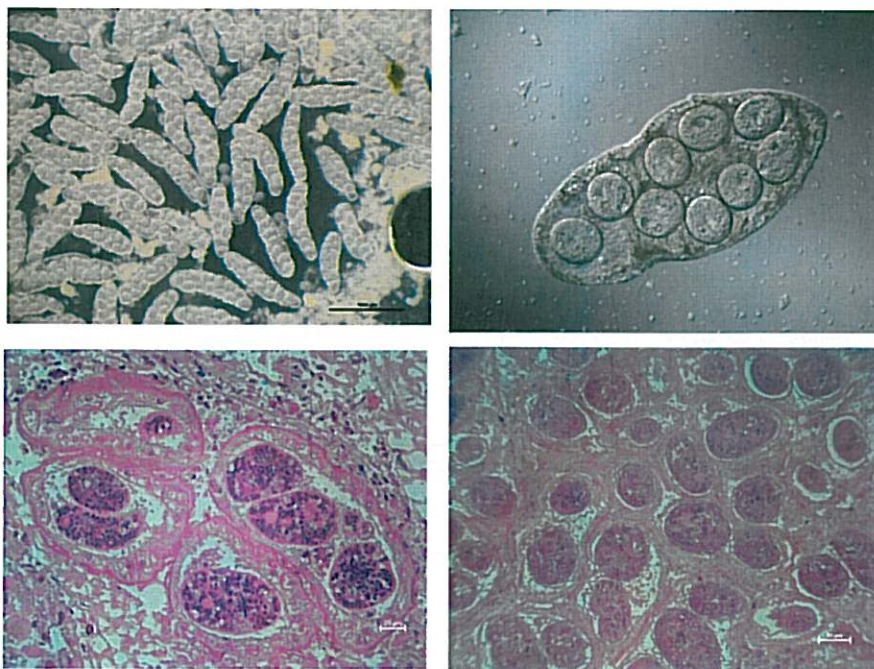


Rapport for projektet:

"Ikke-nedgravede hjertemuslinger i Limfjorden - snyltere, gonadeudvikling og neoplasi"



K. Thomas Jensen og Susanne V. Petersen

Institut for Bioscience, Aarhus Universitet

September 2013

Forord

Den her rapporterede undersøgelse er rekvireret af Dansk Skaldyrcenter, Nykøbing Mors. Formålet har været at undersøge om snyltere, gydemodenhed eller anormale blodceller (tumorceller) kan være årsager til masseforekomst af ikke-nedgravede individer af Almindelig hjertemusling i Limfjorden.

Carsten Formsgaard Nielsen fra Dansk Skaldyrcenter har leveret de hjertemuslinger, der indgår i undersøgelsen. Muslingerne er indsamlet i Sallingsundområdet på forskellige tidspunkter i 2012. I nærværende undersøgelse har der især været fokus på hjertemuslinger indsamlet i august og november 2012.

Tak til Dansk Skaldyrcenter og Carsten Formsgaard Nielsen for et godt samarbejde om projektet.

September 2013,

*K. Thomas Jensen
Institut for Bioscience
Aarhus Universitet*

Indholdsfortegnelse

1	Introduktion.....	4
2	Resultater.....	6
	2.1 Snyltere.....	6
	2.2 Køn og gonadestadier.....	11
	2.3 Neoplas.....	12
3	Diskussion.....	14
4	Materiale og metoder.....	16
5	Figurtavler.....	18
6	Litteraturliste.....	24
7	Noter.....	25

Resumé

- 1) Nærværende undersøgelse er udført for Dansk Skaldyrcenter og har haft til formål, at undersøge om snyltere, gydemodenhed eller anormale blodceller (tumorceller) kan være årsager til masseforekomst af ikke-nedgravede individer af Almindelig hjertemusling i Limfjorden.
- 2) I forbindelse med undersøgelsen er den digene ikke Monorchis parvus for første gang observeret i Limfjorden. Denne ikke anvender eksklusivt Alm. hjertemusling - Cerastoderma edule - som mellemvært (både 1. og 2. mellemvært). Fiskeslutværten i Limfjorden er ukendt. M. parvus er observeret i hjertemuslinger på alle undersøgte tidspunkter (2012: marts, juni, august, november) og den forekommer med en prævalens på omkring 20% i både august og november, hvilket er meget højt for en ikke i første mellemvært. Der er ikke på de undersøgte tidspunkter påvist forskel i parasitforekomst hos nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger, men Monorchis parvus vides fra tidligere undersøgelser at kunne påvirke hjertemuslingers nedgravningsevne.
- 3) Der er ikke påvist forekomst af tumorceller (neoplasi) i hæmolymfen hos C. edule. De observerede blodceller har et størrelsesspektrum og et udseende svarende til, hvad der tidligere er påvist for normale blodceller i hjertemusling. Dermed kan neoplasi-celler ikke forklare, hvorfor nogle hjertemuslinger i de undersøgte hjertemuslingebestande er ikke-nedgravede.
- 4) I forbindelse med undersøgelsen af kønsforhold og modenhedsstadier hos hjertemuslinger viser analysen, at gydemodne hjertemuslinger fra juni er overrepræsenteret blandt ikke-nedgravede muslinger.
- 5) Stikprøver af hjertemuslinger fra august og november 2012, der har været screenet i nærværende undersøgelse, viser ikke forskelle mellem nedgravede og ikke-nedgravede muslinger mht. snyltebelastning, blodcelletyper og kønsforhold. De ikke-nedgravede muslinger udgør tilsyneladende et helt tilfældigt udsnit af hjertemuslingepopulationen i efteråret 2012 på den undersøgte lokalitet. Det vil imidlertid være interessant at få afklaret i hvilken udstrækning temperaturforhold og Monorchis-modenhed kan være afgørende for adfærden af Monorchis-inficerede hjertemuslinger.

1. Introduktion

Nærværende undersøgelse er udført for Dansk Skaldyrcenter, Nykøbing Mors, og har haft til formål at identificere mulige årsager til masseforekomst af ikke-nedgravede hjertemuslinger på havbundens overflade. En sådan atypisk hjertemuslingeadfærd er iagttaget i bl.a. Sallingsund-området i Limfjorden på godt 10 m's vanddybde, men er også observeret mange andre steder i den Almindelige hjertemuslings udbredelsesområde. Fænomenet har været observeret gentagne gange i Limfjorden, men for indeværende vides ikke om det udviser en periodicitet

eller om det forekommer episodisk. Ugunstige bundforhold f.eks. i forbindelse med iltsvind er en kendt årsag til at hjertemuslinger forsøger at undslippe et iltfattigt bundnært vandlag ved at kravle opⁱ. Nogle patogene organismerⁱⁱ og snyltere kan svække en hjertemuslings nedgravningsevne, og blandt hjertemuslingens snyltere mistænkes nogle for at kunne kontrollere muslingers adfærd så de bliver lettere tilgængelige for en fiske- eller fugleslutværtⁱⁱⁱ. På det seneste har der været fokus på, at hjertemuslinger med ukontrolleret vækst af hæmocytter (dissimineret

neoplasi) er overrepræsenteret hos ikke-nedgravede hjertemuslinger^{iv}. Udover de nævnte faktorer kan det også tænkes, at hjertemuslinger i forbindelse med gydning kunne bevæge sig op på sedimentoverfladen for at fremme spredning af æg, selvom en sådan adfærd så vidt vides ikke har været rapporteret hos hjertemuslinger tidligere, men dog er set hos andre benthiske organismer.

Da hjertemuslinger i Limfjorden udnyttes kommercielt, er der en praktisk interesse i at få identificeret den eller de faktorer, der forårsager hjertemuslingens atypiske adfærd.

Formålet med nærværende undersøgelse har specifikt været at klarlægge, om der er forskel på nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger fra Limfjorden mht. forekomst af snyltere, gydemodenhed eller

anormale blodceller (neoplasi). Muslingerne til undersøgelsen er leveret af Dansk Skaldyrcenter, og undersøgelsen er især baseret på hjertemuslinger indsamlet i august og november 2012 dog suppleret med analyser af et mindre antal hjertemuslinger fra marts og juni 2012.

De indsamlede nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger er blevet screenet for snyltere (makroparasitter), køn (modenhedsstadier), blodcellesammensætning og individuel vækst. De anvendte metoder er beskrevet sidst i denne rapport. I Tabel 1 er vist en oversigt over tid og sted for indsamling af de undersøgte hjertemuslinger.

Tabel 1. Undersøgte hjertemuslinger fra Sallingsund, Limfjorden (N: nedgravede, E: ikke-nedgravede)

lokaltet	koordinater	dybde (m)	dato	# <i>C. edule</i>	analyse
Sallingsundbroen	N 56° 44,782 E 008° 50,606	10-12	Juni (8/6)	51 (N+E)	1, 2
	N 56° 44,789 E 008° 50,554	10-12	August (17/8)	61 (N+E)	1, 2, 3 & 4
	N 56° 44,782 E 008° 50,606	10-12	November (7/11)	99 (N+E)	1, 2, 3 & 4
Kontrol (Sallingsund)	N 56° 42,554 E 008° 47,932	11	Marts (23/3)	24 (N)	1

1: snyltere; 2: køn; 3: blodceller; 4: vækst

Tabel 2. Organismer fundet i Alm. hjertemusling (*C. edule*) fra august og november 2012 (Sallingsundbroen, 11 m)

	art	1. ml vært	2. ml vært	slutvært	prævalens ²
Parasitter	<i>Monorchis parvus</i>	Alm hjertemusling	Alm hjertemusling	<i>Diplodus</i> -arter (Havrudearter) ^{3,4}	20%
	<i>Himasthla elongata</i>	Alm strandsnegl	Alm hjertemusling o.a. muslinger	Sølvmåge, Strandskade Ederfugl m.fl.	få obs.
	<i>Himasthla sp</i>	Stor dyndsnegl	Alm hjertemusling	Sølvmåge, Strandskade, Ederfugl m.fl.	få obs.
Kommensaler	<i>Hermannella rostrata</i> ⁱ (Copepoda)		Ikke værtsskifte	Alm hjertemusling	32%
	<i>Paravortex cardii</i> ⁱⁱ (Turbellaria)		Ikke værtsskifte	Alm hjertemusling	14%

1: Arten er ikke identificeret med sikkerhed men de nævnte arter er typisk registreret i Alm. hjertemusling iflg Longshaw & Malham (2013); 2: baseret på alle undersøgte muslinger fra august og november 2012; 3: de Montaudouin et al (2009); 4: Bartoli et al (2000)

2. Resultater

2.1 Snyltere

De indsamlede hjertemuslinger (*Cerastoderma edule*) fra Limfjorden (indsamlet omkring Sallingsundbroen på 10-12 m's dybde) er blevet undersøgt for forekomst af makroparasitter og kommensale organismer (Tabel 2). Denne undersøgelse har vist, at ikten *Monorchis parvus*^v (herefter *Monorchis*) (Tavle 1), der ikke tidligere har været rapporteret fra Limfjorden, forekommer i omkring 20% af hjertemuslinger indsamlet i august og november.

