sub>O.

### 2.3 Innsamling av fisk

Fiskene ble fanget ved å legge ut ruser, med maiskorn og brød som agn, over natten. Innsamlingen av fisk ble gjort i samarbeid med konvergenmiljøet 3DR, som også bruker karuss som modellorganisme i sitt arbeid med å undersøke metoder for å øke tilgjengeligheten

av donororganer for organtransplantasjon etter sirkulasjonsdød (3DR-hjemmeside: <https://www.uio.no/english/research/strategic-research-areas/life-science/research/convergence-environments/3dr/>) . For å få nok fisk til begge prosjektene, ble det satt ut ruser gjentatte ganger i september og oktober 2020. Ved Tjernsrudtjern var det ved bruk av 3-4 ruser tilstrekkelig antall fisk etter to innsamlingsrunder. Ved Svartkulp var det utfordrende å få nok fisk. Derfor ble det her flere runder med plassering av rusene på forskjellige steder, og bruk av brød som agn, i tillegg til maiskorn. Etter 4 runder med innsamling med 3-4 ruser per runde, var det blitt innsamlet 9 individer karuss fra Svartkulp. Disse ble alle holdt av til denne studien, da det ikke var viktig for 3DR-gruppen med individer fra forskjellige populasjoner. I tillegg ble det fanget én abbor og én gjedde som bifangst ved Svartkulp. Disse ble sluppet ut igjen.

Etter innsamling ble fiskene raskt transportert til akvarieavdelingen ved Institutt for Biovitenskap ved Universitet i Oslo. Her ble de plassert i tanker med sirkulerende vann, separert etter innsamlingslokasjon.

## 2.4 Respirometri

Hensikten med respirometrieforsøk er å måle den metabolske raten til en organisme. For akvatiske organismer brukes ofte oksygenopptak fra omgivelsene som verdi for metabolsk rate. Dette kan gjøres gjennom forskjellige metoder; lukket respirometri, åpen respirometri eller intermitterende respirometri. Ved lukket respirometri, hvor organismen er satt i et lukket system, så vil man over tid nå hypoksiske nivåer i vannet, samt akkumulere CO<sub>2</sub> og nitrogenavfallsstoffer som påvirker betingelsene for organismen, slik at den ikke har stabile forhold under forsøket. Ved en lengre periode med lukket system, vil man også kunne få et overflødig post-hypoksi oksygen-opptak (Excess Post-hypoxia Oxygen Consumption, EPOC), som vil påvirke eventuelle replika-målinger. Ved fullstendig åpen respirometri spyles vann kontinuerlig gjennom respirometrikammeret, og man måler MO<sub>2</sub> som er produkt av volumet som spyles gjennom kammeret per tidsenhet og differansen i oksygenkonsentrasjon mellom vannet som spyles inn og vannet som skylles ut. Slik unngår man hypoksi og akkumulering av CO<sub>2</sub> og avfallsstoffer, men systemet er sårbart for turbulens og likevektsfordeling av oksygenkonsentrasjon. Man må også ha to sensorer for hvert kammer, én for vannet som spyles inn, og én for vannet som skylles ut, noe som øker mulige feilmarginer. Metoden som ble valgt i denne studien var intermitterende respirometri. Dette er

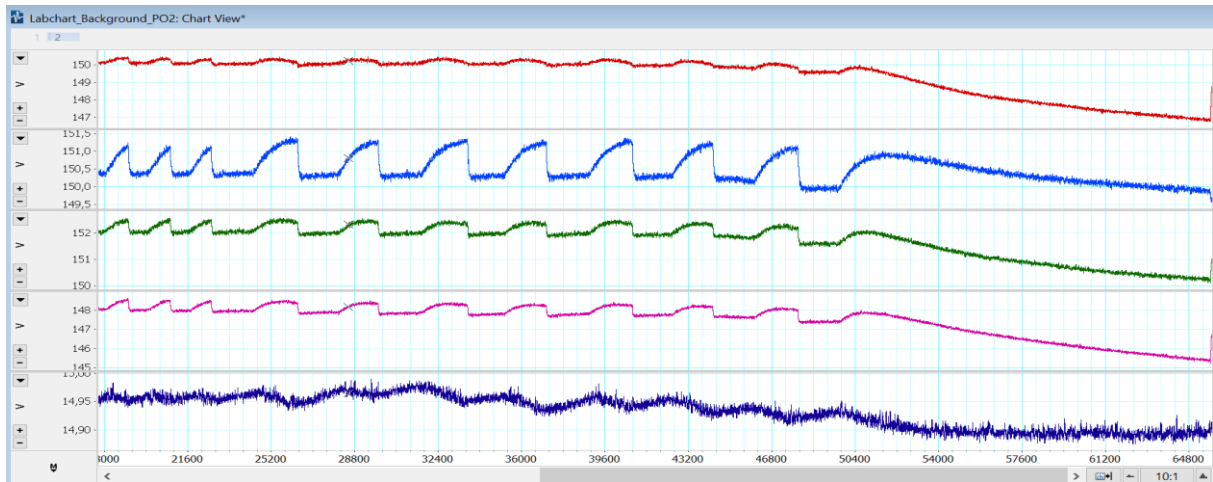
en metode som gir en serie med målinger, hvor respirometeret har en syklus hvor det først er åpent, og friskt vann spyles inn, dernest lukkes, slik at O<sub>2</sub>-opptaket til organismen fører til et fall i O<sub>2</sub>-konsentrasjon i kammeret. Ved kontinuerlig å registrere O<sub>2</sub>-konsentrasjonen i kammeret kan man da få en serie med replikerte målinger av O<sub>2</sub>-opptak per tidsenhet. Disse kan brukes til å regne ut rutine metabolsk rate (RMR) og standard metabolsk rate (SMR) (Svendsen, Bushnell, & Steffensen, 2016).

Etter siste innsamlingsrunde av fisk ble det satt av én uke til akklimatisering. Deretter startet den eksperimentelle delen av prosjektet med respirometri-målinger. Designet var et respirometri-kammer med to pumpekretser; én krets hvor en flushpumpe pumpet inn friskt vann når systemet var åpent og stagnert vann fra kammeret ble spylt ut, og én lukket krets med en Pumpe som kontinuerlig pumpet vann gjennom en ledning hvor en Firesting XB7-549-207-sensor var koblet på og logget O<sub>2</sub>-konsentrasjon hvert 3. sekund. Dataene ble sendt til programvaren Pyro Oxygen Logger, hvor de kunne overvåkes i sanntid som partialtrykk av O<sub>2</sub> målt i mmHg.

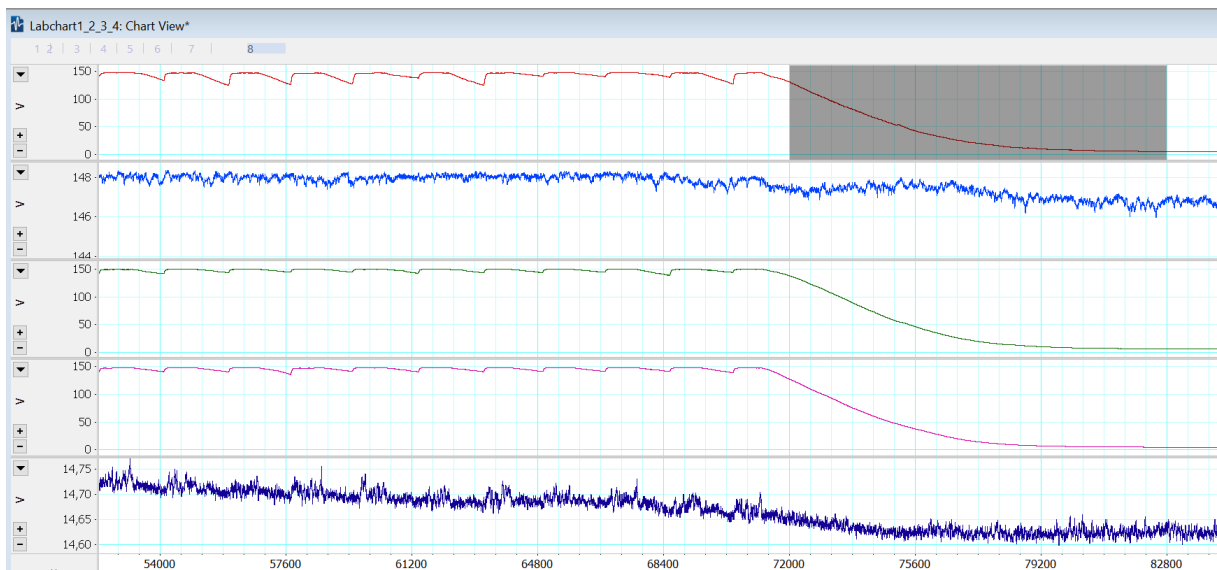
Forsøket ble gjennomført i blokker på 4 fisk om gangen da det var 4 kanaler for måling på Firesting-sensoren, og i tillegg én kanal for temperaturkontroll. En full syklus varte i 30 minutter, hvor flushpumpen var på i 15 minutter, for så å være av i 15 minutter. Hver blokk ble gjennomført fra ettermiddag (ca. 4 timer etter foring), over natten, til neste formiddag, dvs. omtrent 20 timer. Mot slutten av loggingen ble det kjørt en runde med lukket respirometri. Her ble flushpumpen skrudd helt av i 4 timer, slik at O<sub>2</sub>-konsentrasjonen falt over en lengre periode. Dette er en metode for å kunne måle kritisk oksygen-nivå, PO<sub>2crit</sub>, som er punktet hvor opptaksraten av O<sub>2</sub> blir avhengig av konsentrasjonen og faller under fiskens basale oksygenbehov (Ultsch & Regan, 2019).

Før forsøket ble det kjørt en runde med PO<sub>2</sub>-målinger uten fisk i kammerene, for å undersøke om mikrobiell bakgrunnsrespirasjon kunne ha en innvirkning på resultatene. Det var forventet at dette ikke ville spille noen betydelig rolle, da forsøket ble kjørt ved relativt lav temperatur (10-15 °C), og kammerene ble skyllet grundig for å fjerne eventuell bakteriefilm mellom hver blokk. Dette ble utført med samme innstillinger som for selve forsøket, først en serie med intermitterende syklus, deretter én lukket syklus på 4 timer. Som det kommer frem av figur 3, er det en liten variasjon i bakgrunns-PO<sub>2</sub>-målingene sammenlignet med det faktiske forsøket (figur 4), og over 4 timer med lukket syklus faller PO<sub>2</sub>-nivået med 2-3 mmHg, det vil si >3 %

av fallet i PO<sub>2</sub>-nivå som ble observert ved 4 timers lukket syklus under forsøket. Legg merke til at y-aksene (PO<sub>2</sub>, mmHg) er auto-skalert for å fange opp hele spekteret av målingene.



Figur 3: Bakgrunnsmålinger av PO<sub>2</sub> i respirometrene. Y-aksen er PO<sub>2</sub>, oppgitt i mmHg. X-aksen er tid i sekunder. Fra toppen: Kanal 1-4 representerer hvert respirometrikammer, uten karuss. Kanal 5 er temperaturmålinger.

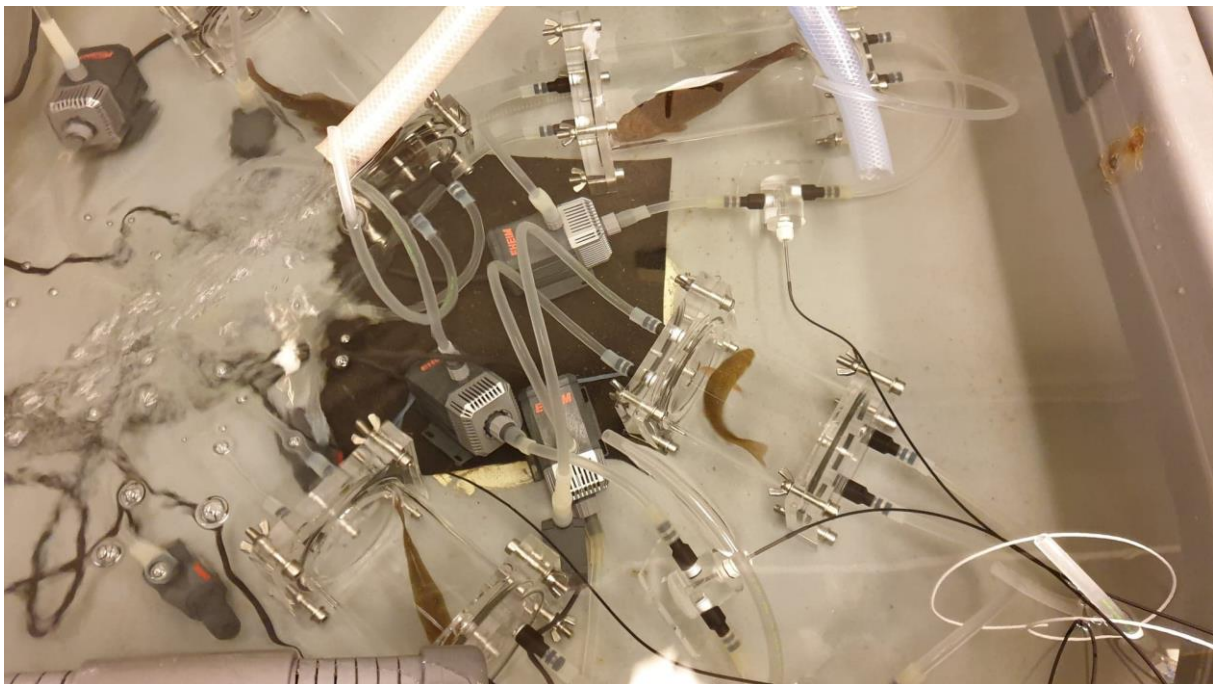


Figur 4: Illustrasjon av MO<sub>2</sub>-målinger under forsøket. Y-aksen er PO<sub>2</sub>, oppgitt i mmHg. X-aksen er tid i sekunder. Fra toppen: Kanal 1-4 representerer hvert respirometrikammer, med karuss #1-4. Kanal 5 er temperaturmålinger.

Fiskene fra Svartkulp var betydelig større enn fiskene fra Tjernsrudtjern. Det ble derfor nødvendig å anskaffe to ny respirometrikammer, da volumet på de originale kammerene på 1177.5 ml (radius = 5 cm, lengde = 15 cm) ikke var nok for at fiskene fra Svartkulp kunne oppholde seg der uten å bli unødvendig stresset. To nye respirometrikammer ble anskaffet, hver med et volum på 1962.5 ml (radius = 5 cm, lengde = 25 cm). Første blokk ble kjørt med 4 fisk fra Tjernsrudtjern, da de store kammerene ikke var klare. Deretter ble hver blokk kjørt

med 2 fisk fra Tjersrudtjern og 2 fisk fra Svartkulp. Sjette, og siste blokk ble gjennomført med én fisk fra Tjersrudtjern og én fra Svartkulp.

Etter hver blokk med respirometrisforsøk ble fisken øyeblikkelig avlivet med et hardt slag mot hodet. Blodprøver ble tatt fra dorsal aorta av hver fisk med kanyler skyllet med 30 mg/ml heparin, og plassert i merkede Eppendorf-rør. Avhengig av størrelsen på fisken ble mellom 0.2 og 0.5 ml blod samlet inn fra hver fisk. Blodprøvene ble så fraktet til flowcytometeret for videre analyse. Etter blodprøvetaking ble vekt og lengde på fisken målt, og kjønn bestemt ved disseksjon.



*Figur 5:* Bildet viser 4 fisk i respirometrikammer. Øverst i bildet ses de to nyanskaffede, større kammerene, med fisk fra Svartkulp. Under ses de originale, mindre respirometrene, med fisk fra Tjersrudtjern.

Etter respirometri-målingene ble rådataene overført til LabChart Reader, hvor stigningstallet for hvert 15-minutters intervall med lukket system ble ekstrahert. Enheten for stigningstallet var mmHg/s. For å kunne regne ut  $MO_2$  gitt i  $mg\ O_2\ kg^{-1}\ h^{-1}$  må man multiplisere stigningstallet med en omgjøringskoeffisient. Denne omgjøringskoeffisienten blir kalt Bunsen-koeffisienten, og kan bli funnet i tabell 1.36, kapittel 1 av Dissolved Gas Concentration in Water (Colt, 2012). Bunsen-koeffisienten er avhengig av temperatur og trykk. Under forsøksperioden ble det temperaturen i tankene fiskene ble oppbevart i senket, for å gjøre klart for andre forsøk som skulle utføres. Temperaturen ble senket fra 15 til 10 °C. Med bakgrunn i denne temperaturendringen ble  $MO_2$  beregnet med ulike

omgjøringskoeffisienter fra Bunsen-koeffisient tabellen. Den første blokk ble målt ved 15 °C. De neste 2 blokkene målt ved 11 °C, og de siste 3 ble målt ved 10 °C.

For utregning fra stigningstallet til MO<sub>2</sub>-verdier ble formel 1 (Svendsen et al., 2016) brukt:

$$MO_2 = V * \alpha * M^{-1} * \frac{\delta pO_2}{\delta t} * 3600 \quad \text{Formel 1}$$

V er her volumet av respirometeret korrigert for volumet av den respektive fisken (l),  $\alpha$  er Bunsen koeffisienten (mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> mmHg<sup>-1</sup>), M er kroppsmassen til den respektive fisken (kg), og  $\frac{\delta pO_2}{\delta t}$  er endringen i partialtrykk O<sub>2</sub> (mmHg s<sup>-1</sup>). Det multipliseres med 3600 for å gjøre om tiden fra sekunder til timer. MO<sub>2</sub>-resultater får da enheten mg O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Etter utregning av MO<sub>2</sub>-verdier for hver syklus av respirometri, ble det regnet ut rutine metabolsk rate (RMR) og standard metabolsk rate (SMR). RMR ble kalkulert ved å regne ut gjennomsnittet av hver syklus, slik at man sitter igjen med én gjennomsnittsverdi for hver fisk. SMR, eller hvilende metabolsk rate, er den opptaksraten av oksygen fisken har når den ikke er i aktivitet, ikke har akselerert rate på grunn av høy fordøyelsesaktivitet, og ikke er stresset (Beamish, 1964). SMR ble kalkulert ved å ta gjennomsnitt av de 10% laveste MO<sub>2</sub>-verdiene for hver fisk (Chabot, Steffensen, & Farrell, 2016). Det var mellom 32 og 37 sykluser for hver blokk. Dette ble rundet opp, slik at det ble tatt gjennomsnitt av de 4 laveste MO<sub>2</sub>-verdiene for å finne SMR. Etter 15/15min åpen/lukket-syklusene ble respirometeret lukket i en lengre periode for måling av PO<sub>2crit</sub>.

Da temperaturen i vannet ble endret i løpet av forsøket, ble det gjort en korrigering for dette ikke bare med Bunsen-koeffisienten, men også for den temperaturavhengige metabolske raten. Her ble temperaturkoeffisienten Q<sub>10</sub> brukt, som er et tall på endringen i MO<sub>2</sub> når temperaturen økes med 10 °C (Sollid et al., 2005). Formelen for Q<sub>10</sub> er gitt ved;

$$Q_{10} = \left( \frac{MO_{2x}}{MO_{2y}} \right)^{10/(T_x - T_y)} \quad \text{Formel 2}$$

som er avledet av Arrhenius-likningen for reaksjonsraters temperaturavhengighet (Mundim et al., 2020). T<sub>x</sub> er her temperaturen det korrigeres til (°C), T<sub>y</sub> er temperaturen som korrigeres (°C), MO<sub>2x</sub> er den respektive opptaksraten man ønsker å finne (mg O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), og MO<sub>2y</sub> er

opptaksraten man korrigerer fra ( $\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Om man skriver om formelen slik at man løser for  $\text{MO}_{2x}$  får man da formel 3;

$$\text{MO}_{2x} = \text{MO}_{2y} * Q10^{((T_x - T_y)/10)} \quad \text{Formel 3}$$

som er formelen som ble brukt til å korrigere  $\text{MO}_2$ -verdiene som ble målt ved henholdsvis 15 og 11 °C. Q10-verdien ble satt til 5.1, som ble funnet å være verdien for karuss i intervallet 10-15 °C av Sollid et al. (2005).

