

Effekter på laks (*Salmo salar*) ved eksponering for monokloramin



Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Sør

Jon Lilletuns vei 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Innlandet

Sandvikaveien 59
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
5006 Bergen
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Danmark

Njalsgade 76, 4. sal
2300 København S, Danmark
Telefon (45) 39 17 97 33

Internett: www.niva.no

Tittel Effekter på laks (<i>Salmo salar</i>) ved eksponering for monokloramin	Løpenummer 7358-2019	Dato 28.02.2019
Forfatter(e) Anders Gjørwad Hagen ¹ , Sigurd Hytterød ² , Kjetil Olstad ³ , Øyvind Garmo ¹ , Mari Darrud ² , Tobias Holter ³ , Elena Martínez-Francés ¹ , Erik Höglund ¹ , Silvio Uhlig ² , Christiane Kruse Fæste ² , Lada Ivanova ² og Mona Gjessing ² ¹ Norsk institutt for vannforskning, ² Veterinærinstituttet i Oslo, ³ Norsk institutt for naturforskning	Fagområde Vannressursforvaltning	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Buskerud	Sider 37

Oppdragsgiver(e) Miljødirektorat	Oppdragsreferanse Anne Kristin Jøranlid
	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 180127

<p>Sammendrag</p> <p>Det er gjort flere eksperimentelle forsøk med formål å utvikle klor som behandling mot <i>Gyrodactylus salaris</i> i elver. Gjennom disse forsøkene er det funnet at svært lave konsentrasjoner av klor tilsatt som monokloramin, kan fjerne <i>G. salaris</i> fra laksunger i løpet av få dager uten å ha synlige negative effekter på laksen. Klor kan være giftig for fisk, og flere arter innenfor laksefamilien (<i>Salmonidae</i>) er beskrevet som svært følsomme for klor. Det er imidlertid stor variasjon i oppgitte konsentrasjoner for akutt giftighet. Kronisk giftighet for klor er observert etter eksponering for residualt klor helt ned i 3 µg/l, men da over en eksponeringsperiode på 12 uker. Hensikten med dette prosjektet har vært å undersøke om, og eventuelt hvordan, ettårige og toårige laksunger påvirkes av eksponering for klorkonsentrasjoner som er relevant for behandling mot parasitten. Det ble også undersøkt om fisken evner å restituere eventuelle subletale effekter fra kloreksporingen. Eksponering for vann tilsatt 30 og 60 µg klor/l ga kun små blodfysiologiske forandringer hos fisken. Alle fysiologiske forandringene, med unntak av reduserte hematokritverdier hos gruppen med ettåringer, restituerte også raskt etter endt kloreksporing. Kloreksporingen ga ingen patologiske forandringer i gjellene, og det ble ikke registrert vesentlige forskjeller i protein- og metabolittsammensetningen i slimlaget til klorekspont fisk sammenlignet med kontrollfisk. Det var liten forskjell i fysiologisk effekt på laksungene som ble eksponert for de to klordosene. Dette gir en viss grad av fleksibilitet ved dosering av kloramin til et vassdrag, og lokale variasjoner i klorkonsentrasjon kan tolereres av fisken. Forsøket indikerer at laksunger kan eksponeres i inntil 17 dager for dobbelt så høy klordose som tidligere har vist seg å fjerne parasitten fra laks i løpet av 2-4 dager. En slik fleksibilitet representerer en robusthet for eventuell bruk av kloramin som behandling kjemikalium mot <i>G. salaris</i>.</p>

Fire emneord	Four keywords
<ol style="list-style-type: none"> 1. Monokloramin 2. <i>Gyrodactylus salaris</i> 3. Fysiologi 4. Atlantisk laks 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Monochloramine 2. <i>Gyrodactylus salaris</i> 3. Physiology 4. Atlantic salmon

Denne rapporten er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkjent av:

Anders Gjørwad Hagen
Prosjektleder

Erik Höglund
Kvalitetssikrer

ISBN 978-82-577-7093-8
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

Effekter på laks (*Salmo salar*) ved eksponering for monokloramin

Forord

På bakgrunn av tidligere utredningsarbeider fremla prosjektgruppen for Miljødirektoratet i februar 2018 forslag til videre utredning av klor som bekjempelsesmiddel i kampen mot lakseparasitten *Gyrodactylus salaris*. Med utgangspunkt i et skissert treårig prosjekt valgte Miljødirektoratet å etablere en treårig intensjonsavtale.