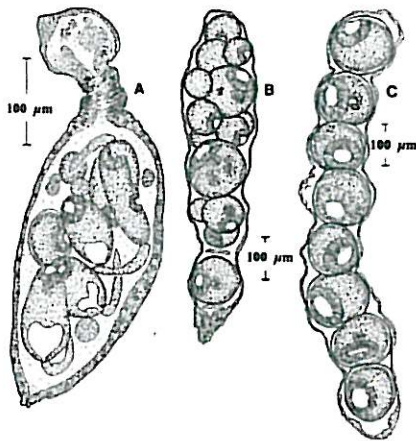
Monorchis er den absolut dominerende parasit i denne hjertemuslingebestand på 10 m's dybde i Limfjorden, idet der her kun er registreret få individer af andre parasitter.

De to i Tabel 2 nævnte kommensale arter: en fladormeart (formentlig *Paravortex cardii*^{vi}) og en copepodart (formentlig *Hermannella rostrata*^{vii}) (Tavle 2), er typisk forekommende i hjertemuslingebestande fra lavtvandsområder og fra tidevandszonen i det nordvesteuropæiske kystområde, og de anses for at være harmløse. De her

observerede prævalencer er lavere end tidligere registreret for adulte hjertemuslinger i f.eks. Vadehavet. Ikter af slægten *Himasthla* er også almindeligt forekommende i hjertemuslinger på lavt vand (tidevandszonen og indtil et par meters dybde), men kun sporadisk til stede i den her undersøgte bestand. Der er imidlertid flere almindelige parasitarter med fugle som slutvært, som man typisk vil finde i hjertemuslinger fra tidevandszonen og på lavt vand (< 2 m), der ikke er repræsenteret. Fraværet af disse ikter i den dybere del af Limfjorden skyldes sandsynligvis fravær eller lave tætheder af relevante mellemværter (f.eks. dyndsnegle og strandsnegle) samt at de relevante fugleslutværter (Strandskade, Sølvmåge) kun har betydning på det lave vand. Den høje prævalens af *Monorchis* er derimod usædvanlig, og må i nærværende sammenhæng påkalde sig stor interesse.

Indvoldssækken af muslinger, der er inficeret med *Monorchis*, er typisk helt domineret af sporocyster (en slags rugesække) (Figur 1 og Tavle 1 & 3). Inficerede hjertemuslinger kan ikke producere afkom, idet store dele af gonadevævet er overtaget

af *Monorchis*-larver. Parasitten anvender hjertemusling både som første og anden mellemvært. At være første mellemvært for digene ikter indebærer, at der sker en ukønnet opformering af parasitten i hjertemuslingen. Inficerede muslinger vil på et tidspunkt være næsten fyldt af sporocyster.

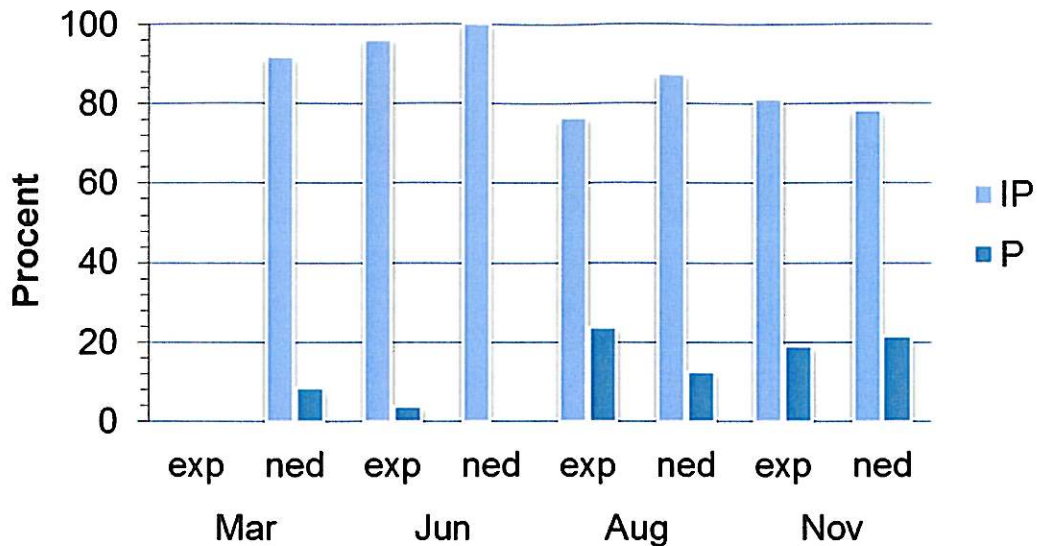


Figur 1. Sporocyster fra *Monorchis* i hjertemuslinger fyldt med (A) cercarier, (B) metacercarier af forskellig alder samt (C) gamle metacercarier. Det er bemærkelsesværdigt, at *Monorchis* kan producere både cercarier og metacercarier i hjertemusling – det kan eventuelt være sæsonbetinget. I de her undersøgte hjertemuslinger er kun set metacercarier i sporocyster (en slags rugesæk) – jf. Fig. 1. (Tegninger: Bartoli et al. 2000).

Sporocyster indeholder et antal larver, der hos andre tilsvarende arter frigives som cercarier (haleikter), men som hos nærværende art afsluttes med et metacercariestadium. Disse sidste klækker og udvikler sig først videre i tarmsystemet af en

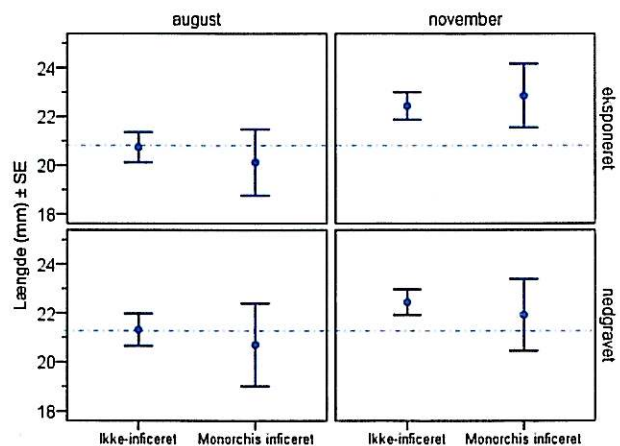
slutvært, der for den angivne parasitart er en hjertemuslingeædende fiskeart. Ved den franske Middelhavskyst, hvorfra den omtalte parasitart er beskrevet, er slutværten typisk havrudearter (Sparidae) som *Diplodus sargus*, *D. vulgaris* og *D. annularis*. Udover én observation (egen obs., KTJ) i august 2012, hvor der blev fundet 1 hjertemusling (af 12 undersøgte) inficeret med netop *Monorchis* på lavt vand ved Trend, er den nævnte parasit ikke tidligere angivet fra Limfjorden, men den er tidligere observeret ved Tjärnö i Sverige. Hvorvidt den først er dukket op på det seneste (evt. betinget af klimatiske forhold) er på indeværende tidspunkt uvist.

Der er oparbejdet data fra 4 prøvetagnings-tidspunkter i 2012 (jf. Figur 2). Her er det særligt interessant, at parasitten allerede er til stede i hjertemuslinger fra marts. Disse formodes, at være blevet inficeret før vinteren 2011-12, så det tyder på, at *Monorchis*-inficerede hjertemuslinger kan overleve vinterforhold. Det viser også, at forekomsten i sensommeren og efteråret 2012 ikke er et resultat af en episodisk hændelse i juli eller august 2012. Parasitten kan have været upåagtet til stede i Limfjorden i flere år, idet der så vidt vides, ikke har været gennemført parasitologiske undersøgelser af hjertemuslingebestande i fjorden tidligere og slet ikke af bestande på større dybde (10 m). Baseret på nærværende undersøgelse er der en signifikant stigning i prævalensen af *Monorchis* mellem juni (4%) og august 2012 (24%) i ikke-nedgravede (eksponerede) hjertemuslinger (χ^2 -test, $p=0.039$).

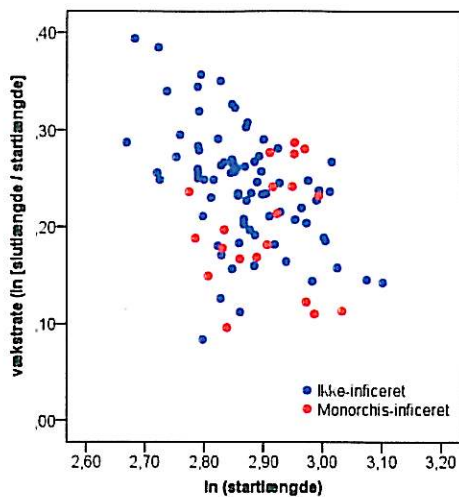


Figur 2. Prævalens af *Monorchis parvus* – inficerede hjertemuslinger blandt ikke-nedgravede og nedgravede individer i 2012 (IP: ikke -*Monorchis*-inficeret; P: *Monorchis*-inficeret); [antal undersøgte hjertemuslinger: Mar_{exp} = 0; Mar_{ned} = 24; Jun_{exp} = 26; Jun_{ned} = 25; Aug_{exp} = 29; Aug_{ned} = 32; Nov_{exp} = 48; Nov_{ned} = 51].

Der kan ikke på basis af nærværende stikprøver konstateres en signifikant forskel på prævalensen af *Monorchis* blandt nedgravede og eksponerede hjertemuslinger. Gennemsnitslængden af inficerede nedgravede og eksponerede hjertemuslinger afviger ikke fra gennemsnitslængden af ikke-inficerede (Figur 3). Der ses således ikke øget prævalens med længden af hjertemuslinger, hvilket ellers er tilfældet i mange andre parasit-værtsrelationer selv indenfor det størrelsesspektrum af hjertemuslinger (1-3 årige), der er undersøgt her. Af data fremgår, at gennemsnitslængden af hjertemuslinger både ikke-inficerede og inficerede stiger fra august til november. De inficerede individer udgør ikke en størrelsesselekeret del af populationen.



Figur 3. Gennemsnitslængde (\pm SE) af ikke-nedgravede (eksponerede) og nedgravede hjertemuslinger i august og november opdelt i *Monorchis*-inficerede og ikke-inficerede individer. Der ses en øgning i gennemsnitslængderne mellem de to tidspunkter, men der er ikke forskel i længde mellem inficerede og ikke-inficerede muslinger og heller ikke mellem nedgravede og ikke-nedgravede. Den stiplede linie, der er indsat for at lette sammenligninger, markerer gennemsnitslængderne af ikke-inficerede muslinger i august.