Etter korrigering for temperatur, ble  $\text{MO}_2$ -dataene standardisert, slik at verdiene gjenspeilet hva opptaksraten av oksygen ville vært for hvert individ, om det hadde en kroppsmasse på 100 g. Denne standarden ble valgt fordi 100 g ligger sentralt plassert innenfor intervallet av kroppsmasse målt, og innenfor 3. kvartil, både før og etter at avvikerverdiene for  $\text{MO}_2$  ble tatt ut av datasettet. Standardiseringen ble gjort ved å bruke formel 4 for massespesifikk  $\text{MO}_2$  som funksjon av kroppsvekt;

$$\text{MO}_2 = a * \text{Mb}^b \quad \text{Formel 4}$$

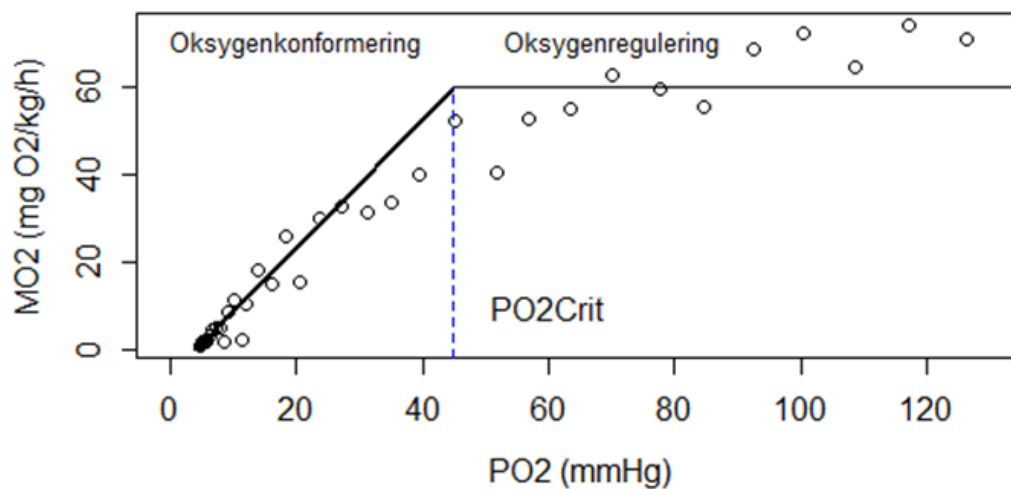
der a er en konstant, og b er eksponenten som brukes for massespesifikk  $\text{MO}_2$ . For totalt opptak brukes  $b_t = 1 - b$  som eksponent (Hill et al., 2018). Det var for få individer i hver gruppe til å gjøre regresjon av  $\text{MO}_2$  mot kroppsmasse, slik at resultater fra en tidligere studie på gullfisk ble brukt til å sette eksponenten for massespesifikk  $\text{MO}_2$  til -0.2 (Huang, Zhang, Liu, Wang, & Luo, 2013). Ved å sette opp to ligninger for  $\text{MO}_{2x}$  og  $\text{MO}_{2y}$ , og løse for a, som er konstant, kan man sette de lik hverandre, og deretter beregne standardisert  $\text{MO}_2$  basert på formel 5:

$$\text{MO}_{2y} = (\text{MO}_{2x}/(\text{Mbx}^{-0.2})) * (\text{Mby}^{-0.2}) \quad \text{Formel 5}$$

$\text{MO}_{2y}$  er her den standardiserte  $\text{MO}_2$  man ønsker å finne,  $\text{MO}_{2x}$  er den metabolske raten man standardiserer fra.  $\text{Mbx}$  er massen man standardiserer fra.  $\text{Mby}$  er i dette tilfellet 100 g, det vil si massen man standardiserer til.

For å finne det kritiske oksygennivået hvor opptaksraten av  $\text{O}_2$  blir avhengig av tilgjengeligheten, ble flushpumpen skrudd av i 4 timer, slik at det var et lengre intervall med lukket respirometri. Dermed falt  $\text{PO}_2$ -nivået til veldig lave nivåer. Ved å observere opptaksraten,  $\text{MO}_2$ , mot  $\text{PO}_2$  kan man finne  $\text{PO}_{2\text{crit}}$ . Det er flere framgangsmåter å estimere  $\text{PO}_{2\text{crit}}$  på, og i denne studien er det brukt to modeller som begge inngår i «respirometry»-

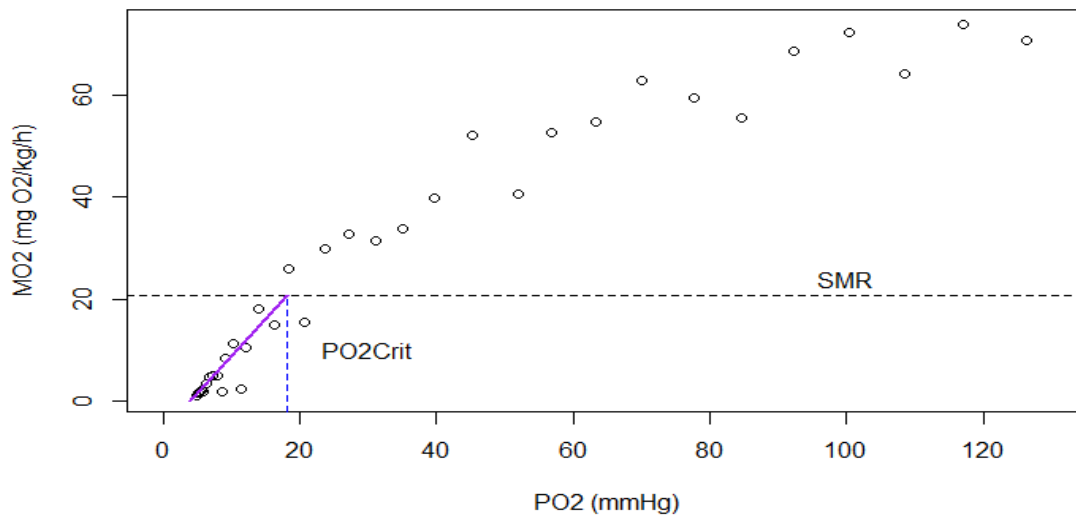
pakken til R. Den første modellen er ofte kalt «broken stick»- eller «breakpoint»-modellen, og gjør to lineære regresjoner av  $MO_2$  mot  $PO_2$ , én langs de stabile oksygenregulerende verdiene av  $MO_2$ , og én langs de stabile oksygenkonformerende verdiene.  $PO_2$ -verdien av skjæringspunktet hvor regresjonslinjene møtes («breakpoint») gir et estimat av  $PO_{2Crit}$  (figur 6) (Ultsch, Ott, & Heisler, 1980). Utfordringen med denne metoden, som tradisjonelt har vært mye brukt, er at punktet ofte er forskjøvet noe mot høyre, og slik representerer en mulig feilmargin og risiko for å overestimere  $PO_{2Crit}$ .



Figur 6: «Breakpoint»-metoden.  $PO_2$ -verdien hvor den lineære regresjonen av de oksygenkonformerende  $MO_2$ -verdiene møter den lineære regresjonen av de oksygenregulerende  $MO_2$ -verdiene gir estimatet av  $PO_{2Crit}$  (Ultsch et al., 1980).

Den andre metoden er i «respirometry»-pakken kalt «Low linear oxygen», LLO, og baserer seg på at hvilende oksygenopptak, SMR, er kjent. Ved å legge en horisontal linje på SMR-verdien i  $MO_2$  versus  $PO_2$ -plottet, og en regresjonslinje basert på  $MO_2$ -verdiene som ligger under SMR, kan  $PO_{2Crit}$  estimeres som skjæringspunktet mellom de to linjene, eller punktet hvor  $MO_2$ -regresjonen sammenfaller med SMR (figur 7). Denne metoden gir et lavere og mer stabilt estimat av  $PO_{2Crit}$  (Reemeyer & Rees, 2019). Både  $MO_2$  og  $PO_{2Crit}$  påvirkes av fordøyelsesaktivitet (Thuy et al., 2010). Fiskene ble derfor matet til samme tid hver dag, 4 timer før forsøksstart.





Figur 7: LLO-metoden. PO<sub>2</sub>-verdien hvor regresjonen av MO<sub>2</sub><SMR sammenfaller med SMR gir estimatet av PO<sub>2</sub>Crit (Reemeyer & Rees, 2019).

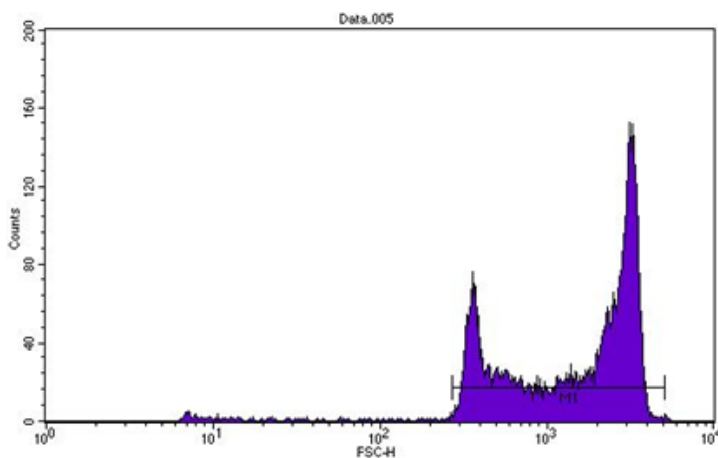
## 2.5 Flowcytometri

Celle- og genomstørrelse av blodcellene fra ulike fisk fra de to populasjonene ble analysert ved flowcytometri. Dette er en metode hvor partikler, i dette tilfelle erythrocytter og erythrocytter, blir analysert ved at de sendes gjennom en laminær væskestrøm, slik at partiklene passerer en lyskilde og en sensor, og sensoren registrerer spredningen på lyssignalet som passerer. Styrken til signalet gjenspeiler størrelsen på partikkelen som passerer. Ved å sammenfatte data fra sensorer plassert i forskjellige vinkler kan man også si noe om granulariteten, eller den interne kompleksiteten, til partiklene. Flowcytometri kan også brukes til å analysere organeller eller makromolekyler ved å farge objektet av interesse, og bruke en fluorescenslaser og sensor til å registrere styrken på fluorescenssignalet (Adan, Alizada, Kiraz, Baran, & Nalbant, 2017).

Vasking av erythrocyttene ble gjort ved å overføre 100 µl helblod fra hver prøve til 1.5 ml Eppendorf-rør, deretter ble det tilsatt 900 µl fosfatbuffret saltvann (PBS), og tubene ble ristet svakt. Hvert rør ble så sentrifugert ved 500 g i 10 minutter. Etter sentrifugering dannet erythrocyttene en pellet i bunnen av røret. Supernatanten ble fjernet, 900 µl PBS ble tilsatt, og tubene ristet for å løse erythrocyttene på nytt. Dette ble repetert, slik at alle prøver ble kjørt i sentrifugen 3 ganger, før de ble løst en siste gang i PBS (Grimes, 2002).

Til analysene ble det benyttet et Becton Dickinson FACScalibur flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA). Grenseverdier ble satt, og resultatene ble framstilt i programvaren CellQuest Pro (Becton Dickinson, San Jose, USA). Protokollen for farging av genomet er basert på Marie et al. (2001). Flowcytometeret sender partikler, i dette tilfelle erythrocytter/nuclei, gjennom en laminær væskestrøm, slik at partiklene passerer en lyskilde og en sensor, én etter én. Sensoren registrerer så signalet for hver partikkel, og overfører dette til en grafisk programvare. Det er forskjellige sensorer for forskjellige formål i BD FACScalibur. For å måle størrelsen på erythrocyttene brukes Forward Scatter, FSC, som er en sensor som ligger direkte ovenfor lyskilden, slik at man får et signal fra partikkelen i en «rett» profil (Marie, Simon, Guillou, Partensky, & Vaulot, 2001).

For å finne den reelle størrelsen på cellene og genomet må de relateres til en standard med kjent størrelse, som også blir kjørt som en prøve. I denne oppgaven ble det valgt erythrocytter fra kylling (Chicken Red Blood Cells, CRBC) som standard, da disse er erythrocytter hvor cellekjernen er beholdt, og de er nærliggende i størrelse med erythrocyttene til karuss. CRBC ble levert av BioSure. Størrelsen, granulariteten og fluorescenssignalet av CRBC-standarden ble analysert i flowcytometeret på akkurat samme måte som prøvene. For hver blokk ble det også kjørt CRBC-standard. På grunn av den bikonkave ellipseformede disk-formen erythrocytter har må man være klar over hvilke dimensjoner som skal leses av. Den distinkte formen til erythrocytter gir en bimodal fordeling når den illustreres i et FSC-histogram (Piagnerelli et al., 2007). I denne studien ble det sterkeste signalet som blir detektert av FSC-sensoren brukt som mål på cellestørrelse. Dette tilsvarer den høyre toppen i den bimodale fordelingen (figur 8) (Gienger, Gross, Ost, Bär, & Neukammer, 2019).



Figur 8: Eksempel på et typisk histogram produsert av Forward Scatter (FSC)-analyse ved flowcytometri av erythrocytter. FSC representerer relativ størrelse på partikkelen som blir analysert.

For å finne genomstørrelsen ble prøvene og standarden farget med propidium iodide (propidiumjodid, PI). PI er et fargestoff som binder til, og har lik preferanse for A-T og C-G basepar (Gray & Langlois, 1986). Fargesignalet blir dermed proporsjonalt med mengden DNA. PI-fluorokromet absorberer energien fra laseren, og eksiteres ved 535 nm. Når fluorokromet frigjør den absorberte energien emitteres fotoner lavere energi, altså lenger bølgelengde, da noe av energien går tapt som varme- og vibrasjonsenergi. PI emitterer fotoner ved 617 nm (Marie et al., 2001).

Under analysen ble 10 µl vasket blodløsning tilsatt i 930 µl isolasjonsbuffer (NIB) i et 3-ml testrør. 10 µl 1% RNase ble videre tilsatt, for å forhindre at RNA-molekyler også ble farget og påvirket signalet. Deretter ble 50 µl 0.1 µg/µl PI tilsatt under avtrekk, skjermet for direkte lyskilder. Dermed var sluttkonsentrasjonen av PI 5 µg/ml. Prøvene ble så inkubert på is, i mørke, i 45 minutter. Etter inkubasjon ble prøvene kjørt på lav hastighet ( $\approx 100$  celler/events  $\text{sek}^{-1}$ ) i flowcytometeret, og fluorescensen ble registrert med FL2-sensoren, i punktdiagram og histogram på logaritmisk skala (Marie et al., 2001).

For å finne de absolutte verdiene på erytrocytt-prøvene, må man regne om fra de relative verdiene man får ut av programvaren. Da må man kjenne omgjøringsforholdet, og dette oppnås ved å finne forholdet mellom de relative verdiene og absolutte verdiene på CRBC-standard. De absolutte verdiene av størrelsen til CRBC-cellene ble funnet vha.

lysmikroskopi. Mikroskopet som ble brukt var et Zeiss Scope A Axio, med et Leica Flexacam C1, og programvaren LAS X. Ved å ta et bilde med 40x-objektivet, ble programvaren brukt til å måle den maksimale lengde på hver enkelt erytrocytt med fullstendig diameter i bildet.

Deretter ble det tatt et gjennomsnitt av alle målingene (i alt 40 celler), for å få et representativt tall på den absolutte diameteren. Den absolutte størrelsen på genomet til CRBC-cellene er på 2.5 pg (Galbraith, Lambert, Macas, & Dolezel, 2001).

Da signalet fra FSC- og FL2-sensoren antas å være direkte proporsjonalt med henholdsvis erytrocyttstørrelse og genomstørrelse (Shapiro, 2005), kan man regne ut absolutte verdier av prøvene (FRBC) ved hjelp av en kjent standard (CRBC). Formel 6, beskrevet av Galbraith et al. (2001) gir absoluttverdien av prøven:

$$\text{Absoluttstørrelse}_{\text{FRBC}} = \left( \frac{\text{Peak Channel}_{\text{FRBC}}}{\text{Peak Channel}_{\text{CRBC}}} \right) * \text{Absoluttstørrelse}_{\text{CRBC}} \quad \text{Formel 6}$$

## 2.6 Statistikk

Alle statistiske tester og plots ble fremstilt i RStudio versjon 1.4.1106 (© 2009-2021 RStudio, Inc). Plottene ble produsert ved hjelp av R-pakken «ggplot2», og databehandling for å plote ble gjort ved hjelp av pakkene «dplyr» og «tidyr». Disse tre pakkene inngår i samlepakken «tidyverse» (Wickham, 2017).

For å vurdere om dataene var normalfordelte ble det gjort en Shapiro-Wilk-test. Dette ble gjort for å bestemme om det skulle brukes parametriske eller ikke-parametriske tester. Denne testen kalkulerer gjennomsnitt og standardavvik for dataene, og vurderer deretter hvorvidt datapunktene passer inn i en normalfordeling med samme gjennomsnitt og standardavvik. Shapiro-Wilk-testen har som nullhypotese at dataene kommer fra en normalfordeling. Om  $p$ -verdien  $<$  signifikansnivået (0.05) forkastes nullhypotesen (Whitlock & Schluter, 2015).

Forklaringsvariabelen i dette forsøket er en kategorisk variabel, da det analyseres om det er forskjeller i to populasjoner, basert på ulike miljøbetingelser. Med en kategorisk forklaringsvariabel og en kontinuerlig responsvariabel brukes Welchs t-test som parametrisk test, for data med ulik varians (heteroskedasitet). Welchs t-test antar at dataene er normalfordelte (Whitlock & Schluter, 2015).

T-tester vurderer om populasjoner er forskjellige basert på gjennomsnittet for hver populasjon. Da resultatene fra flowcytometri-analysen ikke kunne omregnes til absolutte verdier (se kapittel 4.4.3), ble det bestemt å gjøre tester på de relative verdiene (Peak channel, arbitrære enheter). Ettersom disse verdiene er skalert med en ukjent faktor, vil dette påvirke resultatet av en t-test. Det ble derfor også gjort en ikke-parametrisk Wilcoxon rank sum-test på resultatene for erytrocyttstørrelse og genomstørrelse. Denne testen transformerer hvert datapunkt til en rangering, og baserer resultatet på en forskjell i median mellom populasjonene. Da alle dataene er skalert med samme faktor, vil ikke dette påvirke rangeringen av datapunkter, slik at Wilcoxon rank sum-testen er robust for relative verdier, og vil gi samme resultat som absoluttverdier (Whitlock & Schluter, 2015).

## 3 Resultater

### 3.1 Kroppsstørrelse

Det var stor forskjell i kroppsstørrelse og antall karuss fanget mellom populasjonene. I Tjernsrudtjern ble det fanget over 150 fisk, hvorav 13 individer ble holdt av til denne studien. Gjennomsnittlig kroppsvekt fra Tjernsrudtjern var 44.8 g, med et standardavvik på 4.4. Fra Svartkulp ble det fanget mye færre fisk, i alt 9 individer karuss. Disse hadde en gjennomsnittlig kroppsvekt på 130.8 g, og et standardavvik på 47.9. Vektfordelingen for hver populasjon er illustrert i figur 9. Forskjellen i kroppsvekt var statistisksignifikant ( $t=5.367$ ,  $p\text{-verdi}=6.464e-4$ , Welchs t-test).



Figur 9: Kroppsstørrelse i gram for hver populasjon. De fargede boksene representerer målinger mellom 1. og 3. kvartile. Strekene over og under boksen representerer de høyeste og laveste verdiene innenfor  $1.5 * IQR$  (interkvartile avstanden mellom 1. og 3. kvartile). Verdier utenfor denne avstanden illustreres punktvis. (Svartkulp  $n=9$ , Tjernsrudtjern  $n=13$ ).

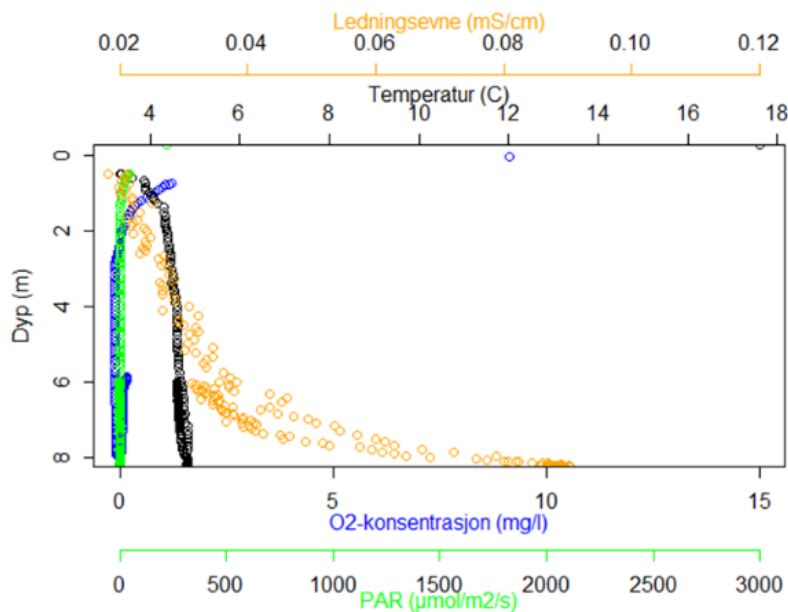
### 3.2 CTD-profiler

Én enkelt CTD-profil ble tatt 29.11.2019 fra Tjernsrudtjern. Resultatet fra denne profilen var ikke tilfredsstillende. Da det heller ikke ble gjort målinger ved Svartkulp denne datoen ble det besluttet å forkaste denne profilen.