Prosjektet er organisert som et samarbeid mellom NIVA, Veterinærinstituttet og NINA. Koordinerende og administrativt ansvar har ligget hos NIVA, ved prosjektleder forskningsleder Anders Gjørwad Hagen. De tre institusjonene NIVA, Veterinærinstituttet og NINA er likestilte.

Forsøket som rapporteres her er gjennomført i stamfiskhuset til Drammen og Omland Fiskeadministrasjon (DOFA) sitt klekkeri ved elva Glitra. Vi vil takke DOFA og spesielt Trond Håvelsen for god hjelp i gjennomføring av prosjektet.

Erik Höglund sine leveranser i rapporten er statistiske analyser av blodfysiologidata. Disse leveransene er kvalitetssikret av Kjetil Olstad.

Forsøkene er gjennomført med tillatelse fra Mattilsynet i henhold til *Forskrift om bruk av dyr i forsøk* med FOTS-ID 15598

Oslo, 28.02.2019

Anders Gjørwad Hagen

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon.....	7
2	Metode	8
2.1	Forsøksoppsett	8
2.2	Protokoll.....	9
2.3	Fysiske og kjemiske parametere i vann	10
2.3.1	Prøvetaking og vannkjemiske analyser på forsøkslokaliteten	10
2.3.2	Vannkjemisk karakterisering i laboratoriet	10
2.1	Dosering av kloramin	10
2.2	Biologiske prøver og analyser	11
2.2.1	Fiskeatferd.....	11
2.2.2	Blodprøver og blodanalyser	11
2.2.3	Gjelleprøver til histopatologisk vurdering.....	12
2.2.4	Prøvetaking av slim fra fiskens hud	13
3	Resultater	15
3.1	Vannanalyser	15
3.1.1	Vanntemperatur.....	16
3.2	Biologiske undersøkelser	17
3.2.1	Kondisjonsfaktor.....	17
3.2.2	Fiskeatferd.....	17
3.2.3	Hematokrit.....	18
3.2.4	Plasmaelektrolytter	19
3.2.5	Histopatologiske vurderinger av gjeller.....	24
3.2.6	Slimanalyser – proteomikk	24
3.2.7	Slimanalyser – metabolomikk	26
4	Diskusjon	27
5	Konklusjon	31
6	Referanser.....	32

Sammendrag

Det er gjort flere eksperimentelle forsøk med formål å utvikle klor som behandling mot *G. salaris* i elver. Gjennom disse forsøkene er det funnet at svært lave konsentrasjoner av klor tilsatt som monokloramin kan fjerne *G. salaris* fra laksunger i løpet av få dager uten å ha synlige negative effekter på laksen. De positive resultatene fra foregående forsøk ligger til grunn for å fortsette arbeidet med å utvikle klor som behandlingsmiddel mot *G. salaris* i elver.

Klor kan være giftig for fisk, og flere arter innenfor laksefamilien (*Salmonidae*) er beskrevet som svært følsomme for klor. Det er imidlertid stor variasjon i oppgitte konsentrasjoner for akutt giftighet. Kronisk giftighet for klor er observert etter eksponering for residualt klor helt ned i 3 µg/l, men da over en eksponeringsperiode på 12 uker.

Under en eventuell fullskala behandling med klor mot *G. salaris* i et vassdrag kan det oppstå korte perioder med høyere klorkonsentrasjoner i vannet enn det som er nødvendig for å fjerne parasitten. Slike forhold kan forekomme lokalt- eller i større deler av vassdraget. Det var derfor et behov for å studere responser og effekter på laks ved eksponering for høyere konsentrasjoner av klor enn det som kan forventes under en behandling i et naturlig vassdrag. Hensikten med dette prosjektet har vært å undersøke om, og eventuelt hvordan, ettårige og toårige laksunger påvirkes av eksponering for klorkonsentrasjoner som er relevant for behandling mot parasitten. Det ble også undersøkt om fisken evner å restituere eventuelle subletale effekter fra kloreksponeeringen.