Figur 4. Vækstmønster af ikke- inficerede og *Monorchis*-inficerede hjertemuslinger. Vækstraten for hver musling er estimeret som forholdet mellem logaritmen til længden (\ln) i november divideret med længden ved vinteren 2011/12. Vækstraten er afbildet mod logaritmen (\ln) til længden ved vinteren 2011/12 (i henhold til en Gompertz vækstmodel).

For ikke-inficerede *C. edule* er der en signifikant hældning ($r^2 = 24.5\%$, $p < 0.1\%$). For de inficerede er hældningen ikke signifikant ($r^2 = 0.8\%$, $p = 71\%$). Der er betydelig spredning på data og ikke nogen entydig forskel i vækstrate mellem inficerede og ikke-inficerede muslinger.

Det er højest bemærkelsesværdigt, at op til 24% af de undersøgte hjertemuslinger er inficeret. Med den observerede prævalens må der være en tæt rumlig kobling mellem parasitten og dens slutvært(er), og her er et problem, idet det ikke for indværende er oplagt, hvilke hjertemuslingespisende fiskearter i Limfjorden, der forekommer i et omfang, så det kan forklare parasittens prævalens. Mens det er muligt, at der kan indgå andre slutværter end de beskrevne i *Monorchis* livscyklus, er det vanskeligt at forstå, hvordan parasitten kan være dukket op, hvis ikke det er sket via én af de beskrevne slutværter, da alternativet –

tidligere udsætning af hjertemuslinger i Limfjorden fra inficerede bestande – forekommer helt usandsynligt. Det rejser naturligt spørgsmålet, om der er dukket nye fiskearter op i Limfjorden, som endnu ikke er blevet registreret?

Hvorvidt *Monorchis* har indflydelse på vækstmønsteret hos hjertemusling er undersøgt på basis af aflæsning af årringe. Ved at undersøge tilvækst fra den vækstring, der er afsat vinteren 2011-12, og til længden i november 2012, kan det testes, om der har været forskellig vækstrate for inficerede og ikke-inficerede hjertemuslinger (Figur 4). Den tidsmæssige variation i prævalensmønsteret (Figur 3) indikerer, at infektionerne især er tiltaget mellem juni og august. Det er derfor kun en begrænset del af tilvæksten i 2012, der potentielt vil være influeret af parasitterne, og det er sandsynligvis en periode med den mindste tilvækst (gendannelse af væv efter reproduktion i juni-juli og sandsynligvis en lavere fytoplanktonproduktion i sommer/efterår end i foråret). Hertil kommer en vis usikkerhed i aflæsning af årringe, der er dannet i vinteren 2011/12 som følge af forstyrrelsesringe på nogle individer. Vækstmønsteret for inficerede og ikke-inficerede, som det fremgår af Figur 7, viser en betydelig variation i de individuelle vækstrater, og vi kan ikke på dette grundlag afdække betydningen af *Monorchis* for hjertemuslingers vækst.

Kan parasitten bidrage til at forklare episodisk forekomst af ikke-nedgravede (eksponerede) hjertemuslinger? Da der på undersøgelsestidspunktet er ens hyppighed af *Monorchis* blandt nedgravede og eksponerede hjertemuslinger tyder det ikke på, at parasitten i sig selv har betydning for om hjertemuslinger er ikke-nedgravede. Det kan imidlertid ikke udelukkes, da der kendes flere tilfælde, hvor digene ikter inducerer adfærdsændringer hos deres vært med

henblik på at eksponere værten for parasittens slutvært. Ikke-nedgravede hjertemuslinger vil være et oplagt byttedyr for konsumenter. Så der er m.a.o. en potentiel mulighed for at nærværende parasit kan fremme, at inficerede hjertemuslinger kravler op på overfladen eller alternativt, hvis de er endt på overfladen, kan parasitten hæmme nedgravning igen. I den tidligere omtalte observation af *Monorchis*-inficerede hjertemuslinger ved Tjärnö^{viii} blev foretaget et simpelt nedgravningsforsøg, hvoraf det fremgår, at signifikant færre *Monorchis*-inficerede individer var i stand til at grave sig ned i løbet af 12 timer end ikke-inficerede^{ix}. Disse forsøg bør dog suppleres med lidt mere omfattende forsøg for at afklare under hvilke betingelser de ikke graver sig ned, idet nogle af de svenske muslinger tilsyneladende var i en døende fase.

Det billede vi pt. har af prævalensmønsteret er et 'snapshot', idet vi ikke kender detaljerne i den temporale/sæsonmæssige variation. Principielt kunne der forekomme en situation, hvor infektionsraten balanceres af konsumptionsraten på inficerede muslinger (en dynamisk ligevægtssituation). En sådan balanceret situation kunne opstå idet tilstedeværelse af inficerede slutværter vil kunne indebære både frigivelse af infektiøse parasitlarvestadier og konsumtion af inficerede hjertemuslinger forårsaget af de samme fisk. På grund af parasiternes udviklingstid – kendes ikke i det konkrete tilfælde, men kan forventes at have varighed på få uger (temperaturafhængigt) under optimale forhold – kan der sagtens være en sæsonmæssig dynamik, der i perioder medfører en netto-ophobning af inficerede individer og i andre perioder en netto-eliminering af inficerede individer.

Det er tidligere rapporteret, at *Monorchis* kan forårsage stor dødelighed hos hjerte-

muslinger (tidligere omtalte undersøgelse fra Tjärnö i Sverige)^x, idet der blev observeret mange døde inficerede hjertemuslinger på lavt vand. Det vurderes, at en sådan høj dødelighed hænger sammen med høje sommertemperaturer på lavt vand. I forbindelse med nærværende undersøgelse, hvor de undersøgte muslinger blev holdt i akvarier ved en temperatur på 6-7 °C indtil de blev undersøgt, observeredes ingen dødelighed. Men med den prævalens *Monorchis* forekommer med i Salling-sundbro-populationen vil det være interessant, at få afklaret temperaturbetingede mortalitets-rater, idet ikke predationsbetinget dødelighed kan være en potentiel signifikant faktor i parasittens temporale prævalensmønster. Lave vintertemperaturer kunne evt. også bidrage til dødelighed, idet mange vævsfunktioner må være nedsat som følge af parasittens tilstedeværelse. Hvis prævalensmønsteret for *Monorchis* i 2012 er repræsentativ kan forventes en selektiv dødelighed af parasiterede hjertemuslinger mellem november og marts. Det er dog på indeværende tidspunkt en fortolkning på basis af et relativt spinkelt datamateriale.

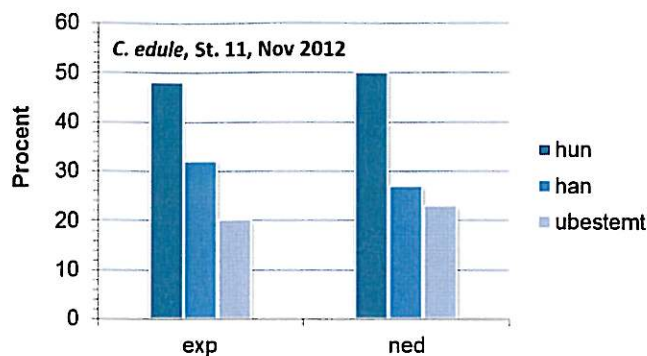
2.2 Køn og gonadestadier

De indsamlede hjertemuslinger fra august og november er undersøgt for køn og modenhedsstadium på basis af histologiske undersøgelser. For hjertemuslinger fra marts og juni, er tilstedeværelse af æg registreret i forbindelse med parasit-screeningen.

Hjertemuslingerne fra august har været vanskelige at kønsbestemme, idet gonaderne tilsyneladende ikke er restitueret efter sommergydningen og kun har været svagt udviklet i de undersøgte individer. I den forbindelse er der ikke observeret forskelle mellem nedgravede og ikke-nedgravede individer^{xi}. Derimod har der ikke været de samme problemer med at identificere kønet hos muslinger fra november, idet ca. 80% af populationen kunne kønsbestemmes (Tavle 4 & 5), og de resterende ubestemte har formentlig været hanner.

Figur 5 viser kønsfordelingen blandt nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger i november 2012. Hjertemuslinger indsamlet i november har været holdt i live ved ca. 6-7 °C og uden tilførsel af føde fra indsamlingstidspunktet (medio november) og indtil dissektion i perioden frem til slutningen af december. Det kan evt. have medført reabsorption af gonadevæv hos nogle af de sidst undersøgte individer. Gonadevævet ser dog generelt ud til at være restitueret efter gydning (i juni/juli – se senere), idet det indeholder en del forholdsvis store ægceller (jf. Tavle 4).

Observationer af sammenpressede indvoldssække under dissektionsmikroskop i forbindelse med screening efter parasitter viser, at hjertemuslinger fra marts 2012 har veludviklede gonader med tydelige æg. Det dokumenterer, at der sker en gonadeopbygning i det sene efterår 2011 og i løbet af det tidlige forår 2012. Denne

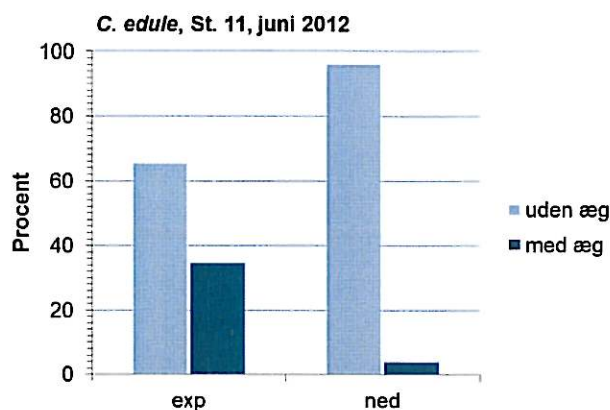


Figur 5. Kønsfordeling af nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger i november 2012 [$n_{exp} = 25$; $n_{ned} = 26$].

gonadeudvikling har formentlig været begunstiget af forholdsvis lave vintertemperaturer, idet der ikke bruges så meget oplagsnæring til dækning af stofskiftet som tilfældet er under varme vintre. Et resultat heraf er typisk en større afkomsproduktion i en gydesæson, der følger efter en kold vinter. Sammenligningen mellem hjertemuslinger fra juni og august indikerer klart, at gydningen er sket imellem de to datoer, og tilstedeværelse af modne æg i juni, antyder, at indsamlingstidspunktet i juni kan have været tæt på gydningstidspunktet.