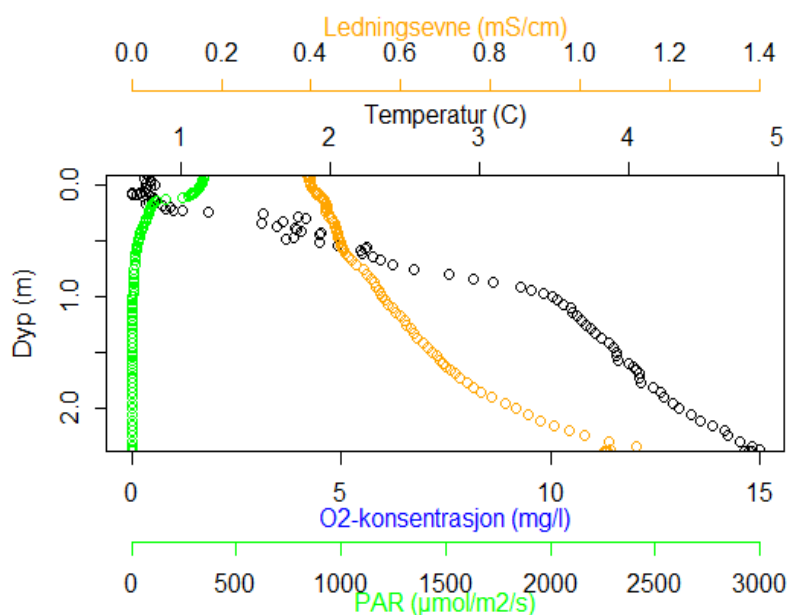
#### 3.2.1 Februar 2020

Figur 10 og 11 viser CTD-profilene fra henholdsvis Svartkulp og Tjernsrudtjern i februar 2020. Disse profilene ble tatt med én ukes mellomrom, 5.2.2020 og 12.2.2020. Ved Svartkulp (figur 10) kan det ses at oksygenverdiene er tilnærmet 0 mg/l allerede ved 2 meters dyp. Som sett av figur 11 er det ikke registrert noen oksygenverdier ved Tjernsrudtjern, da det var et

problem med oksygensensoren. Derimot kan det ses av ledningsevne, at det er stor forskjell mellom lokalitetene. Svartkulp har en ledningsevne på 0.02-0.04 mS/cm i store deler av vannsøylen, fra 0 til ca. 6 meters dyp. Ved Tjernsrudtjern kan en se at ledningsevnen er mye høyere, og starter på rundt 0.4 mS/cm ved overflaten, og stiger helt opp mot 1.0 mS/cm ved 2 meters dyp. Begge lokalitetene viser også lave verdier for PAR, fotosyntetisk aktiv stråling.



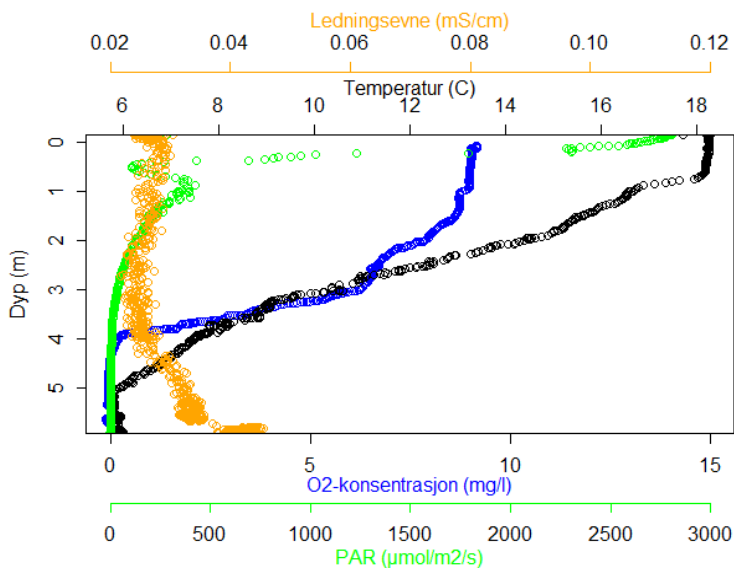
Figur 10: CTD-profil av Svartkulp, 5.2.2020. Viser oksygenkonsentrasjon, temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 8 meters dyp.



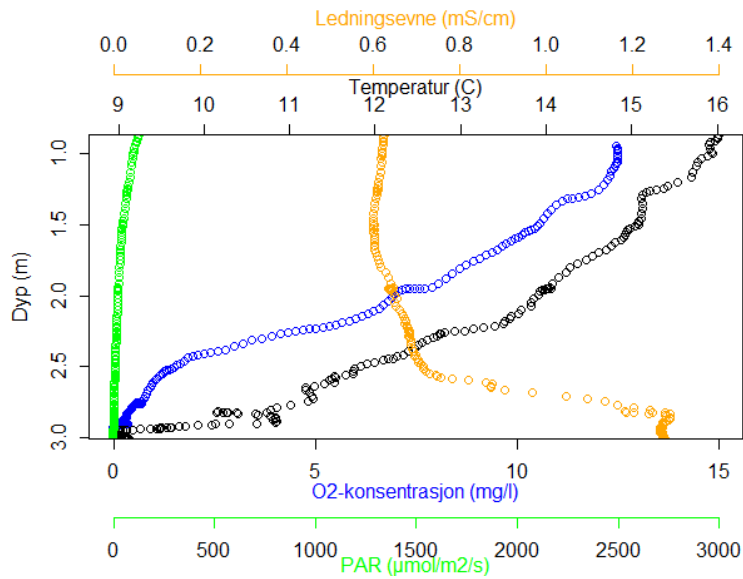
Figur 11: CTD-profil av Tjernsrudtjern, 12.2.2020. Viser temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 2 meters dyp. Oksygenverdier ble ikke registrert korrekt, og er derfor ikke med.

### 3.2.2 Juni 2020

Resultatene fra CTD-målingene på forsommeren, 10.6.2020 viser gode profiler for begge lokaliteter. Av figur 12 (Svartkulp) og figur 13 (Tjersrudtjern) kan en se at oksygenkonsentrasjonen er høy i de øvre sjiktene. Ved Svartkulp er den ved rundt 9 mg/l ved overflaten og ned til cirka 2 meters dyp, før den faller gradvis mot null ved 4 meters dyp. Ved Tjersrudtjern er oksygenkonsentrasjonen meget høy, rundt 12 mg/l ved 1 meters dyp, og faller gradvis mot anoksiske nivåer i bunnsjiktet ved 3 meters. Som for februarmålingene er PAR-verdiene lave i begge profilene, men stiger i de helt øverste lagene ved Svartkulp. Igjen ses også en klar forskjell i ledningsevne, hvor Svartkulp har ledningsevne mellom 0.02 og 0.04 mS/cm, imens Tjersrudtjern har mye høyere verdier fra 0.6 og opp til 1.3 mS/cm i bunnsjiktet.



Figur 12: CTD-profil av Svartkulp, 10.6.2020. Viser oksygenkonsentrasjon, temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 6 meters dyp.

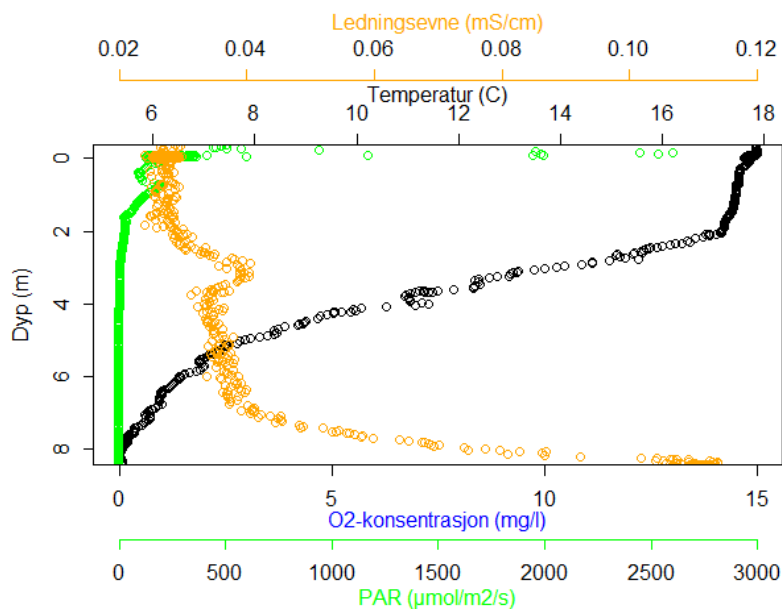


Figur 13: CTD-profil av Tjernsruddtjern, 10.6.2020. Viser oksygenkonsentrasjon, temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 1 til 3 meters dyp.

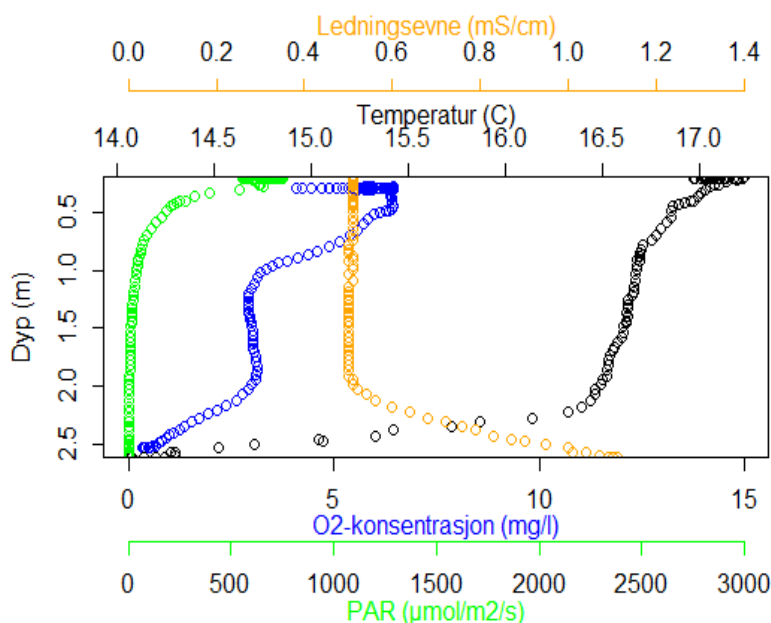
### 3.2.3 August 2020

August-målingene fra Svartkulp og Tjernsruddtjern er illustrert i henholdsvis figur 14 og 15. I Svartkulp ses et tydelig stratifiseringslag, hvor temperaturen er høy i de øverste 2 meterne, før den faller raskt fra 2 til 6 meters dyp ned mot 6 °C. Sett bort i fra de helt øverste lagene, så er PAR-nivået fortsatt lavt i begge tjernene. Ved Tjernsruddtjern kan en legge merk til at oksygenkonsentrasjonen er lavere enn ved juni-målingene. Allerede ved 0.5 meters dyp er nivået rundt 6 mg/l, og det faller raskt ned mot 3 mg/l ved 1 meters dyp. Fra 2 meter faller det igjen ned mot anoksiske nivåer. Også her ses en klar forskjell i ledningsevne, hvor Svartkulp ligger på mellom 0.02 og 0.04 mS/cm i vannsøylen, og Tjernsruddtjern viser verdier på omtrent 0.5 mS/cm.





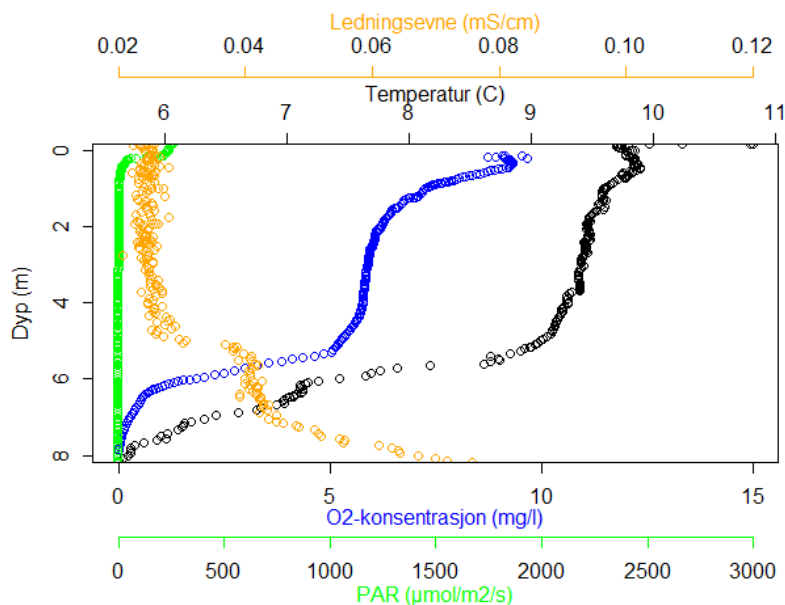
Figur 14: CTD-profil av Svartkulp, 26.8.2020. Viser temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 8 meters dyp.



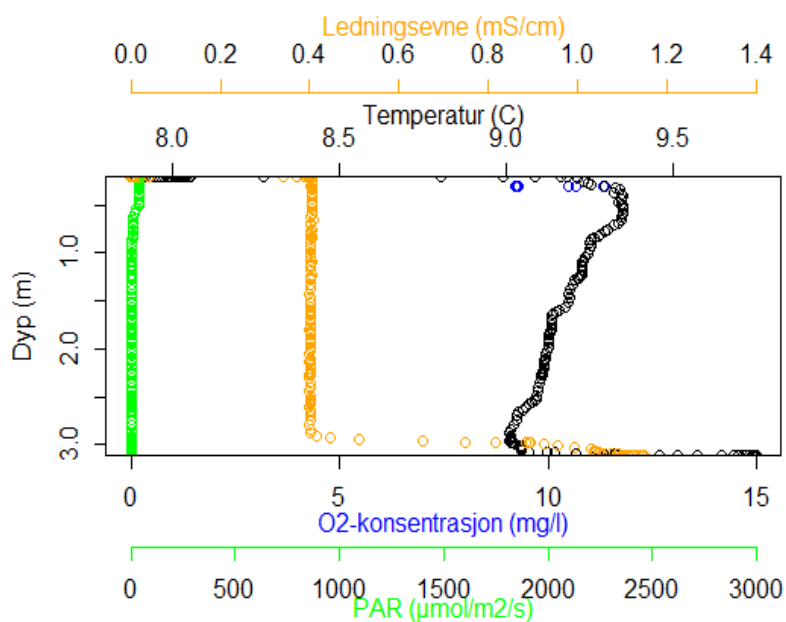
Figur 15: CTD-profil av Tjernsrudtjern, 26.8.2020. Viser oksygenkonsentrasjon, temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 2.5 meters dyp.

### 3.2.4 Oktober 2020

Det ble også gjort CTD-målinger 13.10.2020. I Svartkulp kan det observeres stabilt oksygennivå på rundt 6 mg/l mellom 2 og 5 meters dyp, med lavere oksygenkonsentrasjoner under 5 meter (figur 16). I Tjernsrudtjern (figur 17) er det ingen oksygenprofil, men det kan ses at ledningsevnen her er klart høyere enn i Svartkulp, 0.4 mS/cm mot 0.02-0.04 mS/cm. Også ved disse målingene kan en se at PAR-verdiene er lave ved begge lokaliteter.



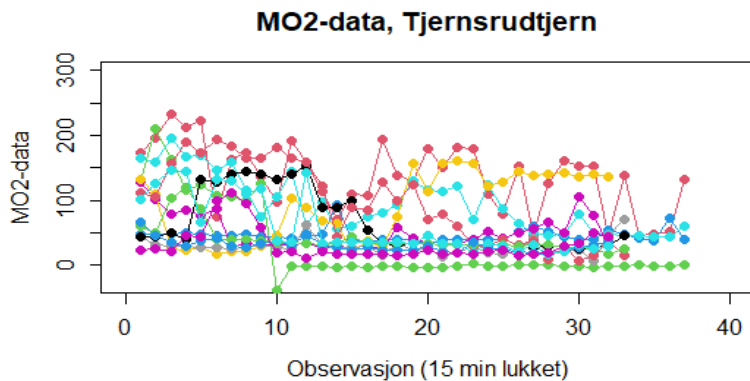
Figur 16: CTD-profil av Svartkulp, 13.10.2020. Viser oksygenkonsentrasjon, temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 8 meters dyp.



Figur 17: CTD-profil av Tjersrudtjern, 13.10.2020. Viser temperatur, ledningsevne og fotosyntetisk aktiv stråling fra 0 til 2.5 meters dyp.

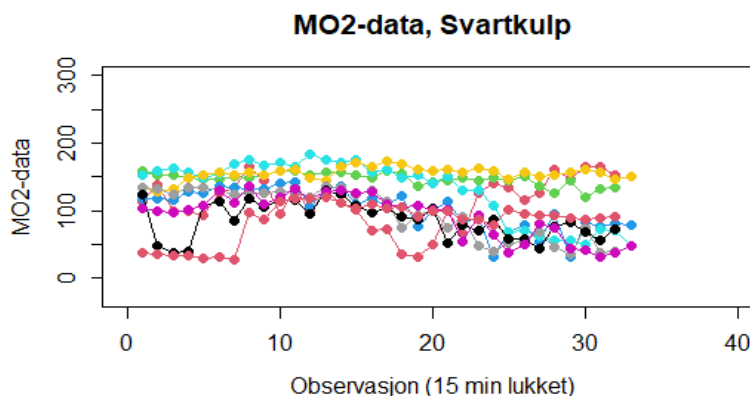
### 3.2 Respirometrieforsøk

Figur 18 og 19 viser  $MO_2$ -data for hver fisk og for hver syklus i respirometrieforsøket, for henholdsvis Tjersrudtjern og Svartkulp. Som en kan se av figur 18, kan det se ut til at ved de første syklusene er  $MO_2$ -nivåene noe høyere for fisken fra Tjersrudtjern, før de stabiliseres noe. For noen fisk kan en se at  $MO_2$ -nivåene var variable under hele forsøket.



Figur 18: MO<sub>2</sub>-data (mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) fra Tjernsruardtjern-populasjonen registrert ved hver syklus, dvs. 15 min lukket respirometri.

Figur 19 viser samme type plott, for Svartkulp-populasjonen. MO<sub>2</sub>-verdiene ligger tilsynelatende generelt høyere her enn for Tjernsruardtjern-populasjonen.

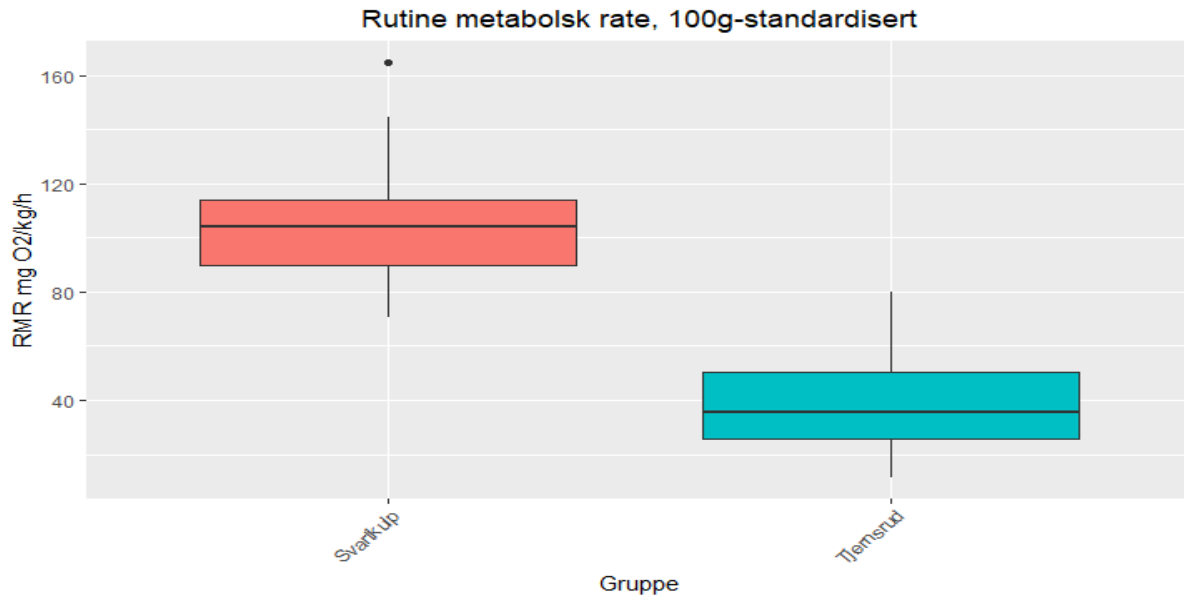


Figur 19: MO<sub>2</sub>-data (mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) fra Svartkulp-populasjonen registrert ved hver syklus, dvs. 15 min lukket respirometri.