Eksponering for vann tilsatt 30 og 60 µg klor/l ga kun små blodfysiologiske forandringer hos fisken. Alle fysiologiske forandringene, med unntak av reduserte hematokritverdier hos gruppen med ettåringer, restituerte også raskt etter endt kloreksponeering. Kloreksponeeringen ga ingen patologiske forandringer i gjellene, og det ble ikke registrert vesentlige forskjeller i protein- og metabolittsammensetningen i slimlaget til klorekspont fisk sammenlignet med kontrollfisk. Det var liten forskjell i fysiologisk effekt på laksungene som ble eksponert for de to klordosene. Dette gir en viss grad av fleksibilitet innen doseringen av kloramin til et vassdrag, og lokale variasjoner i klorkonsentrasjon i vassdraget kan tolereres av fisken. Forsøket indikerer at laksunger kan eksponeres i inntil 17 dager for dobbelt så høy klordose som tidligere har vist seg å fjerne parasitten fra laks i løpet av 2-4 dager.

En slik fleksibilitet representerer en robusthet for eventuell bruk av kloramin som behandling kjemikalium mot *G. salaris*. Klorbehandling kan imidlertid gi fysiologiske forstyrrelser uten at dette kommer til uttrykk som tydelige atferdsavvik, noe som er viktig kunnskap for en eventuell bruk av kloramin i fullskala behandlingstiltak mot *G. salaris* i elver.

1 Introduksjon

Gyrodactylus salaris tilhører en dyregruppe med akvatiske parasitter som på norsk kalles haptormark. Parasitten lever kun i ferskvann og den infiserer primært laks (*Salmo salar*), hvor den finnes på kroppen og finnene. *G. salaris* ble introdusert til Norge på 70-tallet og parasitten er påvist i 50 norske elver (Hytterød mfl. 2018). Parasitten er ansett som en stor trussel mot norsk villaks og myndighetene har som mål å utrydde den fra alle områder hvor den er etablert (Anon 2014). Det brukes derfor store ressurser på bekjempelse av parasitten og per januar 2018 er 32 vassdrag friskmeldt, 11 vassdrag er ferdigbehandlet, men fortsatt ikke friskmeldt og syv vassdrag fordelt på to smitteregioner har kjent forekomst av *G. salaris* (Hytterød mfl. 2018). Nåværende smittestatus, i tillegg til faren for nye innførsler fra infiserte vassdrag i våre naboland, tilsier at vedlikehold og utvikling av metoder for bekjempelse fortsatt er viktig.

Laboratorieforsøk ved Veterinærinstituttet har vist at hypokloritt tilsatt i svært lave konsentrasjoner til vannet kan fjerne *G. salaris* fra laksunger i løpet av 2-6 dager uten å ha synlige negative effekter på fisken (Hagen mfl. 2014). Oppfølgende studier med klorforbindelser mot *G. salaris*, først i kar på elvebredden i Drammenselva (upublisert) og så i et feltforsøk i Lierelva (Hagen mfl. 2018) har bekreftet at klorforbindelser kan fjerne *G. salaris* fra laksunger i naturlig elvevann uten alvorlige effekter på fisken. I tillegg ble det under disse forsøkene konstatert at klor tilsatt som monokloramin øker varigheten av den toksiske effekten mot *G. salaris* sammenlignet med hvis klor tilsettes om natriumhypokloritt (Hagen mfl. 2018). Under forsøket i Lierelva ble også invertebratsamfunnet studert med hensyn på effekter fra klortilsetningen i vassdraget, uten at det ble påvist vesentlige negative effekter (Eriksen 2018).