I nærværende sammenhæng er de undersøgte hjertemuslinger fra juni måned meget interessante, idet vi her ser, at ægbærende hjertemuslinger er overrepræsenteret blandt ikke-nedgravede hjertemuslinger i forhold til nedgravede (Figur 6; Fischer's exact test, $p = 1\%$). Så vidt vides er en sådan overfladaktivitet hos ægbærende og måske næsten gydemodne hjertemuslinger ikke rapporteret tidligere. I det hele taget foreligger der ikke mange undersøgelser af hjertemuslingebestande fra 10-15 m's dybde, idet langt de fleste undersøgelser er fra tidevandszonen og indtil få meters dybde. Vi ved således ikke, om hjertemus-

linger i de dybere områder måtte have en særlig gydeadfærd eventuelt betinget af omgivelserforhold (strøm, ilt mv). Især et lavt iltindhold kunne forventes at inducere gydemodne hjertemuslinger til at bevæge sig op på overfladen, idet de p.gr.a. ægmassen formentligt har et større iltbehov end hanner.



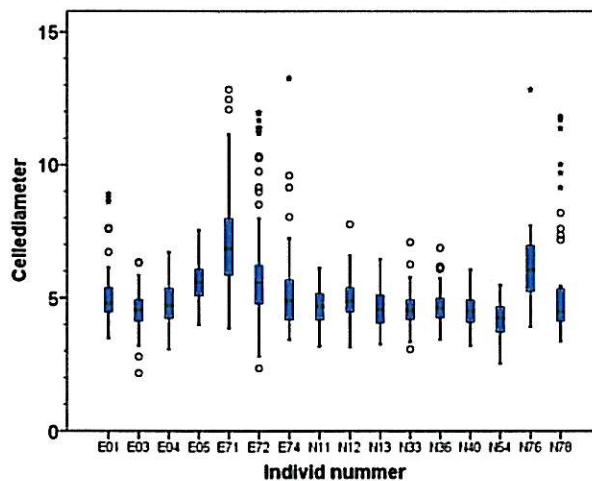
Figur 6. Procentdel af ikke-nedgravede (exp) og nedgravede (ned) hjertemuslinger (*C. edule*) med og uden æg i juni 2012 (baseret på observationer af muslingevæv presset mellem to glasplader; gruppen af hjertemuslinger uden æg omfatter både ikke køns-modne hunner og hanner). Der er signifikant forskel på fordelingen (Fischer's exact test: $p = 1\%$) [$n_{exp} = 26$; $n_{ned} = 25$].

2.3 Neoplasi

Forekomst af ukontrolleret vækst af blodceller med nedsat funktionalitet (dissimineret neoplasi) har for nyligt vist sig at være overrepræsenteret blandt ikke-nedgravede hjertemuslinger i forhold til nedgravede^{xii}. Dissimineret neoplasi er en tumorform, der giver dysfunktionelle hæmolymfeceller (hæmocytter). Hæmocytter hos muslinger har flere funktioner. De er en vigtig del af muslingers forsvarssystem, idet de kan udføre fagocytose og indkapsle fremmedlegemer og reparere vævsskader^{xiii}.

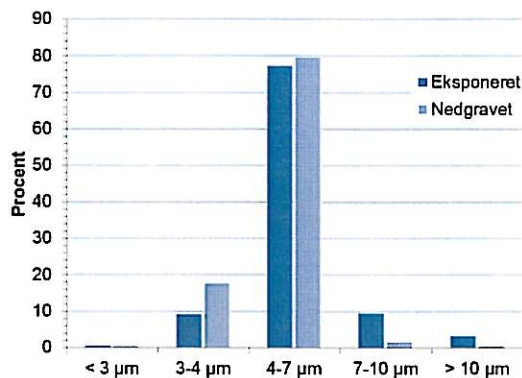
Desuden er hæmolymfeceller medansvarlige for fordøjelse og næringstransport. Hæmolymfen i patologiske individer udviser generelt et reduceret ilttryk^{xiv}. Hjertemuslinger med dissimineret neoplasi udviser også typisk en høj dødelighed^{xv}.

I nærværende undersøgelse er gennemført en screening af vævsprøver fra alle hjertemuslinger for at afdække en eventuel forekomst af atypiske hæmocytter, og desuden er der fra hjertemuslingerne indsamlet i november 2012 og holdt i live til undersøgelsestidspunktet taget hæmolymfeprøver til analyse fra bageste lukkemuskel. Der er beskrevet 4 normale hæmocytter i Almindelig hjertemusling, der størrelsesmæssigt spænder fra 3 til 12 μm i diameter^{xvi}.



Figur 7. Boxplot af størrelsesfordeling (cellediameter i μm) af blodceller i tilfældigt udvalgte ikke-nedgravede (E) og nedgravede hjertemuslinger (N) fra november 2012. Boxplot er anvendt til angivelse størrelsesspredning; de opmålte celler tilhører mere eller mindre diskrete størrelseskategorier og kan ikke forventes at repræsentere et kontinuum af størrelser. [blå rektangel: størrelsesspektrum af celler mellem 25 og 75% percentilerne; kraftig horisontal streg: median; vertikal linie: værdier ml. 1.5 og 3 gange rektangellængde; øvrige symboler: enkeltværdier udenfor den vertikale linie].

Størrelsesfordelingen af hæmocyter både blandt nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger fra novemberprøverne viser, at alle opmålte celler har en størrelse indenfor dette spektrum (Figur 7). Eksempler på typiske præparater af hæmocyter fra nedgravede og ikke-nedgravede muslinger er vist på Tavle 6.

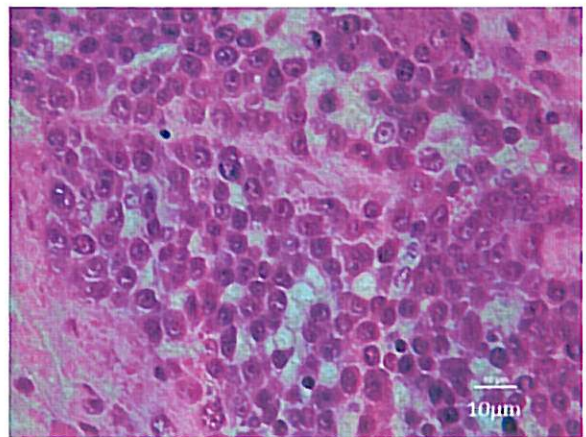


Figur 8. Størrelsesfordeling af hæmocyter i nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger udtaget fra stikprøver af hjertemuslinger indsamlet i november 2012 i Limfjorden. Blodprøver er udtaget fra bageste lukkemuskel af de undersøgte muslinger. Inddelingen i størrelseskategorier er baseret på Wootton et al. 2003 [granulære eosinofile, agranulære og granulære basofile blodceller er mellem 4-7 μm og type III eosinofile blodceller er 10-12 μm ; øvrige kategorier er medtaget for at vurdere frekvensen af celler i andre størrelsesgrupper].

Frekvensen af forskellige størrelsesgrupper udviser en signifikant forskel mellem nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger (Chi²-test: $p = 0.001$), idet celler større end 7 μm (og mindre end 15 μm) har en lidt højere hyppighed blandt ikke-nedgravede end blandt nedgravede muslinger (Figur 8). Den individuelle variation i sammensætningen af hæmocyter i prøver fra lukkemuskler fremgår af boxplotdiagrammet på Figur 7. Årsagen til ovennævnte signifikante omend beskedne forskel i frekvensen af hæmocyttørrelser kendes

ikke. Det er tænkeligt, at der blandt ikke-nedgravede hjertemuslinger er en overrepræsentation af individer i en svækket eller stresset tilstand, og at det har indflydelse på hæmocytsammensætningen, idet de forskellige blodcelletyper udfylder forskellige funktioner^{xvii}.

Hverken screening af hæmolymfe præparaterne eller de histologiske snit har givet indikationer for tilstedeværelse af neoplasiceller – en vurdering der især er baseret på størrelserne af de observerede celler. Der er heller ikke observeret cellegrupperinger, der kan fortolkes som atypiske og udtryk for uhæmmet cellevækst. De observerede hæmocyter er generelt små og mindre end 7 μm og falder indenfor kategorien granulære eller agranulære blodceller (Figur 9). I et tidligere studium er rapporteret, at granulære og agranulære celler med cellediameter på op til 7 μm udgør omkring 90% af blodcellerne i *C. edule*^{xviii}, hvilket stemmer godt overens med de observerede størrelser i nærværende undersøgelse.



Figur 9. Eksempler på hæmolymfe celler i *C. edule* væv fra st. 11 (markeret med pil). Baseret på histologiske snit af indvoldssækken og efterfølgende farvning af præparatet. [N: nedgravet; tallet angiver individ nummer; målestok angiver: 10 μm]

3. Diskussion

Nærværende undersøgelse har været centreret om at analysere hjertemuslinger fra Limfjorden for at identificere mulige årsager til det fænomen, at hjertemuslinger undertiden iagttages liggende på havbunden og ikke-nedgravet. I undersøgelsen har der eksplicit været fokus på at undersøge, om der er forskel på nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger med hensyn til parasit-sammensætning, køn og forekomst af atypiske blodceller (neoplasi).

Forekomst af ikten *Monorchis parvus* i den undersøgte hjertemuslingebestand er indtil videre det mest bemærkelsesværdige, og det påkalder sig naturligvis yderligere undersøgelser, idet en prævalens på 20% blandt både nedgravede og eksponerede hjertemuslinger er en unik observation. I hvilken udstrækning denne parasit bidrager til øget overfladeaktivitet i bestanden kan ikke afgøres for indeværende, men alene det, at 80% af de øvrige eksponerede muslinger ikke er inficeret, indikerer at andre faktorer er på spil. Men det er notorisk en mulighed, at en del af de eksponerede hjertemuslinger kun er midlertidigt eksponerede, idet en række forhold i sedimentet kan inducere hjertemuslinger til at komme op til overfladen. Hjertemuslinger tåler kun forholdsvis kort tids eksponering til iltfri forhold, og det er observeret, at de kommer op til sedimentoverfladen ved lave iltspændinger, hvorved de eventuel kan passere et iltfattigt grænselag. I tidligere studier er det observeret, at parasiterede hjertemuslinger er mere følsomme overfor anoxiske forhold end ikke-parasiterede^{xix}.

En bedre forståelse af parasit-dynamikken i værtspopulationer forudsætter et detaljeret kendskab til den tidsmæssige variation i parasittens forekomst. Men ikke mindst er det også nødvendigt at få identificeret

mulige fiske Slutværter til *Monorchis* i Limfjorden. Umiddelbart er det overraskende, at netop *Monorchis* forekommer i Limfjorden, idet de beskrevne fiskeværter for parasitten ikke så vidt vides er registreret her. Andre fiskearter vil sandsynligvis også kunne optræde som værter, men umiddelbart er der ikke et bud på hvilke arter, der dels forekommer i tilstrækkelige mængder på de undersøgte stationer, og som også spiser hjertemuslinger af den størrelse, der her er undersøgt. Undersøgelser er her nødvendige for at få klarlagt, hvad der kontrollerer parasittens udbredelse og dynamik.