### 3.2.1 Rutine metabolsk rate

Rutine metabolsk rate ble beregnet først. Resultatene viser stor spredning mellom gruppene, samt en betydelig variasjon innad i gruppene (figur 20). Dataene er korrigert for temperaturendring under forsøket, samt standardisert til å gi RMR tilsvarende et 100g-individ. Ved en tosidet, ikke-parvis t-test (Welchs t-test) ble det funnet at forskjellen i RMR mellom gruppene er signifikant ( $t=6.0597$ ,  $p\text{-verdi}=4.048e-5$ ). For Svartkulp var gjennomsnittlig RMR 109.2 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, med et standardavvik på 29.2. Tjernsruardtjern hadde gjennomsnittlig RMR på 41.5 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Standardavviket var 19.1. Fisk #2 er tatt ut av figuren og ikke

inkludert i t-testen, fordi en av slangene på respirometeret løsnet under forsøket (se appendiks, vedlegg I).



Figur 20: Resultat av respirometrieforsøk som viser rutine metabolsk rate, RMR, som  $\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , for hver gruppe. De fargede boksene representerer målinger mellom 1. og 3. kvartile. Strekene over og under boksen representerer de høyeste og laveste verdiene innenfor  $1.5 * \text{IQR}$  (interkvartile avstanden mellom 1. og 3. kvartile). Verdier utenfor denne avstanden illustreres punktvis. (Svartkulp  $n=9$ , Tjernsrudtjern  $n=12$ ).

### 3.2.2 Standard metabolsk rate

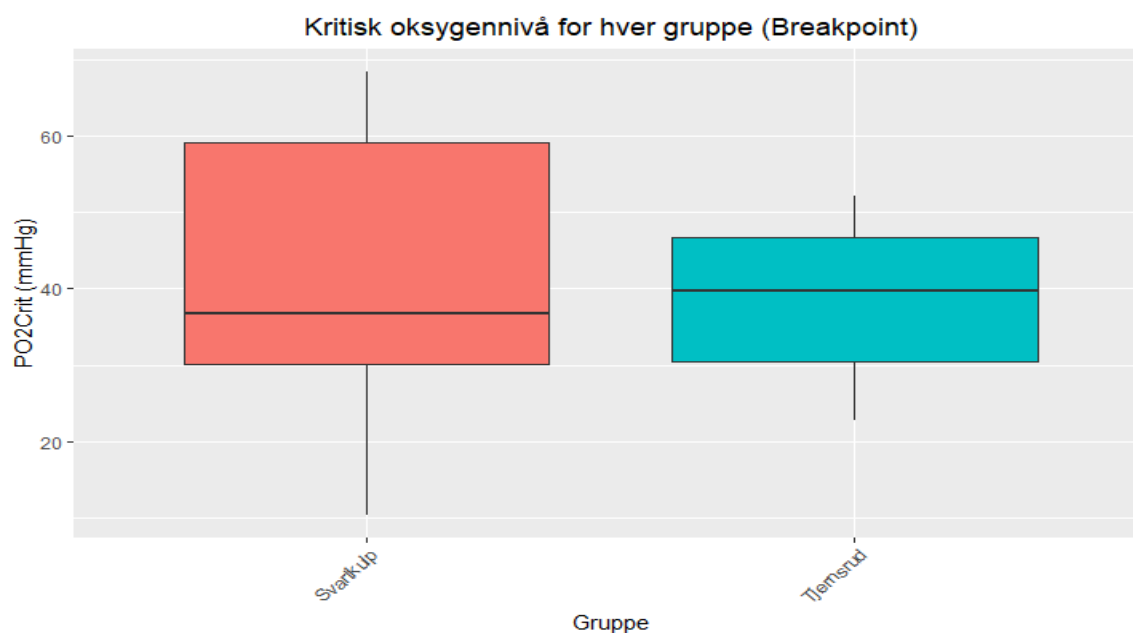
Etter beregning av RMR ble SMR beregnet som gjennomsnittet av de 10 % laveste  $\text{MO}_2$ -observasjonene. Resultatene i figur 21 viser en klar spredning mellom gruppene. Dataene er korrigert for temperaturendring under forsøket, samt standardisert til å gi SMR tilsvarende et 100g-individ. Welch's t-test ga et signifikant forskjellig resultat mellom gruppene ( $t=8.7794$ ,  $p\text{-verdi}=1.819\text{e-}5$ ). Gjennomsnittlig SMR for Svartkulp var  $39.9 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , og standardavviket var 6.7. For Tjernsrudtjern var gjennomsnittlig SMR  $15.7 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , og standardavviket var 3.8. Ved Svartkulp kan det observeres to store avvik (fisk #6 og 14), som ble tatt ut av dataene før testing. Det lave avviket ved Tjernsrudtjern er fisk #2, hvor det løsnet en slange fra respirometrikammeret under forsøket, slik at det ikke er blitt registrert korrekt  $\text{MO}_2$  (se appendiks, vedlegg I). Denne ble også tatt ut av datasettet før testing. Det ble også funnet en klar korrelasjon mellom SMR og kroppsvekt ( $\rho=0.69$ ,  $p\text{-verdi}=0.001$ , Spearman's rank korrelasjonstest).



Figur 21: Resultat av respirometrisørsøk som viser standard metabolsk rate, SMR som  $\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , for hver gruppe. De fargede boksene representerer målinger mellom 1. og 3. kvartile. Strekene over og under boksen representerer de høyeste og laveste verdiene innenfor  $1.5 * \text{IQR}$  (interkvartile avstanden mellom 1. og 3. kvartile). Verdier utenfor denne avstanden illustreres punktvis. (Svartkulp  $n=7$ , Tjernsrudtjern  $n=12$ ).

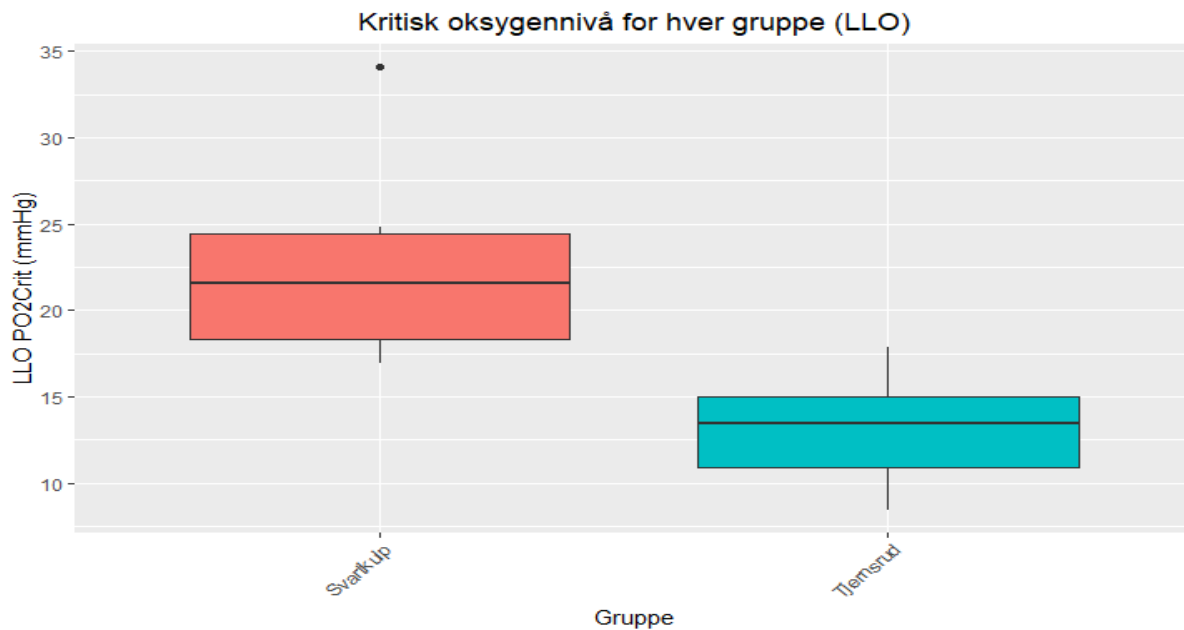
### 3.2.3 Kritisk oksygennivå

$\text{PO}_{2\text{crit}}$  ble først beregnet med «breakpoint»-metoden. Resultatet viser at de to populasjonene ligger nær hverandre i «breakpoint»- $\text{PO}_{2\text{crit}}$  (figur 22). Gjennomsnittlig «breakpoint»- $\text{PO}_{2\text{crit}}$  for Svartkulp var 41.61 mmHg, med et standardavvik på 20.50. Tjernsrudtjern hadde gjennomsnittlig «breakpoint»- $\text{PO}_{2\text{crit}}$  på 38.40 mmHg, og et standardavvik på 11.43. Welchs t-test gir et ikke signifikant resultat mellom populasjonene ( $t=0.38057$ ,  $p\text{-verdi}=7.106e-1$ ). Fisk# 2, 7, 10, 16, 19, 20, 21 er tatt ut, da det ikke var mulig å gjøre de to regresjonene slik at de dannet den karakteristiske «broken stick»-formen (se appendiks, vedlegg I).



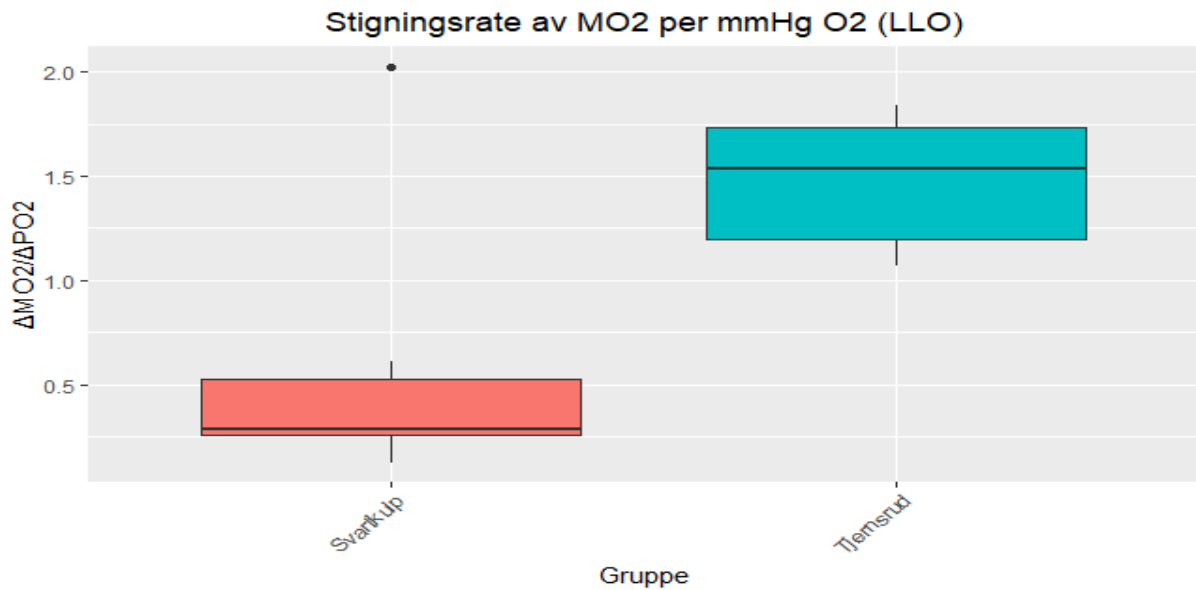
Figur 22: Resultat av respirometrisørsøk som viser kritisk oksygenivå,  $PO_{2Crit}$  som mmHg for hver gruppe, regnet ut ved «breakpoint»-metoden. De fargede boksene representerer målinger mellom 1. og 3. kvartile. Strekene over og under boksen representerer de høyeste og laveste verdiene innenfor  $1.5 * IQR$  (interkvartile avstanden mellom 1. og 3. kvartile). (Svartkulp  $n=8$ , Tjernsrudtjern  $n=7$ ).

Figur 23 viser resultat av «Low Linear Oxygen»- $PO_{2Crit}$  utregningen. Her ses en tydelig forskjell mellom populasjonene, i kontrast til «Breakpoint»- $PO_{2Crit}$ . Gjennomsnittlig LLO  $PO_{2Crit}$  for Svartkulp var 22.79 mmHg, og standardavviket var 6.33. For Tjernsrudtjern var gjennomsnittet 13.30 mmHg, med et standardavvik på 3.39, et klart lavere nivå enn for Svartkulp. Det var signifikant forskjell i LLO  $PO_{2Crit}$  mellom gruppene (Welchs t-test:  $t=3.3334$ ,  $p\text{-verdi}=1.22e-2$ ). Fisk# 2, 6, 7, 14, 16, 19, 20 og 21 er tatt ut, da det ikke var mulig å gjøre regresjon på  $MO_2 < SMR$  for disse (se appendiks, vedlegg I). Også for  $PO_{2Crit}$  er det en klar korrelasjon med kroppsvekt ( $\rho=0.58$ ,  $p\text{-verdi}=0.03$ , Spearmans rank korrelasjonstest).



Figur 23: Resultat av respirometrisørsøk som viser kritisk oksygenivå,  $PO_{2crit}$  som mmHg for hver gruppe, regnet ut ved «low linear oxygen»-metoden (Reemeyer & Rees, 2019). De fargede boksene representerer målinger mellom 1. og 3. kvartile. Strekene over og under boksen representerer de høyeste og laveste verdiene innenfor  $1.5 * IQR$  (interkvartile avstanden mellom 1. og 3. kvartile). Verdier utenfor denne avstanden illustreres punktvis. (Svartkulp  $n=6$ , Tjærnsrudtjern  $n=8$ ).

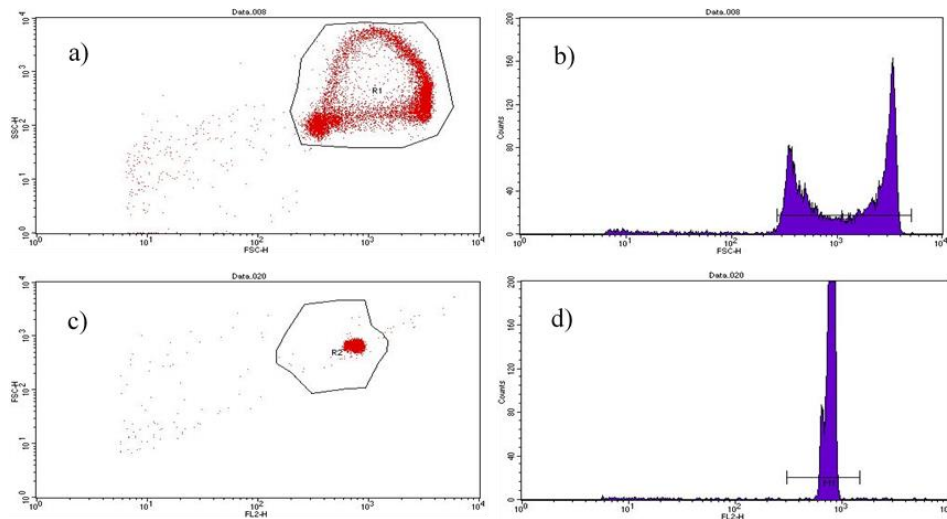
Stigningsraten av  $MO_2$  ( $mg\ O_2\ l^{-1}\ h^{-1}$ ) per økning i  $PO_2$  (mmHg) av regresjonen av  $MO_2 < SMR$  ble også utregnet for hver populasjon. Resultatet i figur 24 viser en klar forskjell mellom populasjonene. Welch's t-test bekrefter at det er signifikant forskjell i stigningsraten av  $MO_2$  under SMR ( $t=-2.7165$ ,  $p\text{-verdi}=0.02963$ ). Gjennomsnittlig stigningsrate for Svartkulp var  $0.60\ mg\ O_2\ l^{-1}\ h^{-1}\ mmHg^{-1}$ , med et standardavvik på 0.71. For Tjærnsrudtjern var gjennomsnittet  $1.46\ mg\ O_2\ l^{-1}\ h^{-1}\ mmHg^{-1}$ , og standardavviket 0.33. Fisk# 2, 6, 7, 14, 15, 16, 19, 20, 21 og 22 er tatt ut, da det ikke var mulig å gjøre regresjon på  $MO_2 < SMR$  for disse (se appendiks, vedlegg I).



Figur 24: Resultat av respirometrisørsøk som viser stigningsraten av MO<sub>2</sub> modellert på PO<sub>2</sub>, for MO<sub>2</sub>-verdier under SMR. De fargede boksene representerer målinger mellom 1. og 3. kvartile. Strekene over og under boksen representerer de høyeste og laveste verdiene innenfor 1.5 \* IQR (interkvartile avstanden mellom 1. og 3. kvartile). Verdier utenfor denne avstanden illustreres punktvis. (Svartkulp n=6, Tjernstud n=6).

### 3.3 Flowcytometri

Figur 25 viser et eksempel på den grafiske fremstillingen flowcytometri, FCM gir. Prøver som ikke tilfredsstilte de karakteristiske strukturene vist her ble ekskludert fra statistiske beregninger og tester (se figur 28). Data som ikke viste de karakteristiske trekkene illustrert i figur ble ikke inkludert i testene.

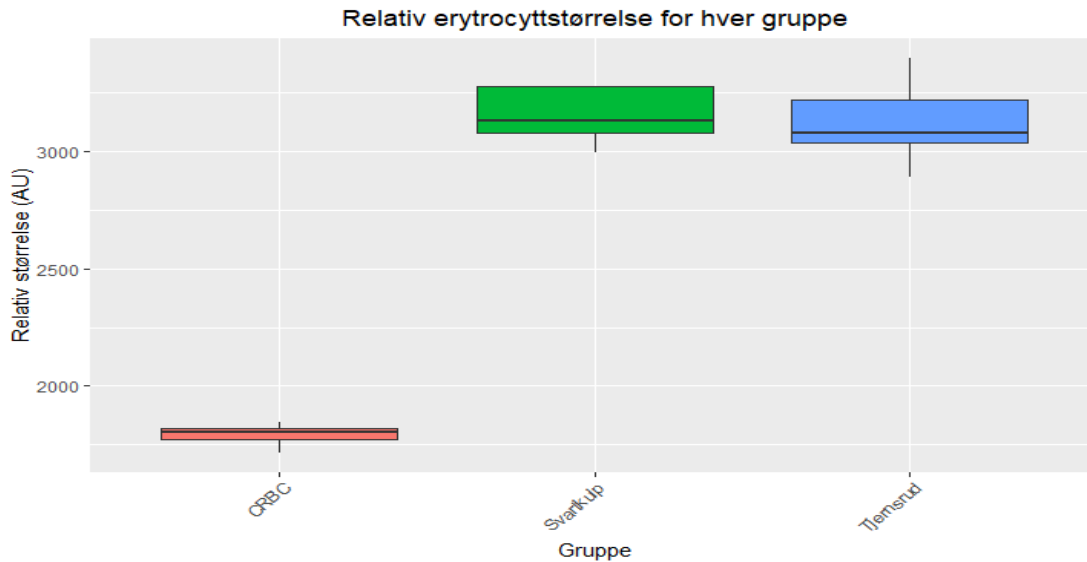


Figur 25: Eksempel på plotts som fremstilles ved hver prøve i FCM-analyser. Disse er representative for data som ble inkludert i statistiske tester. a) Dotplott av erythrocytter lest av FSC-H og SSC-H. Viser karakteristisk struktur som dannes av den semikonkave diskformen til erythrocytter. b) Histogram av erythrocytter på FSC-H, der peak channel er toppen til høyre. c) Dotplott av erythrocytter farget med propidium iodide, lest av FL2-H og FSC-H. d) Histogram av erythrocytter farget med propidium iodide, lest av FL2-H.