Det er godt dokumentert at klor dreper patogener i vann (World Health Organization 2006) og klorforbindelser brukes for eksempel til å desinfisere drikkevann, til behandling av avløpsvann og som behandling mot bakterier og alger i forskjellige sammenhenger. Klor i ulike former er verdens mest brukte desinfeksjonsmiddel, og klor er også forsøkt som behandlingsmiddel i akvakultur (From 1980, Bullock mfl. 1991, Thorburn & Moccia 1993, Smith mfl. 1993). Sammen med resultatene fra forsøkene med *G. salaris* nevnt over, legger dette grunnlag for å utrede monokloramin som et potensielt kjemikalium til bekjempelse av *G. salaris* i norske lakseelver.

Klor kan være giftig for fisk, og flere arter innenfor laksefamilien (*Salmonidae*) er beskrevet som svært følsomme for klor (Singleton & Bio 1989). Det er imidlertid stor variasjon i oppgitte konsentrasjoner for akutt giftighet der 96-timers LC-50 verdier er fra 10 til 132 µg residualt¹ klor/l (Singleton & Bio 1989). Kronisk giftighet for klor er observert etter eksponering for residualt klor helt ned i 3 µg/l, men da over en eksponeringsperiode på 12 uker (Buckley 1976). Effektene fra de laveste klorkonsentrasjonene som er rapportert for laksefisk i litteraturen samsvarer i liten grad med det som er observert under kloresponering av laks infisert med *G. salaris*. Dette, sammen med et behov for å øke kunnskapen om ulike responser hos laks ved eksponering for behandlingsrelevante klorkonsentrasjoner, er bakgrunnen for forsøket som presenteres i denne rapporten. Under en eventuell fullskala behandling med klor i et vassdrag, der målet er å utrydde *G. salaris*, vil det kunne oppstå korte perioder med høyere klorkonsentrasjoner i vannet enn det som er nødvendig for å fjerne parasitten. Det kan heller ikke utelukkes lokale vannkjemiske forhold i vassdraget med høyere

¹ Med begrepet residualt klor menes klor som ikke har blitt inaktivert kort tid etter at det er tilsatt til vannet. Dette kan være fritt klor (klorgass, hypoklorsyre, hypokloritt) eller bundet klor (kloraminer) som reagerer langsommere enn fritt klor, og derfor holder seg aktiv lenger. Summen av fritt og bundet klor kalles aktiv klor eller total aktiv klor fordi det har desinfiserende effekt.