Nærværende undersøgelse tyder ikke på, at hjertemuslinger på de undersøgte stationer har atypiske hæmocytter (neoplasi-celler) betinget af en tumor-lignende sygdom. Det udelukker dog ikke forekomst af neoplasii-celler på andre tidspunkter end i august og november eller at en forholdsvis lille del af populationen er ramt. Men indtil videre tyder analyserne således ikke på, at den observerede forekomst af hjertemuslinger på sedimentoverfladen kan tilskrives dissimineret neoplasi. Fra tidevandsflader i bl.a. Irland^{xx} og Frankrig^{xxi} er det rapporteret, at ikke-nedgravede hjertemuslinger har en større prævalens af neoplasi-celler end nedgravede hjertemuslinger. Det fremgår endvidere, at forekomsten af neoplasi-celler udviser tidsmæssig variation, så man kan ikke på grundlag af nærværende undersøgelse udelukke, at det ikke også forekommer i Limfjordspopulationer.

Årsager til dissimineret neoplasi hos muslinger i almindelighed og hos hjertemuslinger i særdeleshed er ikke afklaret. Nogle undersøgelser har vist, at fx frekvensen af sandmuslinger med dissimineret neoplasi er korreleret med forskellige miljøfremmede stoffer (olieforurening, PCB/PAH). I litteraturen er der nogen variation i beskrivelsen af neoplasi-celler, og

der kan være forskellige fænomener impliceret i de forskellige symptomer på sådanne atypiske hæmolymfeceller^{xviii}.

Blandt de undersøgte faktorer til forklaring af overfladeaktivitet hos hjertemuslinger, ser det ud til, at andelen af gydemodne hunner, især har betydning. Den gruppe var i særdeleshed overrepræsenteret blandt ikke-nedgravede hjertemuslinger ved prøvetagningen i juni. Selvom antallet af undersøgte individer i juni er forholdsvis beskedent, er resultatet dog tydeligt. Det kan naturligvis ikke udelukkes, at der netop omkring prøvetagningstidspunktet i juni har været lave iltspændinger eller andre forhold som især hunner med modne æg har responderet på, og at noget tilsvarende vil kunne være sket for ægbærende hunner også på tidspunkter, hvor de ikke er tæt på gydning. En nærmere analyse af dette må afvente data for f.eks. iltindhold i bundvandet i undersøgelsesperioden.

Så vidt vides, er en sådan overfladesøgende adfærd hos gydemodne hunner ikke beskrevet tidligere. Umiddelbart kunne en sådan adfærd tænkes induceret af lave iltspændinger eller andre suboptimale forhold, idet det må vurderes som risikabel adfærd for en hjertemusling, der derved eksponeres for potentielle konsumenter, og som derfor kun realiseres, når overlevelsen er på spil. Ægbærende hunner kunne tænkes at have en højere metaboliserate end hanner, og derfor respondere anderledes på et lavt iltindhold end hanner. Alternativt kunne forklaringen være, at ægspredning i forbindelse med gydning hos sublittorale hjertemuslinger bedre sikres, når muslinger kommer op til overfladen. Det må erkendes, at disse forklaringer er spekulative og bør underkastes en nøjere undersøgelse.

De tre undersøgte forhold: parasitter, gydemodenhed og neoplasi vil alle i

princippet kunne give anledning til at hjertemuslinger ikke er nedgravede, og der foreligger observationer, der verificerer dette. Imidlertid er de nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger fra august og september 2012 ikke forskellige fra hinanden mht. parasitbelastning, kønsforhold og neoplasi, hvorfor disse faktorer ikke synes at kunne forklare overfladeaktiviteten på netop disse tidspunkter. Da der ikke umiddelbart er observeret andre forskelle mellem de nedgravede og ikke-nedgravede individer fra august og september 2012 må konklusionen være, at populationen af ikke-nedgravede på de angivne tidspunkter er et helt tilfældigt udsnit af populationen af de nedgravede hjertemuslinger.

Da der ikke på indeværende tidspunkt foreligger data, der viser den tidsmæssige variation i antallet af ikke-nedgravede i forhold til nedgravede hjertemuslinger, er det uklart om prøvetagningerne i august og november er interessante i forhold til frekvensen af overfladeaktive. Baseret på de supplerende prøver af hjertemuslinger fra juni vil prognosen fra nærværende undersøgelse være, at især i en periode omkring gydetidspunktet kan forventes mange ikke-nedgravede hjertemuslinger, da det ser ud til, at de gydemodne hunner da vil være eksponerede. I det omfang lave iltspændinger er en medvirkende faktor til at muslinger kravler op på sedimentoverfladen vil forekomsten af ikke-nedgravede hjertemuslinger have en mere episodisk end periodisk karakter.

4. Materialer og metoder

Dansk Skaldyrcenter, Nykøbing Mors (Carsten Formsgaard Nielsen) har foretaget kvantitative indsamlinger af nedgravede og ikke-nedgravede hjertemuslinger på stationer ved Sallingsundbroen og enkelte andre steder i Limfjorden på forskellige tidspunkter i 2012. Hjertemuslinger indsamlet i november 2012 er modtaget levende ultimo november, og muslinger indsamlet 17. august 2012 er modtaget i frossen tilstand 19.01.2013. Endvidere er der i nærværende undersøgelse inddraget frosne muslinger fra andre tidspunkter i 2012 til supplerende analyser. Her er det kun procedurer i forbindelse med laboratorieanalyserne af hjertemuslingerne, der beskrives.

Hjertemuslinger fra november indsamlingen har i perioden fra modtagelse og indtil undersøgelsestidspunktet for den enkelte musling været anbragt i akvarium ved ca. 6°C og 29 psu uden tilsætning af føde.

Proceduren ved behandling af hjertemuslingerne:

1. Udtagning af blodprøve fra lukkemuskel hos levende individer (ikke frosne hjertemuslinger) til analyse af blodceller.
2. Muslingekødet skræbes ud af skallerne. Der er udtaget ca. 5 mm tykke vævsprøver af indvoldssækken af 50 hjertemuslinger fra både august og november indsamlingerne. Fra augustmuslinger er endvidere taget vævsprøver af gælle og kappen. Efterfølgende er disse snit præpareret med henblik på en histologisk analyse (konservering, indstøbning, vævssnitning, montering og farvning).
3. Resten af muslingen anbringes i et kompresorium (to rektangulære glasplader der skrues sammen om muslingekødet) med henblik på screening for makroparasitter og gonader under stereomikroskop.
4. Alle undersøgte hjertemuslinger er blevet opmålt (længde i mm) og længden ved forskellige årringe er målt. Årringene har i flere tilfælde været vanskelige at afgrænse pga forstyrrelsesringe.

Analyse af blodceller & diagnosticering af atypiske blodceller.

Der er anvendt to metoder til observation af blodceller: 1) Cytocentrifugering af blodprøver og efterfølgende farvning og iagttagelse i mikroskop og 2) screening af histologiske præparater i mikroskop. Observation i mikroskop er typisk foretaget ved 400 til 1000 x forstørrelse (Zeiss Axioscope).

Ad 1 Hæmolymfeprøver er udtaget fra én af lukkemusklerne (primært bageste men i enkelte tilfælde er forreste lukkemuskel anvendt) ved at trække skaldelene lidt fra hinanden og opsuge hæmolymfe med en 1 ml injektionssprøjte forsynet med en nål (27 'gauge'). Hæmolymfen er herefter fortyndet i forholdet 1:2 med koldt (5 °C) Alsever's antiaggregant opløsning, og der er foretaget cytocentrifugering af væsken (1050 RPM i 5 min, svarende til 92 x g, 5 min) ned på et objektglas. Præparatet er efterfølgende farvet med Hemacolor kit og forseglet med EUKITT. Der er foretaget stikprøveopmålinger af blodcellerne under mikroskop (400 – 1000 x forstørrelse – ca. 100 celler pr undersøgt musling). Præparaterne er desuden screenet for celledørrelse og form. Tilsvarende metode er anvendt af Le Grand et al. (2010) , Diaz et al. (2010) og Diaz et al. (2011).

Ad 2 Alle undersøgte muslinger er screenet på basis af vævssnit farvet med haematoxylin og eosin (se procedure for behandling af vævssnit) for observation af celledørrelse og form af spredte blodceller i vævet. Neoplasticeller er generelt kendetegnet ved at de er større end normale hæmolymfeceller (diametere er 2-4 gange større). Desuden har sådanne celler store cellekerner (nucleus) der indebærer en stor nucleus / cytoplasma-ratio og ofte ses cellerne i en celledelingsfase ('mitotic figures')^{xxiii}. Der er generelt beskrevet 4 stadier^{xxiv}: i) forekomst af et lille antal neoplasi-celler evt. samlet i enkelte områder; ii) neoplasi-celler er begyndt at infiltrere bindevæv; iii) neoplasi-celler har infiltreret bindevæv og er til stede i hæmolymfe ansamlinger ('sinuses'); iv) neoplasi-celler er til stede i stort tal i hele organismen.

I nærværende undersøgelse er lagt vægt på celledørrelser, idet den eksplicite forventning

har været at neoplasii-celler er væsentlig større end flertallet af hjertemuslingens blodceller. Er dette kombineret med en forholdsvis stor cellekerne i forhold til cytoplasma vil cellen blive karakteriseret som en neoplasii-celle. Infiltration af væv med atypiske celletyper er også et diagnostisk træk, der kan afdækkes ved screening af histologiske snit. På figur 2d i Grand et al (2010) ses det søgebillede, der i nærværende undersøgelse er anvendt i forbindelse med afsøgningen af vævsprøver for neoplasi-celler. Der er imidlertid rapporteret om neoplasi-celler som ikke i størrelse adskiller sig fra normale celler, men alene vil kunne detekteres på basis af en mere omfattende og nuanceret screenings-teknik end anvendt her.

Det må erkendes, at der er nogen usikkerhed ved ovennævnte fremgangsmåde ikke mindst hvis det drejer sig om erkendelse af tidlige stadier, hvor der ikke er synlig vævsinfiltration. Men på den anden side er der næppe tvivl om, at muslinger med veludviklet dissemineret-neoplasii vil blive detekteret med den her anvendte metodik.