### 3.3.1 Relativ erytrocyttstørrelse

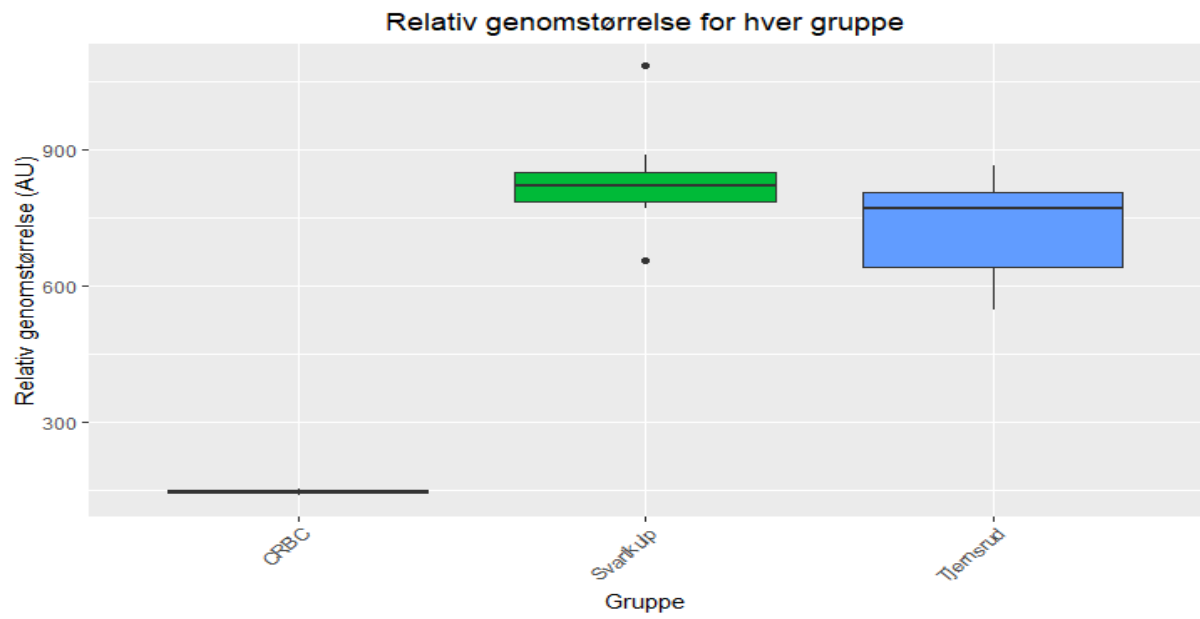
Figur 26 viser at det tilsynelatende ikke er noen forskjell i erytrocyttstørrelse mellom populasjonene. Dette underbygges av resultatet fra Wilcoxon rank sum-testen ( $W=22.5$ ,  $p$ -verdi=0.7662). Fisk # 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 13 er ikke inkludert i testen (se appendiks, vedlegg I).



Figur 26: Plottet viser resultatene av FCM-målinger med FSC-sensoren. Til venstre vises den relative størrelsen observert fra Chicken Red Blood Cells, CRBC-standarden. På y-aksen er relativ størrelse, oppgitt som «peak channel» eller kanalen hvor det ble registrert flest verdier under målingen. Denne enheten kan også beskrives som arbitrære enheter, AU. (Svartkulp  $n=6$ , Tjernsrudtjern  $n=9$ ).

### 3.3.2 Relativ genomstørrelse

Figur 27 viser ingen tegn til forskjell i genomstørrelse mellom populasjonen fra Svartkulp og populasjonen fra Tjernsrudtjern. Wilcoxon rank sum-testen bekrefter dette med et ikke-signifikant resultat ( $W=39$ ,  $p$ -verdi=0.2227). Fisk # 1, 2, 3, 4, 5, 14 og 16 er ikke inkludert i testen (se appendiks, vedlegg I).



*Figur 27:* Plottet viser resultatene av FCM-målinger med FL2-sensoren. Til venstre vises den relative størrelsen observert fra Chicken Red Blood Cells, CRBC-standarden. På y-aksen er relativ størrelse, oppgitt som «peak channel» eller kanalen hvor det ble registrert flest verdier under målingen. Denne enheten kan også beskrives som arbitrære enheter, AU. (Svartkulp n=7, Tjernesrudtjern n=8).

## 4 Diskusjon

### 4.1 Miljøbetingelser

Det var stor forskjell i kroppsstørrelse mellom populasjonene. Fisken fra Svartkulp hadde en gjennomsnittlig vekt på 130.8 g, med standardavvik på 47.9 g. Fisken fra Tjernsrudtjern hadde gjennomsnittlig vekt på 44.8 g, og et standardavvik på 4.4 g. Disse resultatene, sammen med antall fisk fanget (9 fra Svartkulp, >150 fra Tjernsrudtjern) gjenspeiler godt det tidligere nevnte mønsteret om at i tjern hvor karuss er eneste art som overlever på grunn av dens toleranse for anoksi, er det flere, og mindre individer (Brönmark & Hansson, 2005). Det ble også bekreftet at rovfisk som abbor og gjedde er til stede i Svartkulp. Som nevnt innledningsvis vil tilstedeværelse av predatorer føre til størrelsesseleksjon på karuss, noe som kan legges til grunn for den observerte forskjellen i kroppsstørrelse mellom populasjonene (Brönmark & Miner, 1992). Tilstedeværelsen av abbor og gjedde bekrefter at Svartkulp er et habitat også for andre fiskearter. I Tjernsrudtjern ble det kun observert karuss, og det er dermed rimelig å anta at dette er et habitat som er mer utsatt for hypoksi og anoksi, grunnet karussens særegne tilstedeværelse og toleranse for slike oksygenivåer. Disse forskjellene i kroppsvekt, antall, samt funnene av rovfiskarter bidrar til å underbygge antagelsen om at de to lokalitetene har forskjellige miljøbetingelser.

#### 4.1.1 CTD-målinger

Ved målinger 10.6.2020 ble det registrert gode O<sub>2</sub>-profiler som viser at det er høye verdier av oksygen (~9 mg/l, normoksi) i de øvre sjiktene, både ved Svartkulp og Tjernsrudtjern (figur 12 og 13). Dette kan forklares med en våroppblomstring av alger som bidrar til en netto positiv O<sub>2</sub>-produksjon (Brönmark & Hansson, 2005). Ved Tjernsrudtjern 26.8.2020 kan man se at oksygenivåene er tydelig lavere enn målingen fra juni, som samsvarer med en stagnering av vannet om sensommeren. Her faller O<sub>2</sub>-konsentrasjonen til ca. 3 mg/l (hypoksi) allerede ved 1 meters dyp, og faller videre ned mot 0 mg/l (anoksi) fra 2 m – 2.5 m (figur 15). For Svartkulp ble det ikke registrert en god oksygenprofil 26.8.2020 (figur 14).

Selv om O<sub>2</sub>-sensoren ikke ga optimale resultater, ble det også registrert fotosyntetisk aktiv stråling, temperatur og ledningsevne med CTD-sensoren. PAR-sensoren registrerer fotosyntetisk aktiv stråling, og gir et mål på hvor mye lys som penetrerer gjennom vannsøylen, som er korrelert med mengden organisk materiale i vannet. Som sett av resultatene viser alle profilene at PAR-verdiene ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) raskt faller med dypet. Det ser ut

til at den eufotiske sonen (>1% av PAR ved overflaten) er veldig smal, i begge tjernene. Dette indikerer at begge vannene er hummuspåvirket, ved at innkommende stråling raskt blokkeres av organisk materiale suspendert i vannsøylen (Jones, 1992). Det er altså store mengder organisk materiale i vannet, som tyder på tidvis høy primærproduksjon. På den andre siden vil akkumulering av organisk materiale også føre til at den eufotiske sonen minkes, og primærproduksjonen dempes i mangel på lys, slik at det på et punkt blir en netto negativ produksjon av O<sub>2</sub>, da nedbrytningsprosessene av det organiske materialet skjer raskere enn produksjonen. Dette illustrerer det innledningsvis nevnte syklusen av oksygenivåer, hvor høy primærproduksjon om våren og tidlig sommer fører til en netto positiv O<sub>2</sub>-produksjon, fulgt av en netto negativ O<sub>2</sub>-produksjon om sensommeren (kapittel 1.4) (Brönmark & Hansson, 2005). Den tydeligste indikatoren fra CTD-dataene på at tjernene er forskjellig kan ses i ledningsevne. Ledningsevne er direkte korrelert med total mengde løste salter, og gir dermed et innblikk i næringssaltinnholdet i vannet (Wetzel, 2001). I Svartkulp kan det ses av CTD-plottene at ledningsevnen ligger mellom 0.02 og 0.04 mS/cm i vannsøylen. I de dypeste sjiktene øker ledningsevnen noe. I Tjersrudtjern viser dataene en annen situasjon; her er ledningsevnen i intervallet 0.4 til 0.6 mS/cm i vannsøylen. Dette viser at Tjersrudtjern har mer næringssalter suspendert i vannsøylen. Økte mengder næringssalter, i særlig grad fosfor, er forbundet med eutrofiering, som fører til en økt primærproduksjon. En slik økning i produksjon forsterker stagningen av vannet om sensommeren, ved at dødt organisk materiale blokkerer lyset som trengs for videre primærproduksjon, samt at nedbrytningsprosesser forbraker tilgjengelig oksygen (Brönmark & Hansson, 2005).

Det er problematisk å kvantifisere forskjeller i oksygenivå mellom to vann gjennom ett år, da dette varierer betydelig både på temporær og spatial skala, i tillegg til at det som nevnt var problemer med oksygensensoren. Det er allikevel vist at andre fiskearter også er til stede i Svartkulp, men ikke i Tjersrudtjern. Samtidig viser CTD-analysene, med særlig fokus på ledningsevne-variabelen, at Tjersrudtjern har potensiale for en høyere produktivitet enn Svartkulp, og dermed er mer utsatt for ekstremt lave oksygenivåer om sensommeren. Forskjellene i miljøbetingelser ble derfor definert som kategoriske forklaringsvariabler, «Tjersrudtjern» og «Svartkulp», for eventuelle forskjeller i fysiologiske egenskaper hos karussen.

#### 4.1.2 Gassmålinger

Gassmålingene fra 10.6.2020 og 26.8.2020 ga for alle prøver oksygenverdier mellom 180000 og 210000 ppm, noe som er tilnærmet likt oksygenandelen i atmosfæren på 21 %, og

resultatene ble dermed forkastet, da dette ikke representerer et realistisk bilde på oksygenkonsentrasjonen i vannene. Imidlertid viser resultater fra «100-sjøers prosjektet» ved Universitetet i Oslo, Institutt for biovitenskap, AQVA-seksjonen at det er lave verdier for O<sub>2</sub> i Tjersrudtjern, med hypoksi allerede ved 1.5 meters dyp (tabell 3). Disse målingene ble gjort på vinterstid, da tjernet er dekket av is, og det var forventet netto negativ oksygenproduksjon. Det ble også funnet svært høye verdier av metan, CH<sub>4</sub>, i de lavere sjiktene, som tyder på en høy anaerob bakteriell metabolsk aktivitet (Yang et al., 2015). Disse funnene illustrerer at oksygenkonsentrasjonen i Tjersrudtjern når svært lave nivåer også om vinteren.

Tabell 3: Tabellen viser pH, oksygenkonsentrasjon, temperatur og metan langs en dybdegradient fra Tjersrudtjern. Dataene er samlet inn i regi av "100-sjøers prosjektet" ved Universitetet i Oslo, Institutt for biovitenskap, AQVA-seksjonen.

	Date	Sample	Depth (m)	pH	O <sub>2</sub> (mg/L)	T (°C)	CH <sub>4</sub> (ppm)
Tjersrudstjernet	10.02.2021	A1	0	6.7	7.67	0.48	17.13
Tjersrudstjernet	10.02.2021	A2	1	6.45	2.98	0.45	8.97
Tjersrudstjernet	10.02.2021	A3	1.5	6.47	1.81	2.44	12.09
Tjersrudstjernet	10.02.2021	A4	2	6.45	0.76	3.03	355.31
Tjersrudstjernet	10.02.2021	A5	2.5	6.67	0.36	4.18	2412.24

## 4.2 Metabolsk rate

Resultatene viser en signifikant forskjell i rutine metabolsk rate ( $t=6.0597$ ,  $p\text{-verdi}=4.048e-05$ ). For standard metabolsk rate ga t-testen også signifikant forskjell mellom populasjonene ( $t=8.7794$ ,  $p\text{-verdi}=1.819e-05$ ). Dette var som forventet ved den framsatte hypotesen, og indikerer at populasjonen fra Tjersrudtjern har en langsommere MO<sub>2</sub> enn populasjonen fra Svartkulp. Denne forskjellen i MO<sub>2</sub> bidrar til at karussen i Tjersrudtjern forbruker mindre O<sub>2</sub> per tidsenhet, og dermed vil være mer robust mot lave oksygenivåer.

### 4.2.1 Rutine metabolsk rate

Tjersrudtjern hadde gjennomsnittlig RMR på 41.5 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, med et standardavvik på 19.1. Svartkulp hadde en gjennomsnittlig RMR på 109.2 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, med et standardavvik på 29.2. RMR er regnet ut som gjennomsnitt av ~40 respirometrisykluser. Det er tydelig at det

er stor forskjell i oksygenopptak mellom populasjonene. I karussens naturlige habitat vil aktivitet, stress og fordøyelse påvirke RMR konstant, men i et kontrollert miljø under forsøk er det lagt til rette for minst mulig påvirkning fra slike faktorer. Allikevel er en mulig forklaring at fiskene fra Svartkulp var mer stresset i de lukkede respirometrikammerene enn fiskene fra Tjernsrudtjern, til tross for et forsøk på å tilrettelegge ved å bruke større respirometrikammer for Svartkulp-populasjonen. En mulig hypotese for dette kan være at populasjonen fra Svartkulp er utsatt for predasjon, og dermed får en stressreaksjon når de ikke har mulighet til å bevege seg bort fra en eventuell predator. En slik forskjell i stressnivå mellom populasjonene vil i så fall gi utslag på RMR-resultatene ved at stressede fisk har et høyere aktivitetsnivå, og dermed forbruker mer  $O_2$  enn ustressede fisk (Ultsch et al., 1980).

#### 4.2.2 Standard metabolsk rate

Det var signifikant forskjell i SMR. For Tjernsrudtjern var gjennomsnittlig SMR  $15.7 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Populasjonen fra Svartkulp hadde gjennomsnittlig SMR på  $39.9 \text{ mg } O_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Standardavvikene var henholdsvis 3.8 og 6.7. Populasjonen fra Tjernsrudtjern har en signifikant lavere SMR enn populasjonen fra Svartkulp, som betyr at fiskene fra Tjernsrudtjern forbruker mindre oksygen per tidsenhet enn fiskene fra Svartkulp, når de er i en hvilende tilstand. Ved å ha lavere SMR kan man forvente at også  $PO_{2\text{Crit}}$  forskyves ned (Fry & Hart, 1948), slik at fisken fra Tjernsrudtjern kan tolerere lavere oksygenivåer før aerob respirasjon ikke tilfredsstiller det metabolske energikravet.

#### 4.3 Kritisk oksygenivå

Kritisk oksygenivå,  $PO_{2\text{Crit}}$ , ble regnet ut ved to forskjellige metoder, «Breakpoint»- og «Low Linear Oxygen»-metodene, som beskrevet i kapittel 2.4. For «Breakpoint»-metoden var det ved t-test ikke signifikant forskjell mellom populasjonene ( $t=0.38057$ ,  $p\text{-verdi}=0.7106$ ). LLO-metoden ga derimot signifikant forskjell mellom populasjonene ( $t=3.3334$ ,  $p\text{-verdi}=0.0122$ ). Hvilken utregningsmetode som brukes for å regne ut  $PO_{2\text{Crit}}$  kan ha stor betydning for hvilket resultat man får, og disse dataene underbygger dette. Som Reemeyer and Rees (2019) konstaterer, er det derfor viktig at det etableres en standard for hvilken metode som brukes. «Breakpoint»-metoden er tradisjonelt en av de mest anvendte metodene, men har også en betydelig risiko for å overestimere den reelle oksygenkonsentrasjonen hvor opptaket blir betinget av  $PO_2$ . Dette kommer av at «breakpoint»-modellen bruker skjæringspunktet mellom de lineære regresjonene for oksygenkonformerende og oksygenregulerende  $MO_2$ -verdier som estimat for  $PO_{2\text{Crit}}$  (Ultsch & Regan, 2019). Om fisken ikke er ved en hvilende tilstand under forsøket, vil de oksygenregulerende  $MO_2$ -verdiene

ligge mellom maksimal  $MO_2$  og minimal  $MO_2$  (SMR). Den lineære regresjonen vil dermed ligge ved en høyere grenseverdi av  $MO_2$ , slik at  $PO_2$ -nivået som sammenfaller med skjæringspunktet forskyves mot høyre (se figur 6 og 7). Resultatene viser at «Breakpoint»-metoden gir høyere estimater for  $PO_{2Crit}$  enn LLO-metoden, for begge populasjonene. Derfor legges det til grunn at LLO-metoden gir et riktigere estimat av  $PO_{2Crit}$ , da det er vist at LLO-metoden gir verdier som er mer konsistente på tvers av forsøk (Reemeyer & Rees, 2019).

Denne metoden ga som nevnt et resultat som viser signifikant forskjell mellom populasjonene. For Tjernsrudtjern var gjennomsnittlig  $PO_{2Crit}$  13.30 mmHg, med et standardavvik på 3.39. Populasjonen fra Svartkulp hadde gjennomsnittlig  $PO_{2Crit}$  på 22.79 mmHg, med et standardavvik på 6.33. Dette betyr at populasjonene kan opprettholde standard metabolsk rate ved en oksygenmetning på henholdsvis 8.45 og 14.47 %. Dette var som forventet av hypotesen, da karussen i Tjernsrudtjern er mer eksponert for hypoksi enn karussen fra Svartkulp, og dermed øker sin hypoksitoleranse ved å kunne drive suffisient aerob respirasjon ved lavere oksygennivåer enn sin motpart. For teleoste fisk generelt er dette svært lave nivåer, og de sammenfaller godt med tidligere funn (Fu et al., 2011; Sollid et al., 2003).

I studien til Fu et al. (2011) ble gullfisk akklimatisert til hypoksi ( $0.3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) i 48 timer. I tillegg ble en gruppe akklimatisert til høyt aktivitetsnivå, ved 70 % av maksimal aerob svømmehastighet i 48 timer.  $PO_{2Crit}$  ble så målt, og sammenlignet med en kontrollgruppe akklimatisert til normoksi. Resultatene viste en reduksjon i  $PO_{2Crit}$  på henholdsvis 49 og 39 % sammenlignet med kontrollgruppen.  $PO_{2Crit}$  for hypoksigruppen var 11.63 mmHg. For høyaktivitetsgruppen var  $PO_{2Crit}$  14.08 mmHg. Kontrollgruppen hadde signifikant høyere  $PO_{2Crit}$ , på 22.97 mmHg. Nivåene for forsøksgruppene ligger tett opptil resultatet for Tjernsrudtjernpopulasjonen i denne studien (13.30 mmHg). Normoksi-gruppen har tilnærmet identisk  $PO_{2Crit}$  som Svartkulp-populasjonen (22.97 mmHg, 22.79 mmHg, respektivt). Reduksjonen av  $PO_{2Crit}$  ble forklart med en økning i respirasjonsoverflate og økt hematocrit. En overføring av denne forklaringen til denne studien vil indikere at karussen fra Tjernsrud har høyere respirasjonsoverflate og hematocrit-nivå enn populasjonen fra Svartkulp. Det er viktig å bemerke at i denne studien er begge populasjoner akklimatisert i 1 uke til normoksi, til forskjell fra studien til Fu et al. (2011). Det er i tillegg studert to forskjellige arter i *Carassius*-slekten. De sammenfallende  $PO_{2Crit}$ -nivåene fra de to studiene tyder på at karuss som over lang tid, og gjentatte ganger utsettes for hypoksi og anoksi har en varende plastisk tilpasning til lave  $O_2$ -nivåer. Sollid et al. (2003) viser i sin studie at karuss med dekkede lameller har

$PO_{2\text{crit}}$ -nivåer ved  $1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ , som ved  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  vil tilsvare  $13.9 \text{ mmHg}$ . Karuss med eksponerte lameller hadde  $PO_{2\text{crit}}$  på  $0.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ , som vil tilsvare  $7.0 \text{ mmHg}$ . Det kan ses at resultatet fra Tjernsrudtjern ligger nært gruppen med dekkede lameller i nevnte studie, som antyder at karussen fra Tjernsrudtjern ikke har en større respirasjonsoverflate ved normalt tilstand, men kan ha en evne til å raskere omstille og applikere denne mekanismen ved akutt eksponering til hypoksi.

Stigningsraten av  $MO_2$  ( $\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) per økning i  $PO_2$  ( $\text{mmHg}$ ) av regresjonen av  $MO_2 < \text{SMR}$  ble også utregnet for hver populasjon. Resultatet i figur 24 viser en klar forskjell mellom populasjonene. Welchs t-test bekrefter at det er signifikant forskjell i stigningsraten av  $MO_2$  under SMR ( $t = -2.7165$ ,  $p\text{-verdi} = 0.02963$ ).