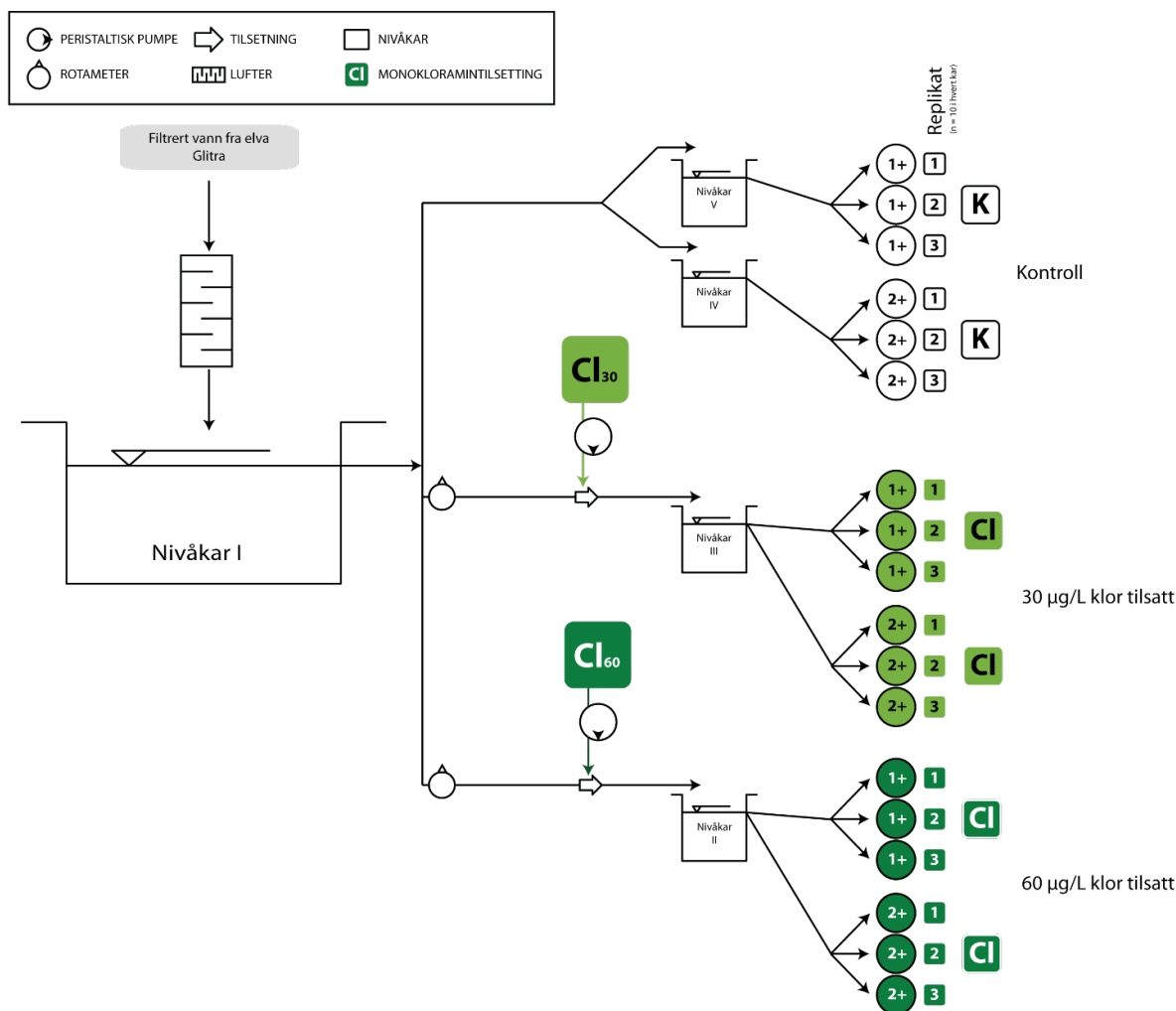
klorkonsentrasjoner enn de som tidligere er testet på laks. Det var derfor et behov for å studere responser og effekter på laks ved eksponering for høyere konsentrasjoner av klor enn det som kan forventes under en behandling i et naturlig vassdrag. I dette prosjektet ble derfor fysiologiske effekter i blod, fysiske effekter i form av skader på gjellene, biokjemiske endringer i slimlaget og atferdsendringer studert. Studien har også undersøkt om fisken evner å restituere eventuelle subletale effekter fra kloreksporingen.

2 Metode

2.1 Forsøksoppsett

Forsøket ble gjennomført som et eksponeringsforsøk der to aldersgrupper av laks, ettåringer (1+) og toåringer (2+), ble eksponert for to ulike konsentrasjoner av kloramin.

Forsøksoppsettet ble konstruert som et åpent system med kontinuerlig vanngjennomstrømning. Vann fra Glitra ($T = 12,7 \text{ °C} \pm 1,3 \text{ °C}$) ble ledet inn i et glassfiberkar ($V=230 \text{ l}$) med overløp som sikret stabil vanngjennomstrømning i forsøksperioden. Fra overløpskaret ble vann ledet til to blandkar ($V=90 \text{ l}$) der kloramin ble tilsatt med peristaltiske pumper (Watson-Marlow 323S med et 304MC femkanals kassettpumpehode). Oppholdstiden på vannet i blandkarene var ca. 3,5 minutter. Fra blandkarene ble kloramintilsatt vann ledet til forsøkskarene ($V=45 \text{ l}$ for 1+ og $V=90 \text{ l}$ for 2+) med laksunger. Vanngjennomstrømningen i forsøkskarene var 2,4-2,6 l/min (1+) og 4,8-5,2 l/min (2+). En skjematisk tegning av forsøksoppsettet er vist i Figur 1.