Identifikation af køn og gonadestadier på basis af histologiske snit

Vævsprøver er behandlet i henhold til standardprocedurer for histologiske snit. Det udtagne væv fra hjertemuslinger er fikseret i Davidsons væske [1 del glycerin, 1 del iseddikesyre, 2 dele 37% formaldehyd, 3 dele ethanol og 3 dele isotonisk NaCl (20-30 o/oo)]. Herefter er vævsstykkerne ført gennem en alkoholserie af stigende stigende styrke indtil 99.9% med henblik på dehydrering. Efterfølgende er vævet tilsat Technovit 7100 og overført til små kamre under størkningsprocessen og behandlet i henhold til forskrifterne for Technovit.

Der er lavet 3 µm tynde snit med en roterende mikrotom (HM 355S) påmonteret en tungsten carbid kniv (d = 16 cm). Snittene er herefter monteret på objektglas, farvet med Mayer hæmatoxylin og forsejlet med eukit.

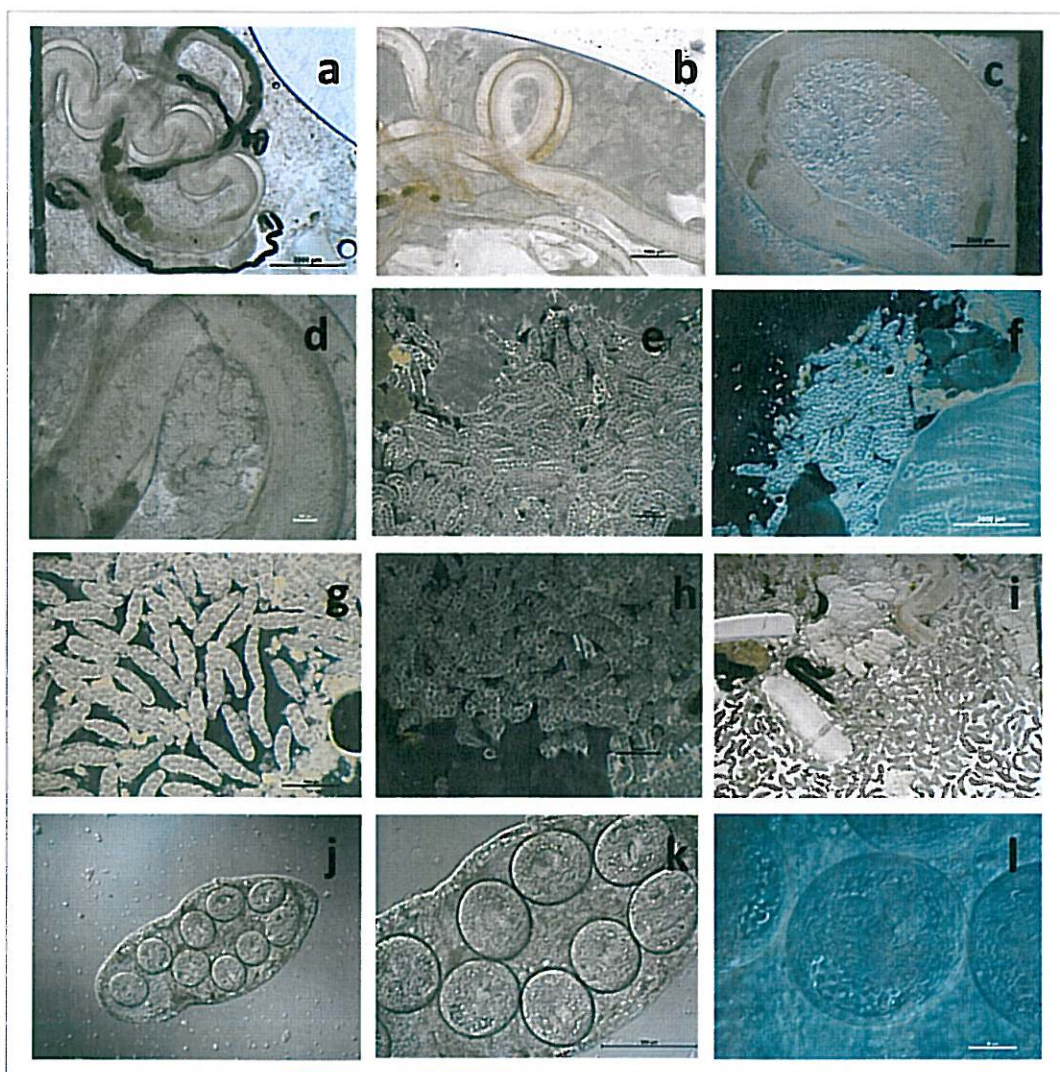
Histologiske snit fra alle hjertemuslinger er observeret under mikroskop (Axioscope) for at identificere individernes køn og gonadernes

modenhedsstadie^{xxv}. I samme proces er foretaget observationer af blodceller samt makroparasitter.

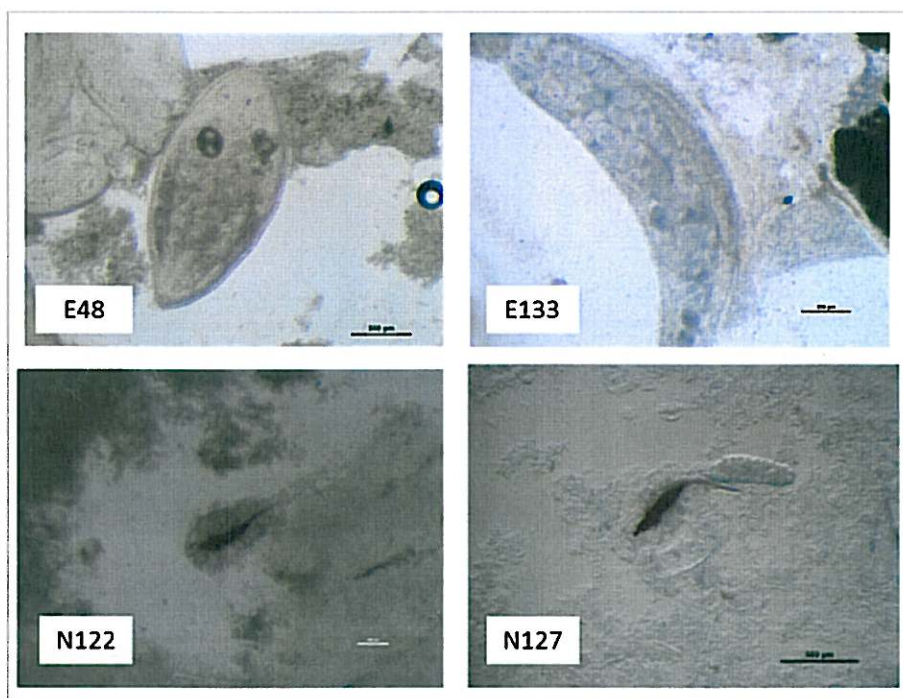
Parasitologisk analyse

Væv fra hjertemuslinger er sammenpresset mellem to glasplader, der kan spændes (kompressorium der bl.a. anvendes på slagterier i forbindelse med screening for cyster o.l.). Gennem systematisk afsøgning af vævet er metazoer registreret, identificeret og evt. optalt (dog ikke praktisk muligt for *Monorchis parvus* larvestadier, der typisk vælter ud af inficerede individer). Oversigt over makroparasitter i europæiske bestande af hjertemuslinger findes i Montaudouin et al. (2009).