Stigningsraten av  $MO_2$  ( $\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) per økning i  $PO_2$  ( $\text{mmHg}$ ) av regresjonen av  $MO_2 < \text{SMR}$  var signifikant forskjellig mellom gruppene ( $t = -2.7165$ ,  $p\text{-verdi} = 0.02963$ ). Som sett av figur x har populasjonen fra Tjernsrudtjern (gjennomsnitt =  $1.48$ , standardavvik =  $0.33$ ) høyere stigningsrate enn populasjonen fra Svartkulp (gjennomsnitt =  $0.60$ , standardavvik =  $0.72$ ). Denne stigningsraten, kalt alpha, eller «oxygen supply capacity» har enheten  $\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$ , og er et mål på hvor mye oksygen en organisme klarer å utvinne fra miljøet når  $MO_2$  er begrenset av  $PO_2$ -nivået (Seibel & Deutsch, 2020). En høy stigningsrate er forbundet med lavere  $PO_{2\text{crit}}$ . Det bekreftes dermed ytterligere at karussen i Tjernsrudtjern har et mer effektivt oksygenopptak enn karussen fra Svartkulp, og er bedre tilpasset lave oksygenivåer.

## 4.4 Erytrocyttstørrelse og genomstørrelse

### 4.4.1 Har populasjonene forskjellig erytrocyttstørrelse?

Ettersom erytrocyttstørrelse og genomstørrelse kun var uttrykt ved relative verdier ble det gjort både en Welchs t-test og Wilcoxon rank sum-test. Begge testene ga tilsvarende resultat, men da den ikke-parametriske Wilcoxon rank sum-testen ikke påvirkes av relative verdier legges denne til grunn for diskusjonen og konkluderingen rundt resultatet. Det var ingen signifikant forskjell mellom populasjonene i erytrocyttstørrelse ( $W = 22.5$ ,  $p\text{-verdi} = 0.7662$ ). Resultatene fra respirometrisforsøket styrket initialt hypotesen om at erytrocyttene fra Tjernsrudtjern ville være mindre, for å muliggjøre mer effektivt oksygenopptak og lavere  $PO_{2\text{crit}}$ . Basert på at erytrocyttvolum i teleoste fisk er sterkere korrelert med oksygentransport enn kjernevolum (Lay & Baldwin, 1999), kan  $PO_{2\text{crit}}$ -resultatet antyde at ved lave



oksygennivåer vil karussen fra Tjernsrudtjern kunne utnytte mer O<sub>2</sub> fra omgivelsene, og dette kunne vært forklart med at diffusjonsavstanden var kortere på grunn av mindre erythrocytter. Noen slik forskjell i erythrocyttvolum ble imidlertid ikke påvist, noe som indikerer at den sterkere korrelasjonen mellom erythrocyttvolum og oksygentransport beskrevet av Lay and Baldwin (1999) i større grad gjelder når man studerer interspesifikke populasjoner. Dette tyder på at det vil være andre mekanismer enn erythrocyttstørrelse som regulerer hypoksitoleranse hos karuss, og at erythrocyttstørrelse er en mer konservert egenskap. Andre faktorer relatert til erythrocyttegenskaper som kan være forklarende for forskjellene i kritisk oksygennivå mellom de to populasjonene kan være erythrocyttantall, hemoglobinaffinitet og hematocrit. Det er kjent at *Carassius*-slekten har svært høy hemoglobinaffinitet for oksygen (Burggren, 1982), og hvorvidt dette kan variere på tvers av populasjoner kan være interessant å belyse i videre studier.

#### 4.4.2 Har populasjonene forskjellig genomstørrelse?

Det ble ikke funnet signifikant forskjell i genomstørrelse mellom populasjonene med Wilcoxon rank sum-testen ( $W=39$ ,  $p\text{-verdi}=0.2227$ ). Det var antatt at en observert forskjell i erythrocyttstørrelse kunne vært forklart av en forskjell i genomstørrelse, da genomstørrelse er sterkt korrelert med kjernevolum, som igjen er korrelert med cellevolum (Cavalier-Smith, 2005). Ingen av disse forskjellene ble observert. I lys av dette resultatet, samt at erythrocyttstørrelse synes å være sterkere korrelert med oksygentransport enn kjernevolum (Lay & Baldwin, 1999), er det ikke belegg for å si at genomstørrelse er en forklarende faktor for forskjeller i MO<sub>2</sub> og PO<sub>2Crit</sub> mellom disse populasjonene, noe som kanskje må forventes siden både erythrocyttstørrelse og genomstørrelse som regel er konserverte egenskaper (Gregory, 2005).

#### 4.4.3 utfordringer ved FCM-analyse

De absolutte verdiene for erythrocyttstørrelse og genomstørrelse lot seg ikke beregne korrekt. For erythrocyttstørrelse var det tenkt at diameteren langs den lengste akse (CLD) var proporsjonal med den høyeste toppen i FSC-histogrammene. Ved utregning med formel 6, med CRBC-standarden som referanse, ble det funnet verdier som var langt høyere enn hva som ble sett i mikroskopet. Mikroskopet viste at CLD var mellom 13-16 µm. Både måleokular og digital grafisk måling representerer en betydelig unøyaktighet, da dette baseres på øyemål for hvor grensene på måleintervallet er. Det må også bemerkes at det var usikkerhet rundt kalibreringen av mikroskopet. For Svartkulp var gjennomsnittet av utregningen 24.3 µm, og for Tjernsrudtjern var den 24.0 µm. Data fra gullfisk viser en CLD

på 12.5-14.3  $\mu\text{m}$  (Gregory et al., 2006), og det er liten grunn til å tro at karuss har erythrocytter som er opp mot dobbelt så lange. Valget med å fokusere på diameteren av erythrocyttene ble tatt på bakgrunn en tidligere studie som har analysert erythrocytt diameter ved bruk av FCM (Filipiak, Tylko, & Kilarski, 2012). Etter utregning av diameteren ble det oppdaget at diameter trolig ikke er direkte proporsjonalt med det registrerte signalet, men heller at volum av cellen er dimensjonen som bestemmer signalstyrken. FSC-lyskilden belyser hele partikkelen, og lyset brytes når det treffer overflaten og passerer gjennom erythrocytten, og sensoren registrerer denne brytningen. Ettersom volum skaleres med en potens av radius, vil en «liten» økning i radius/diameter resultere i en større prosentvis økning i volum. Dette kan være en forklaring på hvorfor det ble sett en stor forskjell i signalstyrke mellom CRBC-standarden og erythrocyttene fra karuss.

For genomstørrelsen var også de utregnede verdiene mye større enn forventet. For Svartkulp var gjennomsnittet 14.1 pg og for Tjernerudtjern var det 12.9 pg. Dette vil tilsvare en haploid C-verdi på henholdsvis 7.15 og 6.45 pg, noe som er betydelig større enn alle C-verdier for *Carassius*-slekten listet i databasen til (Gregory et al., 2006). Karuss er her listet med en C-verdi på 2.14 (Vinogradov, 1998). Det ble derfor også usikkerhet rundt kalibreringen av flowcytometeret. Vindeløv, Christensen, and Nissen (1983) viser i sin artikkel at det er problematisk å bruke standarder som har stor differanse i genomstørrelse fra prøvene. I deres forsøk brukes CRBC-celler og TRBC-celler (erythrocytter fra regnbueørret, *Oncorhynchus mykiss*) som standard for å beregne genomstørrelse i menneskelige lymfocytter. Resultatene viser at ved en forskyvning av nullpunktet i FCM-analysen øker feilmarginen betydelig mer ved bruk av CRBC som standard, sammenlignet med når TRBC ble brukt som standard, da TRBC-cellene har en genomstørrelse som ligger tettere opptil lymfocytene (Vindeløv et al., 1983). Om en slik forskyvning er har forekommet i flowcytometeret som ble brukt i denne analysen, kan dette være en forklaring på de store avvikene mellom tilgjengelig data på erythrocytt diameter og genomstørrelse, og verdiene som ble funnet. På grunn av disse avvikene ble det bestemt at forskjeller i erythrocytt størrelse og genomstørrelse mellom populasjonene måtte testes med de relative verdiene fra FCM-forsøket, noe som allikevel gir et inntrykk av relative forskjeller mellom de to lokalitetene.

#### 4.5 Feilkilder

Det var til tider problematisk å registrere  $O_2$ -nivåer med CTD-sensoren, da den ved flere anledninger oppgir negative verdier for oksygenkonsentrasjon. En hypotese for dette var at ved totalt fravær av oksygen ville sensoren registrere feilverdier. Dette ble imidlertid motbevist, da det også ble registrert negative verdier ved overflaten ved sommermålingene, hvor oksygen kontinuerlig vil utveksles mellom atmosfæren og vannet. Der det ikke var mulig å få en god profil av vannsøylen ble det vurdert å bruke verdiene fra når sensoren ble trukket opp av vannet. Det ble imidlertid observert at ved gode målinger både ved nedsenkning og opptrekking, var oksygenverdiene fra opptrekkingen forskjøvet mot venstre. Det ble konkludert med at ved opptrekking skapes det et undertrykk som trekker oksygenfattig vann fra de lavere sjiktene opp langs vannsøylen, slik at disse profilene ikke gir et reelt bilde av oksygenkonsentrasjonen. Den samme problematikken ble observert for de andre sensorene, hvor verdiene blir forskjøvet mot verdier som representerer de dypere sjiktene. Derav ble det tatt et valg på å heller bruke profilene fra nedsenkningen, til tross for varierende kvalitet på  $O_2$ -verdiene.

Ansatte ved akvarieavdelingen hvor fiskene ble oppbevart registrerte at det var et problem med det automatiske lyset i rommet, slik at det ikke hadde skrudd seg av om natten. Lyset ble sjekket og skulle ha vært i orden ved forsøkets start. Det ble allikevel funnet at lyset var på kl. 05:00, torsdag 3.12.2020, da første blokk med forsøk var igangsatt. Dette kan ha innvirkning på RMR, SMR og  $PO_{2crit}$ , dersom fiskene har varierende metabolsk rate over døgnsyklusen (Lefevre, Huong, Phuong, Wang, & Bayley, 2012). Det var imidlertid plassert en mørk presenning over tanken hvor fisken sto, for å skjerme for direkte lys under forsøket. Etter denne datoen skal det automatiske lyset ha fungert som normalt.

For å tilrettelegge for andre forsøk ved akvarieavdelingen ble temperaturen i tankene på et punkt senket fra  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  til  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dette skjedde etter at første blokk allerede var gjennomført. Det er forsøkt å korrigere for denne temperaturendringen, både ved å endre Bunsen-koeffisienten for gassers løselighet i væsker til riktig verdi for de respektive temperaturer, og ved å korrigere for endring i metabolsk rate som følge av endret temperatur, ved hjelp av temperaturkoeffisienten  $Q_{10}$ . Særlig temperaturkoeffisienten representerer her en betydelig feilkilde, da denne er forskjellig fra art til art, og det er uvisst om den også kan variere fra populasjon til populasjon. I denne oppgaven ble  $Q_{10}$ -verdien valgt basert på en tidligere studie på karuss, som fant at i intervallet  $10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$  har karuss en  $Q_{10}$ -verdi på 5.1 (Sollid et

al., 2005). Dette representerer en feilkilde som kan ha påvirket resultatene, da betingelsene for forsøket ble endret, til tross for nevnte korrigerings.

Ved starten av respirometrieforsøket ble det observert at noen fisk virket mer urolig enn andre. Dette kan komme av at fisken blir stresset av å være inne i respirometrikammeret, uten mulighet til å svømme fritt. En forklaring på dette kan ligge i den store variasjonen i kroppsstørrelse, og at store fisk har mer behov for plass enn de mindre fiskene, til tross for at det ble anskaffet nye, og større respirometrikammer for å forhindre unødvendig stress. Det ble observert at opptaksraten stabiliserte seg noe etter 3-4 respirometrisykluser. De første 4 syklusene ble derfor ikke tatt med i beregningen av  $MO_2$ , for å gi fiskene en mulighet til å akklimatisere til respirometrikammeret. Det vil trolig allikevel være forskjeller i stressnivå mellom fiskene, og dette vil påvirke resultatene.

En annen mulig feilkilde ved respirometrieforsøk er om respirometrikammerene, med tilhørende slanger og pumper, har vært helt tette under forsøket. Om det ikke er helt tett vil oksygenmettet vann fra tanken rundt kunne komme inn i kammeret, og vann i kammeret kan lekke ut. Dette vil klart påvirke resultatene. Det ble gjort nøye kvalitetssikring av hvert respirometrikammer ved hver blokk, for å minimere risiko for en slik feilkilde. Ett tilfelle av lekkasje ble oppdaget; i respirometrikammer #2 i første blokk (Fish\_ID 2) løsnet det en tube i løpet av natten, slik at friskt vann kontinuerlig strømmet inn i kammeret, og  $MO_2$  kunne ikke kalkuleres. Det ble logget noen sykluser med åpent/lukket respirometrikammer, før  $PO_2$ -målingene legger seg på et stabilt nivå nær oksygenmetning. Denne fisken er utelatt i alle beregninger og tester fra respirometrieforsøket.

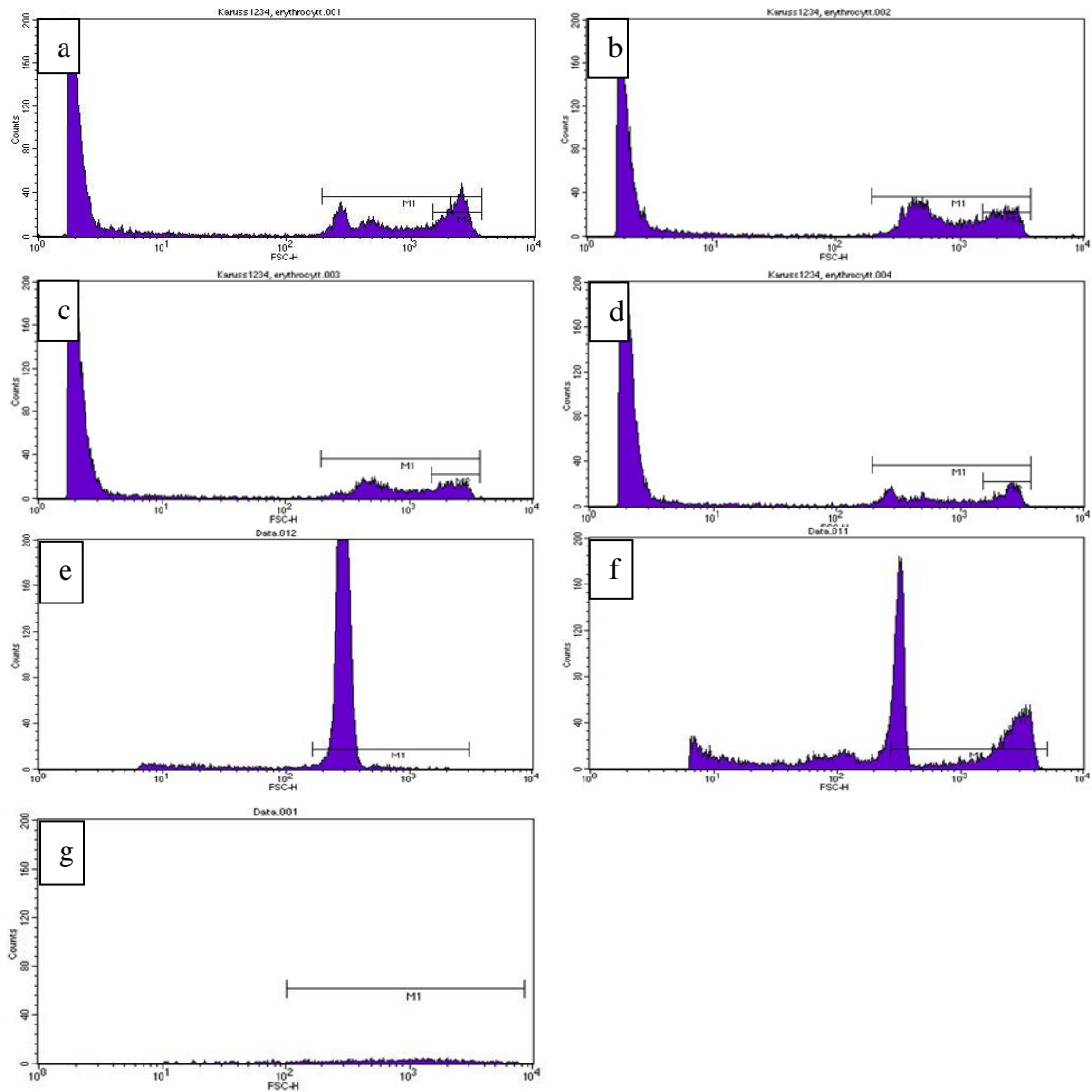
Under vasking av erytrocyttene før flowcytometri-målingene ble én prøve (Fish\_ID 13) ødelagt; det dannet seg ingen pellet av erytrocytter under sentrifugering, og væsken i prøven var lys rød, til forskjell fra de øvrige prøver hvor erytrocyttene dannet en pellet i bunnen av Eppendorf-røret, og supernatanten var blank. Det ble observert at sentrifugen som ble brukt under vaskeprosessen var svært støvete, og det var støvpartikler også nede i åpningen hvor Eppendorf-røret med prøvene plasseres. Om dette kan ha skapt forstyrrelser under sentrifugeringen som har ført til at erytrocyttene ble lysert er usikkert, men det noteres at ren sentrifuge ville vært bedre. En annen mulig forklaring kan være at sprøytespissen eller pipettespissen hadde for smal åpning for cellene, slik at det er blitt dannet en propp ved utsprøyting, og høyt trykk har lysert erytrocyttene. Denne prøven ble ekskludert fra alle beregninger og tester av FSC-resultatene. Grunnen til hvorfor denne prøven ble ødelagt er noe

usikker, men om en av de nevnte teorier stemmer vil dette også være en mulig feilkilde for de øvrige FCM-resultater. Det ble imidlertid ikke observert lignende tilfeller.

Første blokk (Fish\_ID 1, 2, 3, 4) ble i FCM-forsøket analysert med 2000 «events» (partikler, celler) i gate-regionen, i kontrast til øvrige prøver, hvor hver prøve ble analysert med 10 000 «events». Dette påvirker fordelingen i histogrammene, både ved FSC- og FL2-sensorene. Med få «events» blir ikke fordelingene som forventet, og de er ikke representative, da det ikke er mulig å konstatere en tydelig «Peak channel». Første blokk er derfor utelatt fra beregninger og tester av FCM-resultatene.

Erytrocyttene ble vasket før analyse, for å fjerne leukocytter, trombocytter og andre partikler i blodet. Det ble allikevel observert et lavere antall partikler utenfor gate-regionen hvor erytrocyttene vises i FCM-diagrammene. Om det eksisterer partikler innenfor erytrocyttens region er det ikke mulig å separere ut disse fra de ekte erytrocyttene. Dette er en feilkilde som alltid vil være til stede ved FCM-analyser, men som minimeres ved vasking før analyser.

Erytrocytter har en semi-konkav disk-lignende form, og deres orientering mot sensoren er tilfeldig. Dette er illustrert av den bimodale histogramfordelingen erytrocytter gir (Gienger et al., 2019). I denne analysen er erytrocyttstørrelse basert på den høyre toppen i histogrammet, som tilsvarer den største størrelsen erytrocytter har, sett fra et fiksert punkt. For prøve 5 og 6 (Fish\_ID 5, 6) ble det ikke registrert en normal bimodal fordeling, og den høyre toppen kunne ikke bestemmes. Prøve 5 og 6 ble derfor også ekskludert fra FSC-resultatene. Figur 28 illustrerer FSC-histogrammer som representerer kvalitativt vurderte feilmålinger.