Figur 1. Forsøksoppsett

2.2 Protokoll

243 laks med alder 1+ og 243 laks med alder 2+ (gjennomsnittsvikt henholdsvis 9 og 65 g) ble fordelt likt på 18 forsøkskar med gjennomstrømmende vann (vanntemperatur = $13,9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) og akklimatisert i seks dager før kloreksponering. Fisken ble ikke føret i forsøksperioden. Fisken i de to aldersklassene ble eksponert for enten $30\text{ }\mu\text{g klor/l}$ eller $60\text{ }\mu\text{g klor/l}$ tilsatt som kloramin i 17 dager, i grupper á tre replikater per klorkonsentrasjon. Fisk i tre replikater ble holdt i vann uten kloramintilsetning og fungerte som kontroll. På dag 12 i eksponeringsperioden ble det målt lave klorverdier i alle eksponeringsgrupper, og det ble vurdert at klorkonsentrasjonen samlet sett hadde vært lavere enn ønsket i første del av forsøket. Klorkonsentrasjonen ble derfor oppjustert for alle gruppene etter dag 12. Fisken ble prøvetatt like før kloreksponeringen startet, og etter 3, 7, og 17 dagers kloreksponering. Like etter siste prøveuttak (tid 17 dager), ble kloramintilsetningen stanset og fisken ble holdt i vann uten kloramintilsetning i 21 dager (restitueringsperiode). Det ble tatt prøver av fisken 3, 10, og 21 dager ut i restitusjonsperioden (tilsvarer dag 20, 27 og 38 i forsøket). Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut tre eller fire fisk fra hvert replikat slik at $n = 10$ fra hver eksponeringsgruppe. Fisken ble avlivet med et slag mot hodet før lengde og vekt ble notert. Deretter ble det tatt slimprøve, blodprøve og gjelleprøve fra hver fisk. Fisken ble observert flere ganger daglig, og ulike atferdskarakteristika ble registrert i henhold til et scoreskjema. Prøvetakingsmetodikk, analyser og scoring av atferd er beskrevet under.

2.3 Fysiske og kjemiske parametere i vann

2.3.1 Prøvetaking og vannkjemiske analyser på forsøkslokaliteten

Turbiditet, ledningsevne og temperatur ble målt i Nivåkar I med en håndholdt sonde (YSI 650 MDS). Disse målingene ble gjort daglig i eksponeringsperioden, og fem ganger i løpet av restitusjonsperioden. Temperatur ble også målt kontinuerlig med temperaturloggere i ett av karene i hver forsøksgruppe. pH ble målt med et WTW 340i 18 ganger i forsøksperioden. Vannprøver for kloranalyser ble tatt minst én gang per dag fra innløpsvannet til fiskekarene og analysert så raskt som mulig i feltlaboratoriet som var etablert i tilknytning til forsøkslokaliteten. Prøvene ble filtrert gjennom et membranfilter med porestørrelse 0,45 µm. Filtratet (25 ml) ble tilsatt 0,15 ml fosfatbuffer (30 g dinatriumhydrogenfosfat, 46 g kaliumdihydrogenfosfat og 0,8 g EDTA i 1 l MilliQ) og deretter 0,15 ml av en fargereagens bestående av N,N-dietyl-p-fenylendiaminsulfat (DPD) (1,5 g DPD, 2 ml konsentrert svovelsyre og 0,2 g EDTA i 1 l MilliQ). Prøvene ble ristet godt og tilsatt 2-3 «fyrstikkhoder» med kaliumjodid i fast form og deretter ristet på ny. Prøvene stod deretter mørkt i én time før absorbans av lys med bølgelengde 510 nm ble målt med et Shimadzu UV1240 mini-spektrofotometer i kyvetter med 5 cm lysvei. Målt absorbans i referansevann (vann uten klortilsetning) ble trukket fra og differansen ble brukt til å beregne klorkonsentrasjonen (aktiv klor) basert på en standardkurve. Standardene ble laget ferske ved å fortynne en konsentrert klorklørning med kjent konsentrasjon.