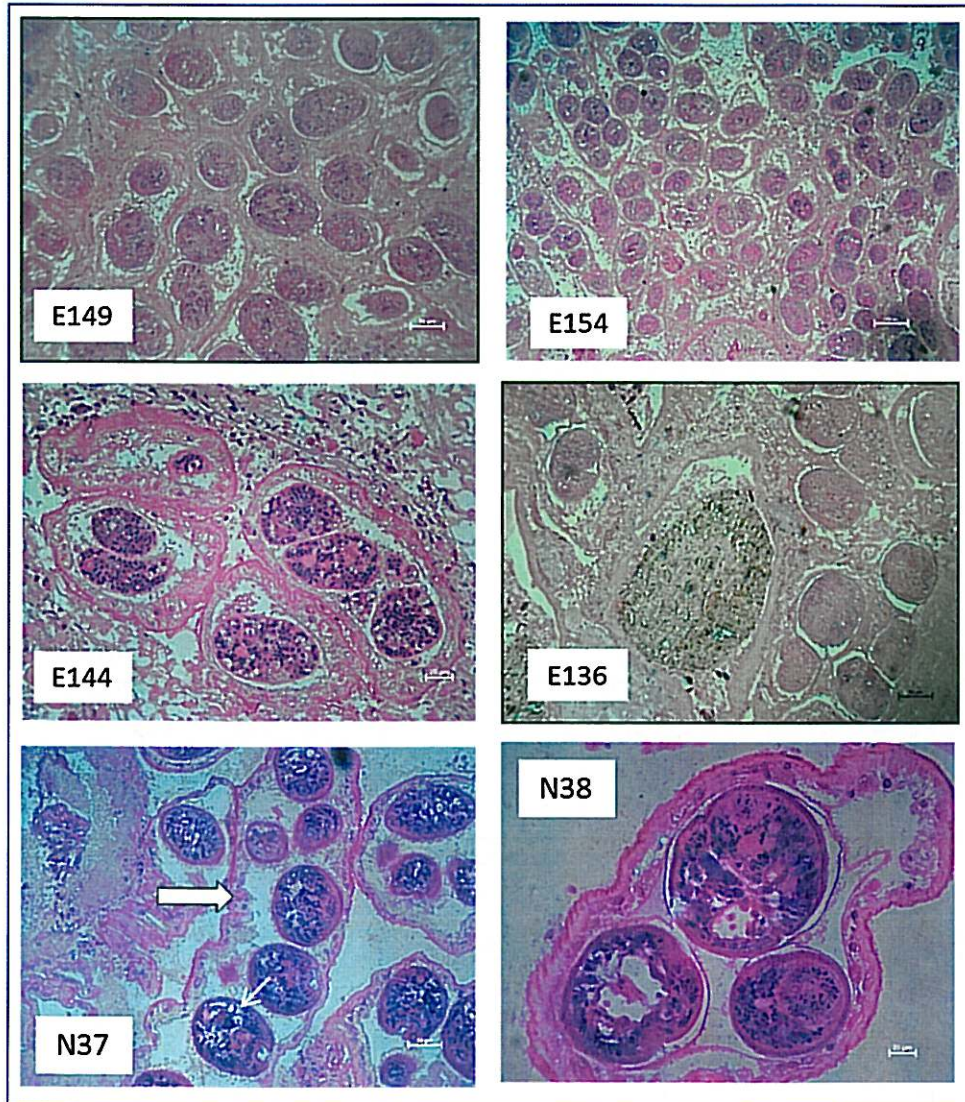
5. Figurtavler



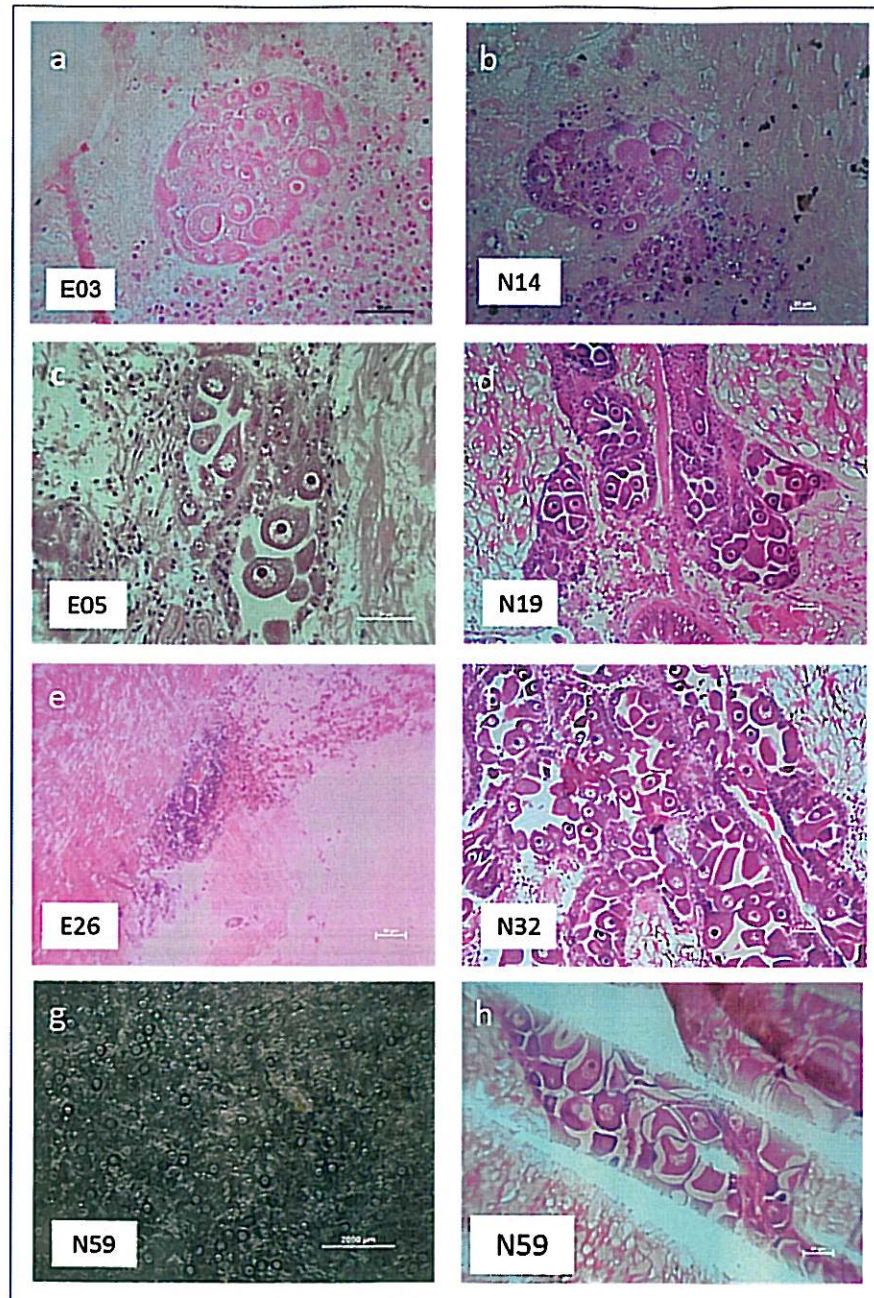
Tavle 1. Væv fra Almindelig hjertemusling - *Cerastoderma edule* - (indsamlet ved Sallingsundbroen) der er presset i et kompressorium (to glasplader der spændes sammen) og iagttaget ved forskellige forstørrelser i stereolup (a-i). De resterende (j-l) er isolerede parasitstadier fotograferet gennem et sammensat mikroskop. (a), (b) & (c): ikke-parasiterede individer med gonadevæv omkring mave-tarm kanal; (d): parasiterede individer med *Monorchis* larvestadier, der har elimineret gonadevæv; (e-i): *Monorchis* sporocyster med metacercarier associeret med for-skelligt væv og frigjort i forbindelse med sammenpresning af væv; (j-l) *Monorchis*-sporocyster med metacercarier. [fotograferede individer - a: E47, b: N40, c: N59, d: N32, e: N39, f, g & h: E07; i: E29; j - l: E07; E: eksponeret; N: nedgravet].



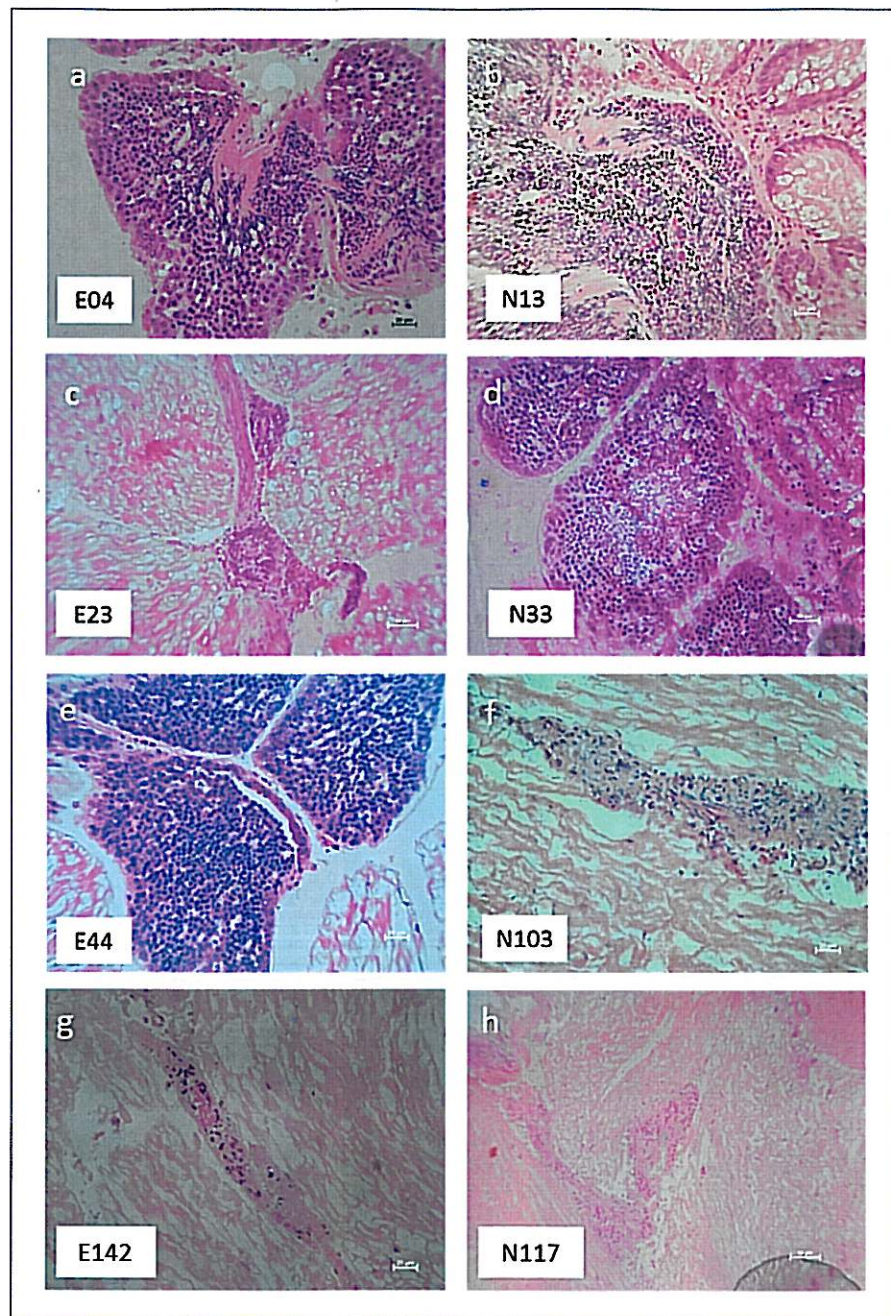
Tavle 2. Kommensaler i hjertemuslinger fra st. 11. Øverste foto t.v. ses en fladorm (*Paravortex cardii*), der er udbredt i hjertemuslingens tarmsystem. Den reproducerer sig i muslingen – t.h. ses et adult individ med afkom (bemærk små sorte øjepletter). Forneden t.v. ses en copepod (*Hermannella rostrata*), der typisk forekommer i hjertemuslingens gæller. Til højre et individ med ægsæk. . [E: ikke-nedgravet, N: nedgravet; tallet angiver individnummer].