*Figur 28:* Her vises histogram av målinger med FSC-H som ikke gir de forventede egenskapene til erythrocytter. Disse individene er utelatt i beregninger av CLD, da det ikke er mulig å hente ut sikre tall på den relative størrelsen fra disse målingene. a) Karuss #1; her er toppen til høyre i diagrammet med, men det er svært få målinger gjort av instrumentet rundt denne toppen, da det i første blokk ikke ble brukt en sterk nok inngangsverdi for målingene, slik at vi ser svært mange observasjoner helt til høyre i histogrammet, som er små partikler, og instrumentet stoppet derfor målingene for tidlig til å kunne bruke resultatene av erythrocyttmålingene. b) Karuss #2; her gjelder samme problemstilling som for karuss #1. Det er heller ingen tydelig topp i området hvor den relative CLD-verdien forventes å ligge. c) Karuss #3; samme problemstilling som for de to foregående. Ingen tydelig topp, og svært få observasjoner. d) Karuss #4; siste fisk i blokk 1. Svært få observasjoner i erythrocytt-området. e) Karuss #5; Første fisk fra Svartkulp. Her vises ikke den tradisjonelle strukturen som dannes av den semikonkave diskformen man vanligvis observerer av FSC-målinger av erythrocytter. Toppen ligger langt vekk fra den forventede CLD-toppen. Resultatet forkastes. f) Karuss #6; Viser en spesiell struktur med to topper, men ikke den intakte formen som erythrocytter skal ha. Toppen som registreres ligger til venstre i histogrammet, altså ikke CLD-toppen. g) Karuss #13; Svært få observasjoner. Ved å se på løsningen i prøverøret var det åpenbart at denne ikke var som resten av prøvene. Enten har cellene lysert, eller klumpet seg grunnet en feil med tilsetning av heparin.

#### 4.6 Forslag til videre forskning

Ved å kategorisere miljøbetingelsene i to kategoriske faktorer, risikerer man at konfunderende forklaringsvariabler overses. Selv om SMR og  $PO_{2\text{Crit}}$  er regnet ut basert på massespesifikk  $MO_2$  og standardisert kroppsvekt, er det en klar korrelasjon mellom kroppsvekt; SMR og  $PO_{2\text{Crit}}$  i denne studien. Det vil derfor være svært nyttig å gjøre en ny analyse med samme oppsett, men med populasjoner hvor gjennomsnittlig kroppsvekt ikke er signifikant forskjellig mellom populasjonene.

Da det ble vist at RMR, SMR og  $PO_{2\text{Crit}}$  er signifikant forskjellig mellom de to populasjonene, men dette ikke forklares av redusert diffusjonsavstand ved mindre erytrocytter, vil det være interessant å trekke inn andre faktorer som kan bidra til å forklare denne forskjellen. Av særlig interesse som en oppfølgingsstudie bør erytrocyttantall, hemoglobinaffinitet, hematocrit og tiden det tar å eksponere lameller analyseres mellom populasjonene.

## 5 Konklusjon

Resultatene i denne studien viser en signifikant forskjell i RMR, SMR,  $PO_{2\text{Crit}}$  og stigningsraten  $MO_2/PO_2$  for  $MO_2 < SMR$  mellom populasjonen fra Tjernsrudtjern og populasjonen fra Svartkulp. Det var ingen signifikant forskjell i erytrocyttstørrelse og genomstørrelse mellom populasjonene. Karussen fra Tjernsrudtjern har lavere RMR, SMR og  $PO_{2\text{Crit}}$  enn karussen fra Svartkulp. Det konkluderes derfor at på bakgrunn av en høyere eksponering til hypoksi har populasjonen fra Tjernsrudtjern tilpassede egenskaper som tillater den å forbruke mindre  $O_2$  ved ikke-kritiske oksygennivåer, og å mer effektivt kunne ta opp  $O_2$  ved kritiske nivåer. Dette bidrar til at karussen i Tjernsrudtjern har en høyere toleranse for hypoksi, og kan spare ressurser på å bruke aerob metabolisme i større grad enn karussen fra Svartkulp.



## 6 Referanser

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
- Aguilar-Alberola, J. A., & Mesquita-Joanes, F. (2014). Breaking the temperature-size rule: Thermal effects on growth, development and fecundity of a crustacean from temporary waters. *Journal of Thermal Biology*, 42, 15-24. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.016>
- Angilletta, M. J., Steury, T. D., & Sears, M. W. (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: Fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and Comparative Biology*, 44(6), 498-509. doi:10.1093/icb/44.6.498
- Beamish, F. W. H. (1964). Influence of Starvation on Standard and Routine Oxygen Consumption. *Transactions of the American Fisheries Society*, 93(1), 103-107. doi:[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1964\)93\[103:IOSOSA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1964)93[103:IOSOSA]2.0.CO;2)
- Beamish, F. W. H., & Mookherjee, P. S. (1964). RESPIRATION OF FISHES WITH SPECIAL EMPHASIS ON STANDARD OXYGEN CONSUMPTION: I. INFLUENCE OF WEIGHT AND TEMPERATURE ON RESPIRATION OF GOLDFISH, *CARASSIUS AURATUS* L. *Canadian Journal of Zoology*, 42(2), 161-175. doi:10.1139/z64-015
- Bergmann, C. (1848). *Ueber die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Größe*. Göttingen: Göttingen: Vandenhoeck und Ruprecht.
- Brönmark, C., & Hansson, L.-A. (2005). *The biology of lakes and ponds* (2nd ed. ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Brönmark, C., & Miner, J., G. . (1992). Predator-Induced Phenotypical Change in Body Morphology in Crucian Carp. *Science*, 258(5086), 1348-1350. doi:10.1126/science.258.5086.1348
- Burggren, W. W. (1982). "Air gulping" improves blood oxygen transport during aquatic hypoxia in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiological Zoology*, 55(4), 327-334. doi:10.1086/physzool.55.4.30155860
- Cavalier-Smith, T. (2005). Economy, Speed and Size Matter: Evolutionary Forces Driving Nuclear Genome Miniaturization and Expansion. *Ann Bot*, 95(1), 147-175. doi:10.1093/aob/mci010
- Chabot, D., Steffensen, J. F., & Farrell, A. P. (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. *J Fish Biol*, 88(1), 81-121. doi:10.1111/jfb.12845

- Colt, J. (2012). *Dissolved Gas Concentration in Water: Computation As Functions of Temperature, Salinity and Pressure*. St. Louis: St. Louis: Elsevier.
- Fagernes, C. E., Stensløkken, K.-O., Røhr, Å. K., Berenbrink, M., Ellefsen, S., & Nilsson, G. E. (2017). Extreme anoxia tolerance in crucian carp and goldfish through neofunctionalization of duplicated genes creating a new ethanol-producing pyruvate decarboxylase pathway. *Sci Rep*, 7(1), 7884-7811. doi:10.1038/s41598-017-07385-4
- Filipiak, M., Tylko, G., & Kilariski, W. (2012). Flow cytometric determination of genome size in European sunbleak *Leucaspis delinatus* (Heckel, 1843). *Fish physiology and biochemistry*, 38(2), 355-362. doi:10.1007/s10695-011-9512-1
- Fry, F. E. J., & Hart, J. S. (1948). The Relation of Temperature to Oxygen Consumption in the Goldfish. *Biol Bull*, 94(1), 66-77. doi:10.2307/1538211
- Fu, S.-J., Brauner, C. J., Cao, Z.-D., Richards, J. G., Peng, J.-L., Dhillon, R., & Wang, Y.-X. (2011). The effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance and swimming performance in goldfish (*Carassius auratus*). *J Exp Biol*, 214(Pt 12), 2080-2088. doi:10.1242/jeb.053132
- Galbraith, D. W., Lambert, G. M., Macas, J., & Dolezel, J. (2001). Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Current protocols in cytometry, Chapter 7, Unit 7.6*. doi:10.1002/0471142956.cy0706s02
- Gienger, J., Gross, H., Ost, V., Bär, M., & Neukammer, J. (2019). Assessment of deformation of human red blood cells in flow cytometry: measurement and simulation of bimodal forward scatter distributions. *Biomedical optics express*, 10(9), 4531-4550. doi:10.1364/BOE.10.004531
- Gray, J. W., & Langlois, R. G. (1986). Chromosome classification and purification using flow cytometry and sorting. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 15(1), 195-235. doi:10.1146/annurev.bb.15.060186.001211
- Gregory, T. R. (2005). *The Evolution of the genome*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Gregory, T. R., Nicol, J. A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I. J., . . . Bennett, M. D. (2006). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Res*, 35(suppl-1), D332-D338. doi:10.1093/nar/gkl828
- Grimes, S. E. (2002). A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine. *RAP publication*, 136.
- Hardie, D. C., & Hebert, P. D. N. (2003). The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. *Génome*, 46(4), 683-706. doi:10.1139/g03-040

- Henry, W. (1803). III. Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*(93), 29-274.
- Hessen, D. O., Daufresne, M., & Leinaas, H. P. (2013). Temperature-size relations from the cellular-genomic perspective. *Biological Reviews*, 88(2), 476-489.  
doi:10.1111/brv.12006
- Hessen, D. O., Jeyasingh, P. D., Neiman, M., & Weider, L. J. (2010). Genome streamlining and the elemental costs of growth. *Trends Ecol Evol*, 25(2), 75-80.  
doi:10.1016/j.tree.2009.08.004
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2018). *Animal physiology* (International fourth edition. ed.). New York: Oxford University Press.
- Holland, R. A., & Forster, R. E. (1966). The effect of size of red cells on the kinetics of their oxygen uptake. *J Gen Physiol*, 49(4), 727-742. doi:10.1085/jgp.49.4.727
- Huang, Q., Zhang, Y., Liu, S., Wang, W., & Luo, Y. (2013). Intraspecific scaling of the resting and maximum metabolic rates of the crucian carp (*Carassius auratus*). *PLoS one*, 8(12), e82837-e82837. doi:10.1371/journal.pone.0082837
- Jalal, M., Wojewodzic, M., Laane, C., & Hessen, D. O. (2013). Larger *Daphnia* at lower temperature: a role for cell size and genome configuration? 1. *Génome*, 56(9), 511-519. doi:10.1139/gen-2013-0004
- Jones, R. I. (1992). The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. *Hydrobiologia (The Hague)*, 229(1), 73-91. doi:10.1007/BF00006992
- Kamshilov, I. M., & Kamshilova, T. B. (2007). Effect of temperature on functional properties of hemoglobin of crucian carp (*Carassius carassius*). *Journal of ichthyology*, 47(6), 469-472. doi:10.1134/S0032945207060069
- Lay, P. A., & Baldwin, J. (1999). What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. *Fish physiology and biochemistry*, 20(1), 31-35. doi:10.1023/a:1007785202280
- Lefevre, S., Damsgaard, C., Pascale, D. R., Nilsson, G. E., & Stecyk, J. A. W. (2014). Air breathing in the Arctic: influence of temperature, hypoxia, activity and restricted air access on respiratory physiology of the Alaska blackfish *Dallia pectoralis*. *J Exp Biol*, 217(Pt 24), 4387-4398. doi:10.1242/jeb.105023
- Lefevre, S., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., Wang, T., & Bayley, M. (2012). Effects of hypoxia on the partitioning of oxygen uptake and the rise in metabolism during

- digestion in the air-breathing fish *Channa striata*. *Aquaculture*, 364-365, 137-142.  
doi:10.1016/j.aquaculture.2012.08.019
- Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., & Vaultot, D. (2001). DNA/RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom, Chapter 11*, Unit 11.12.  
doi:10.1002/0471142956.cy1112s11
- McNab, Brian K. (1997). On the Utility of Uniformity in the Definition of Basal Rate of Metabolism. *Physiological Zoology*, 70(6), 718-720. doi:10.1086/515881
- Mundim, K. C., Baraldi, S., Machado, H. G., & Vieira, F. M. C. (2020). Temperature coefficient (Q10) and its applications in biological systems: Beyond the Arrhenius theory. *Ecological Modelling*, 431, 109127. doi:10.1016/j.ecolmodel.2020.109127
- Nilsson, G. (1988). A comparative study of aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities in crucian carp and three other vertebrates: apparent adaptations to ethanol production. *Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 158(4), 479-485. doi:10.1007/BF00691145
- Onozato, H., Torisawa, M., & Kusama, M. (1983). Distribution of the Gynogenetic Polyploid Crucian Carp, *Carassius auratus* in Hokkaido, Japan. *Japanese Journal of Ichthyology*, 30(2), 184-190. doi:10.11369/jji1950.30.184
- Piagnerelli, M., Zouaoui Boudjeltia, K., Brohee, D., Vereerstraeten, A., Piro, P., Vincent, J.-L., & Vanhaeverbeek, M. (2007). Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 60(5), 549-554.  
doi:10.1136/jcp.2006.037523
- Price, T. D., Qvarnström, A., & Irwin, D. E. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings. Biological sciences*, 270(1523), 1433-1440.  
doi:10.1098/rspb.2003.2372
- Reemeyer, J. E., & Rees, B. B. (2019). Standardizing the determination and interpretation of P crit in fishes. *J Exp Biol*, 222(Pt 18). doi:10.1242/jeb.210633
- Seibel, B. A., & Deutsch, C. (2020). Oxygen supply capacity in animals evolves to meet maximum demand at the current oxygen partial pressure regardless of size or temperature. *Journal of Experimental Biology*, 223(12).
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*: John Wiley & Sons.
- Shoubridge, E. A., & Hochachka, P. W. (1980). Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science*, 209(4453), 308. doi:10.1126/science.7384807

- Sollid, J., De Angelis, P., Gundersen, K., & Nilsson, G. E. (2003). Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J Exp Biol*, 206(Pt 20), 3667-3673. doi:10.1242/jeb.00594
- Sollid, J., Weber, R. E., & Nilsson, G. E. (2005). Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *J Exp Biol*, 208(Pt 6), 1109-1116. doi:10.1242/jeb.01505
- Svendsen, M. B. S., Bushnell, P. G., & Steffensen, J. F. (2016). Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms. *J Fish Biol*, 88(1), 26-50. doi:10.1111/jfb.12797
- Thuy, N. H., Tien, L. A., Tuyet, P. N., Huong, D. T. T., Cong, N. V., Bayley, M., . . . Lefevre, S. (2010). Critical oxygen tension increases during digestion in the perch *Perca fluviatilis*. *Journal of fish biology*, 76(4), 1025-1031. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02533.x
- Ultsch, G. R., Ott, M. E., & Heisler, N. (1980). Standard metabolic rate, critical oxygen tension, and aerobic scope for spontaneous activity of trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*) in acidified water. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 67(3), 329-335. doi:10.1016/S0300-9629(80)80004-1
- Ultsch, G. R., & Regan, M. D. (2019). The utility and determination of Pcrit in fishes. *The Journal of Experimental Biology*, 222(22), jeb203646. doi:10.1242/jeb.203646
- Vindeløv, L. L., Christensen, I. J., & Nissen, N. I. (1983). Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry*, 3(5), 328-331. doi:10.1002/cyto.990030504
- Vinogradov, A. E. (1998). Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 31(2), 100-109.
- Vinterstare, J. (2021). *Defence on Demand: A physiological perspective on phenotypic plasticity in anti-predator traits*. Lund University,
- Wang, J.-T., Li, J.-T., Zhang, X.-F., & Sun, X.-W. (2012). Transcriptome analysis reveals the time of the fourth round of genome duplication in common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC Genomics*, 13(1), 96. doi:10.1186/1471-2164-13-96
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology : lake and river ecosystems* (3rd ed. ed.). San Diego: Academic Press.

- Whitlock, M. C., & Schluter, D. (2015). *The Analysis of biological data* (2nd ed. ed.). New York: Macmillan education.
- Wickham, H. (2017). The tidyverse. *R package ver, 1*(1), 1.
- Xiao, J., Zou, T., Chen, Y., Chen, L., Liu, S., Tao, M., . . . Liu, Y. (2011). Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters. *BMC Genetics, 12*(1), 20. doi:10.1186/1471-2156-12-20
- Yang, H., Andersen, T., Dörsch, P., Tominaga, K., Thrane, J.-E., & Hessen, D. O. (2015). Greenhouse gas metabolism in Nordic boreal lakes. *Biogeochemistry, 126*(1), 211-225. doi:10.1007/s10533-015-0154-8

## Appendiks

### Vedlegg I – Datasett fra respirometri og FCM

Fish_ID	Length	Weight	Sex	Group	Mean MO2	Peak_Ch_FSC	CLD	Peak_Ch_FL2	Genome_size	RMR_100g	SMR_100g	LLO_PO2	Crit/Alpha	Breakpoint	LLO
1	14.2	41.48	F	Tjernsrud	143.72554	2502	19.2851728	547	9.41480207	50.5267473	17.3733445	1.27314	1.086	39.6409791	17.7577237
2	14.2	43.41	F	Tjernsrud	31.7553804	406	3.12940854	770	13.2530121	11.2464761	-4.5920557	0	0	131.568589	0
3	14.1	40.67	F	Tjernsrud	48.4501533	518	3.99269365	770	13.2530121	16.9777128	13.2316772	1.00951	1.539	35.6948183	14.0806193
4	14.3	42.48	F	Tjernsrud	100.605671	2502	19.2851728	770	13.2530121	35.5055745	16.7417303	0.97093	1.838	22.6904247	13.5425065
5	19.4	143.45	M	Svartkulp	125.248845	286	2.2044602	655	11.2736661	104.033081	41.7885692	1.21265675	0.6102	56.9017865	16.9141049
6	21.3	206.06	F	Svartkulp	167.497109	316	2.43569728	813	13.9931153	144.42832	125.447519	5.62869001	1.337	10.2657862	78.5088223
7	14.1	44.75	F	Tjernsrud	54.9801428	3133	2.61297905	784	13.4939759	37.5457063	19.7548178	0	0	80.9530571	0
8	15.6	53.66	F	Tjernsrud	97.2745307	3190	24.5882099	637	10.9638554	68.3432299	15.3635977	0.96031199	1.526	25.1267339	13.3944068
9	17.5	95.51	F	Svartkulp	110.326723	3278	25.2665054	820	14.1135973	86.7052645	39.1400651	1.78043246	0.1282	68.4385748	24.8334257
10	18.1	112.25	M	Svartkulp	141.573294	3078	2.93671097	850	14.6299484	113.883815	46.0231557	2.44634224	0.2871	65.99434	34.121518
11	14.7	43.03	M	Tjernsrud	30.4948348	3398	26.1914537	865	14.8881239	20.6935645	9.31210405	0.79909173	1.069	77.5311284	11.1457108
12	14.7	53.58	F	Tjernsrud	69.6005359	3078	23.7249248	805	13.8554217	48.8888995	20.4445582	1.28275252	1.795	50.057929	17.8917989
13	21.2	183.14	F	Svartkulp	104.315484	482	3.71520915	820	14.1135973	104.746434	41.67601	1.42673774	0.2533	26.800136	19.900101
14	19.1	136.5	F	Svartkulp	169.696695	3133	24.1488595	1084	18.6574871	164.88103	143.302192	5.38432183	1.834	31.1001579	75.1003812
15	14.1	41.53	M	Tjernsrud	100.500004	3078	23.7249248	850	14.6299484	79.8038937	10.3635594	0.60224106	-0.002217	52.200265	8.40004264
16	14.3	45.08	F	Tjernsrud	43.0762079	3078	5.24956971	305	5.24956971	34.6625517	20.3175493	0	0	112.000569	0
17	20	137.1	F	Svartkulp	106.472322	2996	23.0928768	770	13.2530121	103.507607	40.8128125	1.66333244	2.025	32.6001655	23.2001178
18	19.4	122.54	F	Svartkulp	93.8610149	3278	25.2665054	889	15.3012048	89.9330261	44.1971001	1.27617748	0.2883	40.8002071	17.8000904
19	14.6	42	M	Tjernsrud	32.3781385	2890	22.2758391	615	10.5851979	25.7577324	16.5729467	0	0	54.1002746	0
20	15.1	48.61	F	Tjernsrud	63.3178764	3307	25.4900345	805	13.8554217	51.5634355	17.2526715	0	-0.444	78.200397	0
21	13.1	40.9	M	Svartkulp	87.8750268	3078	23.7249248	784	13.4939759	70.6062468	25.6058561	0	0.5817	115.300585	0
22	14.2	42.61	M	Tjernsrud	34.1179745	2916	22.4762446	643	11.0671257	27.2055851	12.171873	0.73129271	-2.34	43.4002203	10.2000518
CRBC1	-	-	-	CRBC	-	1794	13.8279776	144	2.47848537						
CRBC2	-	-	-	CRBC	-	1715	13.2190533	148	2.54733219						
CRBC3	-	-	-	CRBC	-	1843	14.2056649	151	2.5989673						
CRBC4	-	-	-	CRBC	-	1810	13.9513041	138	2.37521515						

## Vedlegg II – RScript

```
# Masteroppgave
```

```
setwd("C:/Users/bendi/OneDrive/Documents/Bendik/Biologi, Master")
```

```
getwd()
```

```
install.packages("ggplot2")
```

```
library(ggplot2)      #For making plots ## Kjør library(ggplot2) til  
sist
```

```
install.packages("tidyr")
```

```
library(tidyr)       #For data manipulation
```

```
install.packages("dplyr")
```

```
library(dplyr)       #For data manipulation
```

```
install.packages("ggthemes")
```

```
library(ggthemes)    #For adding themes to plots and graphs
```

```
install.packages("RColorBrewer")
```

```
library(RColorBrewer)
```

```
install.packages("readxl")
```

```
library("readxl")
```

```
Crucian_carp <- read_xlsx("Karuss, main.xlsx")
```

```
View(Crucian_carp)
```

```
Crucian_carp$Weight <- as.numeric(as.character(Crucian_carp$Weight))
```

```
Crucian_carp$Length <- as.numeric(as.character(Crucian_carp$Length))
```

```
summary(Crucian_carp)
```

```
head(Crucian_carp)
```

```
# Splitter datasettet i hver sin gruppe
```



```

# Fjerner fish_ID=2, OBS! Må kun brukes til MO2
Crucian_carp_Tjernsrud <- subset(Crucian_carp, Group=="Tjernsrud")
Crucian_carp_Svartkulp <- subset(Crucian_carp, Group=="Svartkulp")

# Lager subset uten CRBC-målinger
Crucian_carp_MO2 <- Crucian_carp[c(1, 3:5, 7:13, 15:22), c(1:23)] #
Tar ut 2, 6 og 14.

# Lager subset for Pcrit
Crucian_carp_pcrit1 <- Crucian_carp[c(1, 3:6, 8:10, 12:15, 17:18,
22), c(1:23)]
# Tar ut 2, 7, 16, 19, 20, 21.
Crucian_carp_pcrit2 <- Crucian_carp[c(1, 3:5, 8:13, 15, 17:18, 22),
c(1:23)]
# Tar ut 2, 6, 7, 14, 16, 19, 20, 21

# Vekt per gruppe
ggplot(Crucian_carp[c(1:22),], aes(x = Group, y = Weight, fill =
Group)) +
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = "Kroppsstørrelse (g)") +
  ggtitle(label = "Kroppsstørrelse (g) for hver gruppe") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme(legend.position="none") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# CLD per gruppe, tar ut kvalitativt vurderte feilmålinger.
ggplot(subset(Crucian_carp[c(7:12, 14:26), c(1:10)]), aes(x = Group,
y = Peak_Ch_FSC, fill = Group)) +
  geom_boxplot() +

```

```

xlab(label = "Gruppe") +
ylab(label = "Relativ størrelse (AU)") +
ggtitle(label = "Relativ erytrocyttstørrelse for hver gruppe") +
theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
theme(legend.position="none") +
theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# Genome_size per gruppe, tar ut kvalitativt vurdert feilmåling
1,2,3,4, 16

ggplot(subset(Crucian_carp[c(5:15, 17:26), c(1:16)]), aes(x = Group,
y = Peak_Ch_FL2, fill = Group)) +
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = "Relativ genomstørrelse (AU)") +
  ggtitle(label = "Relativ genomstørrelse for hver gruppe") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme(legend.position="none") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# RMR_100g per gruppe

ggplot(subset(Crucian_carp[c(1, 3:22), c(1:17)]), aes(x = Group, y =
RMR_100g, fill = Group)) +
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = "RMR mg O2/kg/h") +
  ggtitle(label = "Rutine metabolsk rate, 100g-standardisert") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme(legend.position="none") +

```

```

theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# SMR_100g per gruppe
ggplot(subset(Crucian_carp[c(1:22), c(1:17)]), aes(x = Group, y =
SMR_100g, fill = Group)) +
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = "SMR mg O2/kg/h") +
  ggtitle(label = "Standard metabolsk rate, 100g-standardisert") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme(legend.position="none") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# Breakpoint Pcrit per gruppe
ggplot(Crucian_carp_pcrit1, aes(x = Group, y = Breakpoint, fill =
Group)) +
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = "PO2Crit (mmHg)") +
  ggtitle(label = "Kritisk oksygennivå for hver gruppe
(Breakpoint)") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme(legend.position="none") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# Low linear oxygen Pcrit per gruppe
ggplot(Crucian_carp_pcrit2, aes(x = Group, y = LLO, fill = Group)) +
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = "LLO PO2Crit (mmHg)") +

```

```

ggtitle(label = "Kritisk oksygennivå for hver gruppe (LLO)") +
theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
theme(legend.position="none") +
theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# Stigningsrate i MO2 mot PO2 per gruppe
ggplot(Crucian_carp_alpha, aes(x = Group, y = Alpha, fill = Group))
+
  geom_boxplot() +
  xlab(label = "Gruppe") +
  ylab(label = " $\Delta\text{MO}_2/\Delta\text{PO}_2$ ") +
  ggtitle(label = "Stigningsrate av MO2 per mmHg O2 (LLO)") +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  theme(legend.position="none") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle=45, vjust=1, hjust=1))

# Finner gjennomsnitt for CLD for hver gruppe.
aggregate(CLD~Group, data=Crucian_carp[c(8:9, 11:12, 14:26),
c(1:10)], mean)

# Finner gjennomsnitt for genomstørrelse for hver gruppe.
aggregate(Genome_size~Group, data=Crucian_carp_Gen, mean)

# Finner gjennomsnitt og sd av vekt for hver gruppe
aggregate(Weight~Group, data=Crucian_carp[c(1:22), c(1:21)], mean)
aggregate(Weight~Group, data=Crucian_carp[c(1:22), c(1:21)], sd)

# Finner gjennomsnitt og sd av LLO for hver gruppe
aggregate(LLO~Group, data=Crucian_carp_pcrit2, mean)
aggregate(LLO~Group, data=Crucian_carp_pcrit2, sd)

```

```

# Finner gjennomsnitt og sd av Breakpoint for hver gruppe
aggregate(Breakpoint~Group, data=Crucian_carp_pcrit1, mean)
aggregate(Breakpoint~Group, data=Crucian_carp_pcrit1, sd)

# Finner gjennomsnitt og sd av RMR og SMR for hver gruppe
aggregate(RMR_100g~Group, data=Crucian_carp[c(1, 3:22),], mean)
aggregate(RMR_100g~Group, data=Crucian_carp[c(1, 3:22),], sd)
aggregate(SMR_100g~Group, data=Crucian_carp_MO2, mean)
aggregate(SMR_100g~Group, data=Crucian_carp_MO2, sd)

# Finner gjennomsnitt og sd av alpha for hver gruppe
aggregate(Alpha~Group, data=Crucian_carp_alpha, mean)
aggregate(Alpha~Group, data=Crucian_carp_alpha, sd)

# Shapiro-Wilk's test for normalitet

# OBS: Index som tas ut er forskjellig fra Fish_ID, da det brukes
splittet datasett. Pass på!

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(6:13),]$Peak_Ch_FSC) # p-value
= 0.5762, uten ID 1,2,3,4og7

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(6:9, 11:13),]$Peak_Ch_FL2) #
p-value = 0.08536, uten ID 1,2,3,4,5 og 16

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(1, 3:13),]$RMR_100g) # p-value
= 0.4904, uten ID 2

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(1, 3:13),]$SMR_100g) # p-value
= 0.3885, uten ID 2

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(1, 3:4, 6, 8:9,
13),]$Breakpoint) # p-value = 0.5756, uten ID 2, 7, 11, 16, 19, 20

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(1, 3:4, 6:9, 13),]$LLO) # p-
value = 0.5897, uten ID 2, 7, 16, 19, 20

```

```

shapiro.test(Crucian_carp_Tjernsrud[c(1, 3:4, 6:8),]$Alpha) # p-
value = 0.2115, uten ID 2, 7, 15, 16, 19, 20 og 22. Veldig få
verdier.

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp[c(3, 6:9),]$Peak_Ch_FSC) # p-
value = 0.3944, uten ID 5,6,10 og 13

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp[c(1:5,7:9),]$Peak_Ch_FL2) # p-
value = 0.2748, uten ID 14

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp$RMR_100g) # p-value = 0.3793

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp[c(1, 3:5, 7:9),]$SMR_100g) # p-
value = 0.02127, uten ID 6 og 14.

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp[c(1:8),]$Breakpoint) # p-value =
0.6062, uten ID 21

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp[c(1, 3:5, 7:8),]$LLO) # p-value
= 0.298, uten ID 6, 14 og 21.

shapiro.test(Crucian_carp_Svartkulp[c(3:5, 7:8),]$Alpha) # p-value =
0.001404, uten ID 6,14 og 21.

# Objekter for tester, uten outliers og feilmålinger:
Crucian_carp_CLD <- Crucian_carp[c(8:9, 11:12, 14:22),]
Crucian_carp_Gen <- Crucian_carp[c(6:13, 15, 17:22),]
Crucian_carp_alpha <- Crucian_carp[c(1, 3:5, 8:13, 17:18),]

# Sjekker om varians er lik, for Welch t-test eller vanlig t-test
var(Crucian_carp[c(1, 3:22),]$RMR_100g[Crucian_carp[c(1,
3:22),]$Group=="Tjernsrud"])

var(Crucian_carp[c(1, 3:22),]$RMR_100g[Crucian_carp[c(1,
3:22),]$Group=="Svartkulp"])

var(Crucian_carp_MO2$SMR_100g[Crucian_carp_MO2$Group=="Tjernsrud"])
var(Crucian_carp_MO2$SMR_100g[Crucian_carp_MO2$Group=="Svartkulp"])
var(Crucian_carp_pcrit1$Breakpoint[Crucian_carp_pcrit1$Group=="Tjern
srud"])
var(Crucian_carp_pcrit1$Breakpoint[Crucian_carp_pcrit1$Group=="Svart
kulp"])

```

```

var(Crucian_carp_pcrit2$LLO[Crucian_carp_pcrit2$Group=="Tjernsrud"])
var(Crucian_carp_pcrit2$LLO[Crucian_carp_pcrit2$Group=="Svartkulp"])
var(Crucian_carp_alpha$Alpha[Crucian_carp_alpha$Group=="Tjernsrud"])
var(Crucian_carp_alpha$Alpha[Crucian_carp_alpha$Group=="Svartkulp"])

# T-tester mellom grupper

t.test(Crucian_carp_CLD$Peak_Ch_FSC~Crucian_carp_CLD$Group) #
t=0.42794, p-verdi=0.6772

t.test(Crucian_carp_Gen$Peak_Ch_FL2~Crucian_carp_Gen$Group) #
t=1.5443, p-verdi=0.1433

t.test(Crucian_carp[c(1, 3:22),]$RMR_100g~Crucian_carp[c(1,
3:22),]$Group) # t=6.0597, p-verdi=4.048e-05

t.test(Crucian_carp_MO2$SMR_100g~Crucian_carp_MO2$Group) # t=8.7794,
p-verdi=1.819e-05

t.test(Crucian_carp_pcrit1$Breakpoint~Crucian_carp_pcrit1$Group) #
t= 0.38057, p-verdi=0.7106

t.test(Crucian_carp_pcrit2$LLO~Crucian_carp_pcrit2$Group) #
t=3.3334, p-verdi=0.0122

t.test(Crucian_carp_alpha$Alpha~Crucian_carp_alpha$Group) # t=-
2.7165, p-verdi=0.02963

# Wilcoxon rank sum-test på FSC- og FL2-verdier

wilcox.test(Crucian_carp_CLD$Peak_Ch_FSC~Crucian_carp_CLD$Group,
mu=0) # W=22.5, p-verdi=0.7662

wilcox.test(Crucian_carp_Gen$Peak_Ch_FL2~Crucian_carp_Gen$Group,
mu=0) # W=39, p-verdi=0.2227

# Korrelasjonstest på SMR, LLO Pcrit og Weight

cor.test(Crucian_carp_MO2$Weight, Crucian_carp_MO2$SMR_100g,
method=c("spearman"))

# rho = 0.6964912, p-verdi = 0.001278

```

```

cor.test(Crucian_carp_pcrit2$Weight,
Crucian_carp_pcrit2$LLO_PO2Crit, method=c("spearman"))

# rho = 0.5824176 p-verdi = 0.03182

cor.test(Crucian_carp[c(1, 3:22),]$Weight, Crucian_carp[c(1,
3:22),]$RMR_100g, method=c("spearman"))

# rho = 0.7649351, p-verdi=8.125e-05

install.packages("readxl")

library("readxl")

MO2_data <- read_excel("MO2_data.xlsx", sheet=7)

plot(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#1`, type="o", col="2",
pch=16,

      xlab="Observasjon (15 min lukket)",
      ylab="MO2-data",
      xlim=c(0, 40),
      ylim=c(-30, 300),
      main="MO2-data, Tjernsrudtjern")

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#2`, type="o", col="3",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#3`, type="o", col="4",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#4`, type="o", col="5",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#7`, type="o", col="6",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#8`, type="o", col="7",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#11`, type="o", col="8",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#12`, type="o", col="9",
pch=16)

```



```

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#15`, type="o", col="10",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#16`, type="o", col="11",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#19`, type="o", col="12",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#20`, type="o", col="13",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#22`, type="o", col="14",
pch=16)

plot(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#5`, type="o", col="2",
pch=16,

      xlab="Observasjon (15 min lukket)",
      ylab="MO2-data",

      xlim=c(0, 40),
      ylim=c(-30, 300),

      main="MO2-data, Svartkulp")

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#6`, type="o", col="3",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#9`, type="o", col="4",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#10`, type="o", col="5",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#13`, type="o", col="6",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#14`, type="o", col="7",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#17`, type="o", col="8",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#18`, type="o", col="9",
pch=16)

points(MO2_data$Observajon, MO2_data$`MO2-#21`, type="o", col="10",
pch=16)

# Installer respR

```

```

install.packages("respirometry")

library(respirometry)

setwd("C:/Users/bendi/OneDrive/Documents/Bendik/Biologi,
Master/Respirometri/TjernsrudSvartkulpResp")

x <- read_xlsx("Karuss1_2_3_4.xlsx", sheet = 5)

# Eksempelfigur, LLO

plot(x$PO2.1, x$MO2.1, xlab="PO2 (mmHg)", ylab="MO2 (mg O2/kg/h)",
xlim=c(0,130))

lm(MO2.1~PO2.1, data=subset(x[c(1:17,19:22,24:25,27:36)],
MO2.1<20.7))

abline(h=20.7, lty=2)

text(x=100, y=24, labels = "SMR")

clip(0, 100, 0, 20.7)

abline(a=-5.758, b=1.457, col="purple", lwd=2)

clip(0, 100, -10, 20.7)

abline(v=18.16, lty=2, col="blue")

text(x=30, y=10, labels = "PO2Crit")

# Eksempelfigur, breakpoint

plot(x$PO2.1, x$MO2.1, xlab="PO2 (mmHg)", ylab="MO2 (mg O2/kg/h)",
xlim=c(0,130))

clip(45,150,0,60)

abline(h=60, lwd=2)

clip(0, 45, 0, 60)

abline(a=-5.758, b=1.457, lwd=2)

clip(0, 100, -10, 60)

abline(v=45, lty=2, col="blue")

clip(-10,150,0,150)

```

```
text(x=60, y=10, labels = "PO2Crit")
text(x=70, y=70, labels = "Oksygenregulering", cex=0.8)
text(x=20, y=70, labels = "Oksygenkonformerering", cex=0.8)
```

```
calc_pcrit(x$PO2.1, x$MO2.1, MR=20.7)
calc_pcrit(x$PO2.2, x$MO2.2, MR=-5.4)
calc_pcrit(x$PO2.3, x$MO2.3, MR=15.8)
calc_pcrit(x$PO2.4, x$MO2.4, MR=19.9)
```

```
plot_pcrit(x$PO2.1, x$MO2.1, MR=20.7)
plot_pcrit(x$PO2.2, x$MO2.2, MR=-5.4)
plot_pcrit(x$PO2.3, x$MO2.3, MR=15.8)
plot_pcrit(x$PO2.4, x$MO2.4, MR=19.9)
```

```
y <- read_xlsx("Karuss5_6_7_8.xlsx", sheet = 5)
```

```
calc_pcrit(y$PO2.1, y$MO2.1, MR=38.9)
calc_pcrit(y$PO2.2, y$MO2.2, MR=108.6)
calc_pcrit(y$PO2.3, y$MO2.3, MR=23.2)
calc_pcrit(y$PO2.4, y$MO2.4, MR=17.4)
```

```
plot_pcrit(y$PO2.1, y$MO2.1, MR=38.9)
plot_pcrit(y$PO2.2, y$MO2.2, MR=108.6)
plot_pcrit(y$PO2.3, y$MO2.3, MR=23.2)
plot_pcrit(y$PO2.4, y$MO2.4, MR=17.4)
```

```
z <- read_xlsx("Karuss9_10_11_12.xlsx", sheet = 5)
```

```

calc_pcrit(z$PO2.1, z$MO2.1, MR=39.5)
calc_pcrit(z$PO2.2, z$MO2.2, MR=45.0)
calc_pcrit(z$PO2.3, z$MO2.3, MR=11.0)
calc_pcrit(z$PO2.4, z$MO2.4, MR=23.2)

plot_pcrit(z$PO2.1, z$MO2.1, MR=39.5)
plot_pcrit(z$PO2.2, z$MO2.2, MR=45)
plot_pcrit(z$PO2.3, z$MO2.3, MR=11)
plot_pcrit(z$PO2.4, z$MO2.4, MR=23.2)

a <- read_xlsx("Karuss13_14_15_16.xlsx", sheet = 5)

calc_pcrit(a$PO2.1, a$MO2.1, MR=36.9)
calc_pcrit(a$PO2.2, a$MO2.2, MR=134.7)
calc_pcrit(a$PO2.3, a$MO2.3, MR=12.4)
calc_pcrit(a$PO2.4, a$MO2.4, MR=23.8)

plot_pcrit(a$PO2.1, a$MO2.1, MR=36.9)
plot_pcrit(a$PO2.2, a$MO2.2, MR=134.7)
plot_pcrit(a$PO2.3, a$MO2.3, MR=12.4)
plot_pcrit(a$PO2.4, a$MO2.4, MR=23.8)

b <- read_xlsx("Karuss17_18_19_20.xlsx", sheet = 5)

calc_pcrit(b$PO2.1, b$MO2.1, MR=38.3)
calc_pcrit(b$PO2.2, b$MO2.2, MR=42.4)
calc_pcrit(b$PO2.3, b$MO2.3, MR=19.7)
calc_pcrit(b$PO2.4, b$MO2.4, MR=19.9)

```

```

plot_pcrit(b$PO2.1, b$MO2.1, MR=38.3)
plot_pcrit(b$PO2.2, b$MO2.2, MR=42.4)
plot_pcrit(b$PO2.3, b$MO2.3, MR=19.7)
plot_pcrit(b$PO2.4, b$MO2.4, MR=19.9)

c <- read_xlsx("Karuss21_22.xlsx", sheet = 5)

calc_pcrit(c$PO2.1, c$MO2.1, MR=30.6)
calc_pcrit(c$PO2.2, c$MO2.2, MR=14.4)

plot_pcrit(c$PO2.1, c$MO2.1, MR=30.6)
plot_pcrit(c$PO2.2, c$MO2.2, MR=14.4)

# Generell script, bytt ut xlsx-filen for hver profil
ctd <- read_xlsx("Tjernsruddtjern, 13.10.2020.xlsx")
ctd <- ctd[-c(1:4), -1] # Fjerner de første radene, og timestap-
kolonnen. Velg ut profil-intervall.
names(ctd) <- ctd[1,] # Setter første rad som header.
ctd <- ctd[-1,] # Fjerner første rad
ctd <- lapply(ctd, as.numeric) # Endrer kolonner til numeric
attach(ctd)

# Plotter CTD-profiler
par(oma=c(2,2,4,5)) #Defines how much space is around the graph
par(mex=0.8)

plot(Rinko_Dissolved_O2_concentration, Depth,
     ylim=rev(range(Depth)), col="blue", xaxt="n",
     ylab="Dyp (m)", xlab="", xlim=c(0,15))

```

```

axis(1)
mtext("O2-konsentrasjon (mg/l)", 1, line=2, col="blue")
par(new=T)
plot.default(Temperature, Depth,
             ylim=rev(range(Depth)), col="black", ann=FALSE,
             yaxt="n", xaxt="n", yaxs="i", lwd=1)
axis(3)
mtext("Temperatur (C)", 3, line=1.9, col = "black")
par(new=T)
plot.default(PAR, Depth,
             ylim=rev(range(Depth)), col="green", ann=FALSE,
             yaxt="n", xaxt="n", yaxs="i", lwd=1, xlim=c(0, 3000))
axis(1, pos=3.9, col="green") # Pos må justeres i forhold til
respektiv x-akse.
mtext("PAR (µmol/m2/s)", 3, line=-18, col="green")
par(new=T)
plot.default(Conductivity, Depth,
             ylim=rev(range(Depth)), col="orange", ann=FALSE,
             yaxt="n", xaxt="n", yaxs="i", lwd=1, xlim=c(0.0, 1.4))
axis(3, pos=-0.5, col="orange") # Pos må justeres i forhold til
respektiv x-akse.
mtext("Ledningsevne (mS/cm)", 3, line=5.5, col = "orange")

```