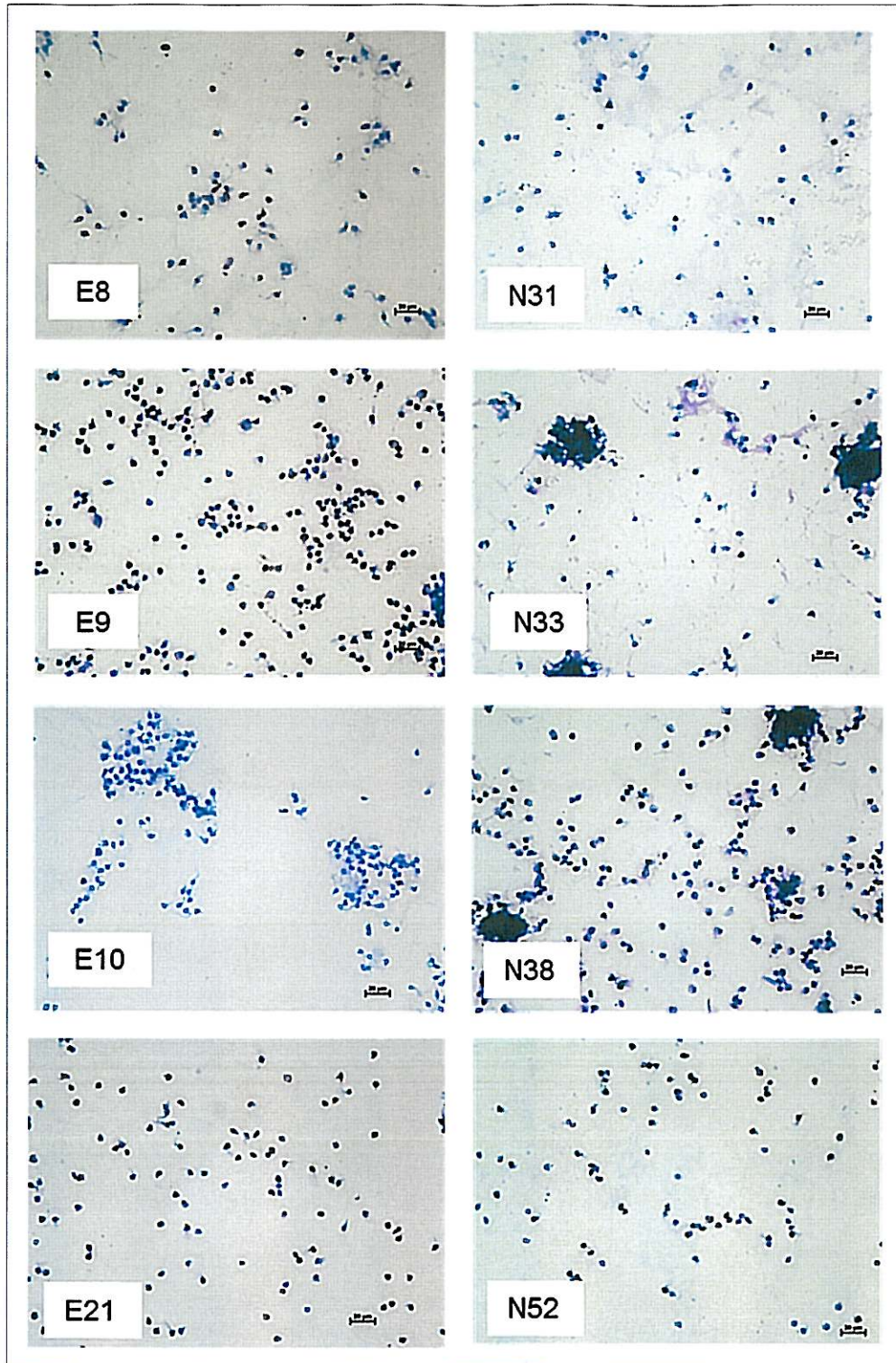
Tavle 3. Eksempler på tæthed af *Monorchis* larver i *C. edule* væv fra st. 11. Sporocyster markeret med tyk pil og metacercarier med tynd pil på N37. Pil ved E136 viser et snit af tarmen. Baseret på histologiske snit af ind-voldssækken og efterfølgende farvning af præparatet. [E: ikke-nedgravet, N: nedgravet; tallet angiver individ-nummer].



Tavle 4. Histologisk snit af gonader med æg fra hjertemuslinger indsamlet på st. 11 i november 2012. Alle gonader er her under genopbygning efter sommerens gydning. På snittene ses ikke-udviklede ægceller sammen med mere eller veludviklede ægceller. Nederst (g) ses et makroskopisk foto af en gonade (målestok 2000 µm) fra individ N59. På figur h ses et histologisk snit fra samme individ (dog et lettere beskadiget vævsstykke). Måleenheden er 50 µm bortset fra N59, hvor den er 2000 µm. [E: ikke-nedgravet, N: nedgravet; tallet angiver individnummer].



Tavle 5. Histologiske snit af gonader fra hjertemuslinger indsamlet på st. 11 i 2012. Figur a-e er hanlige gonader fra hjertemuslinger indsamlet november 2012, der er i et fremskreden gametogenese stadium, mens figur f-h re-præsenterer udifferentierede gonader fra august 2012 i en post-gydnings fase, hvor kønnet ikke kan identificeres. [E: ikke-nedgravet, N: nedgravet; tallet angiver individ nummer; stadietegnelse fra Martines-Castro & Vazquez, 2012].



Tavle 6. Eksempler på celler fra forskellige individer af hjertemuslinger (E: ikke-nedgravede; N: nedgravede). Præparater er fremstillet på basis af cytocentrifugering af hæmolymfe prøver udtaget fra lukkemuskler. Klumper på nogle af præparaterne skyldes, at ikke alle celler er blevet effektivt dispergeret. Måleenheden er 20 μ m.

6. Litteraturliste

- Barber BJ (2004).** Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat Living Resour* 17: 449-466
- Bartoli P, Jousson O, Russel-Pinto F(2000).** The life cycle of *Monorchis parvus* (Digenea: Monorchidae) demonstrated by developmental and molecular data. *J. Parasitol.* 86: 479-489
- de Montaudouin X, Thieltges DW, Gam M, Krakau M, Pina S, Bazairi H, Dabouineau L, Russel-Pinto F, Jensen KT (2009).** Digenean trematode species in the cockle *Cerastoderma edule*: identification key and distribution along the north-eastern Atlantic shoreline. *JMBA* 89: 543-556
- Desclaux C, de Montaudouin X, Bachelet G (2002).** Cockle emergence at the sediment surface: 'favourization' mechanism by digenean parasites? *Dis Aquat Org* 52: 137-149
- Díaz S, Cao A, Villalba A, Carballal MJ (2010).** Expression of mutant protein p53 and Hsp70 and Hsp90 chaperones in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. *Dis Aquat Org* 90: 215-222
- Díaz S, Renault T, Villalba A, Carballal MJ (2011).** Disseminated neoplasia in cockles *Cerastoderma edule*: ultrastructural characterisation and effects on haemolymph cell parameters. *Dis Aquat Org* 96: 157-167
- Le Grand F, Kraffe E, de Montaudouin X, Villalba A, Marty Y, Soudant P (2010).** Prevalence, intensity, and aneuploidy of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment. *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 110-118
- Longshaw M, Malham SK (2013).** A review of the infectious agents, parasites, pathogens and commensals of European cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*). *JMBA* 93: 227-247
- Jørgensen BB (1980).** Seasonal oxygen depletion in the bottom waters of a Danish fiord and its effect on the benthic community. *Oikos* 34: 68-76
- Jonsson PR, André C (1992).** Mass mortality of the bivalve *Cerastoderma edule* on the Swedish west coast caused by infestation with the digenean trematode *Cercaria cerastodermæ* 1. *Ophelia* 36: 151-157
- Jousson O, Bartoli P, Pawlowski, J (2000).** Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *J Evol Biol* 13: 778-785
- Martinez-Castro C, Vazquez E (2012).** Reproductive cycle of the cockle *Cerastoderma edule* (Linnaeus 1758) in the Ria De Vig (Galicia, Northwest Spain). *J Shell Ass* 31: 757-767
- Morgan E, O'Riordan RMO, Kelly TC, Culloty, SC (2012).** Influence of disseminated neoplasia, trematode infections and gametogenesis on surfacing and mortality in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis Aquat Org* 98: 73-84
- Russel-Pinto F, Reimao R, de Sousa, M (1994).** Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. *Fish Shellfish Immunol* 4: 383-397
- Thieltges DW, Reise K (2006).** Metazoan parasites in intertidal cockles *Cerastoderma edule* from the northern Wadden Sea. *J Sea Res* 56: 284-293
- Wegeberg AM, Jensen KT (1999).** Reduced survivorship of *Himasthla* (Trematoda, Digenea)-infected cockles (*Cerastoderma edule*) exposed to oxygen depletion. *JSR* 42: 325-321
- Wootton EC, Dyrynda EA & Ratcliffe NA (2003).** Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunol* 15: 195-210

7. Noter

- ⁱ Jørgensen BB (1980)
- ⁱⁱ Blanchet H et al (2003)
- ⁱⁱⁱ Desclaux C et al (2002)
- ^{iv} i) Le Grand F et al (2010); ii) Morgan E et al (2012)
- ^v Identifikation af *Monorchis parvus* i nærværende undersøgelse er i første omgang foretaget på basis af morfologiske træk ved larvestadierne. Disse er senest beskrevet af Bartoli et al (2000) på basis af hjertemuslinger fra Aveiro i Portugal. For at verificere artsbestemmelsen er der foretaget en analyse af ITS1-sekvensen af ribosomal DNA fra individuelle larvestadier isoleret fra sporocyster i *C. edule* fra Sallingsundpopulationen. En sekvens på 539 nucleotidpar er blevet sammenlignet med rapporterede sekvenser baseret på *M. parvus* larver fra hjertemuslinger fra Aveiro, Portugal (Bartoli et al, 2000). Den sammenligning viser overbevisende identitet mellem Sallingsundsekvensen og Aveirosekvensen, idet der kun er en enkelt nucleotid-substitution, og det konkluderes, at *C.edule* i Limfjorden er inficeret med *M. parvus*. . Det adulte stadium af *M. parvus* er beskrevet fra *Diplodus annularis* (Sorthalet havrude) indsamlet i den kystnære zone ved den franske Middelhavskyst og ligeledes identificeret v.h.j.a. ITS1-nucleotid sekvensen af ribosomal DNA (Bartoli et al, 2000). Da *C. edule* ikke er udbredt i Middelhavet må infektionen af *D. annularis* komme fra brakvandshjertemuslingen (*C. glaucum*), der da også er rapporteret som vært for *M. parvus* (Bartoli et al, 2000). DNA undersøgelsen på *Monorchis*-larverne er udført af stud. scient. Kasper Lind Andersen (bachelorprojekt).
- ^{vi} Longshaw M, Malham SK (2013)
- ^{vii} -do-
- ^{viii} Jonsson PR, André C (1992) [KTJ tilføjelse: *Cercaria cerastodermæ* omtalt i Jonsson & André (1992) er senere blevet identificeret som en tidligere beskrevet ikke *Monorchis parvus* i Bartoli et al (2000)]
- ^{ix} Jonsson PR, André C (1992).
- ^x -do-
- ^{xi} Det er et punkt, vi vil forsøge at få yderligere dokumentation for ved at undersøge flere hjertemuslinger fra august 2012 (på lager i frossen tilstand). Ved svagt udviklede gonader er det afgørende, hvor præcist et histologisk snit udtages for at individet kan kønsbestemmes. Til verifikation af gonadeudviklingen i hjertemuslinger fra august, vil der derfor blive søgt udtaget flere snit fra indvoldssækken til en histologisk undersøgelse.
- ^{xii} i) Morgan et al (2012); ii) Le Grand et al (2010)
- ^{xiii} i) Wootton et al (2003); ii) Russell-Pinto et al (1994)
- ^{xiv} Sunilla (1991) cit i Barber (2004)
- ^{xv} Barber (2004)
- ^{xvi} Wootton et al (2003)
- ^{xvii} Wootton EC, Dyrinda EA & Ratcliffe NA (2003)
- ^{xviii} -do-
- ^{xix} Wootton et al (2003)
- ^{xx} Morgan et al (2012)
- ^{xxi} Le Grand et al (2010)
- ^{xxii} Longshaw & Malham (2013); Barber (2004)
- ^{xxiii} Barber BJ (2004)
- ^{xxiv} -do-
- ^{xxv} Martinez-Castro & Vazquez E (2012)