2.3.2 Vannkjemisk karakterisering i laboratoriet

Det ble tatt prøver for bestemmelse av totalt organisk karbon (TOC) og kjemisk (permanganat) oksygenforbruk fem ganger i løpet av doseringsperioden og én gang i løpet av restitusjonsperioden, i tillegg til jern, mangan og kalsium.

2.1 Dosering av kloramin

To bruksløsninger med monokloramin, henholdsvis 200mg/l og 400mg/l ble laget på hver sin 10-liters kanne. Bruksløsning med 200mg/l monokloramin ble laget ved å fylle ni liter revers osmose (RO)-vann i 10-literskannen før 2,6 gram ammoniumklorid i fast form ble tilsatt. Innholdet ble ristet godt slik at ammoniumkloriden løste seg i vannet. Deretter ble 11,9 ml av en konsentrert hypoklorittløsning på 14% tynnet ut i én liter RO vann. Løsningen med fortynnet klor ble umiddelbart helt over i dunken med ni liter fortynnet ammoniumklorid etterfulgt av risting, slik at alt ble blandet godt. Doseringskonsentrasjonen på 400mg/l ble laget på tilsvarende måte, men med dobbel mengde ammoniumklorid (5,2 gram) og hypokloritt (23,8 ml). Nye doseringsløsninger ble laget ca. annenhver dag de første 12 dagene av forsøksperioden, og hver dag de siste fem dagene. De siste fem dagene ble også den klorkonsentrasjonen i doseringsløsningene som var i bruk målt daglig og sammenlignet med målt konsentrasjon i fersk tillaget doseringsløsning.

Doseringen av kloramin ble startet på ettermiddagen den 25.05.2018 og gikk kontinuerlig frem til 11.06.2018. Fisken ble dermed eksponert for klorholdig vann i 17 døgn før restitusjonsperioden begynte. Klorkonsentrasjonen i doseringsløsningen ble redusert noe raskere enn antatt som følge av autonekbrytning av klor (se Hagen mfl. 2019), og forsøksgruppene fikk derfor tilsatt henholdsvis 23 µg/l og 40 µg/l for Cl 30 og Cl 60 gruppa de første 12 dagene. Det ble besluttet å justere opp dosen for begge eksponeringsgruppene de resterende fem dagene av forsøksperioden. Fra og med den 05.06.2018 til og med 10.06.2018 fikk gruppene tilsatt de nominelt tiltenkte dosene (30/60 µg klor per liter).

2.2 Biologiske prøver og analyser

2.2.1 Fiskeatferd

Daglig gjennom hele doseringsperioden og ved prøveuttak i restitusjonsperioden ble fiskens atferd undersøkt visuelt. Lokket på fiskekarene ble løftet opp, og det ble lyst ned i karet med en lykt for å kunne se fisken og vurdere atferd ut fra en scoreskala (Tabell 1). Fisken i hvert kar ble vurdert i 30-60 sekunder før scoren ble notert i et scoreskjema.

Tabell 1. Scoreskala for vurdering av fiskens atferd.

Score	Beskrivelse
0	Ingen avvikende atferd (sammenliknet med kontroll)
1	Svakt redusert fluktrespons
2	Moderat redusert fluktrespons
3	Kraftig redusert fluktrespons

2.2.2 Blodprøver og blodanalyser

Fisken ble avlivet med et slag mot hodet. Blodprøven ble tatt fra dorsalvenen ved hjelp av hepariniserte 1 ml engangssprøyter (Figur 3). Laksungene med alder 1+ var små i størrelse og det var krevende å ta blodprøver av denne fisken. Det ble tatt fra 0,1 ml til 0,5 ml blod fra fisk i denne aldersgruppen. Fra enkelte fisk var det kun nok blod til hematokritundersøkelse, og i noen få tilfeller lot det seg ikke gjøre å få nok blod til noen av undersøkelsene. Fra laksungene med alder 2+ ble det tatt ca. 0,6 ml blod fra hver fisk. Litt av blodet ble overført fra sprøyten til to kapillærrør for hematokritanalyse. Hematokrit ble målt som prosent pakket cellevolum (PCV) med hematokritskive. Resterende blod ble overført til eppendorfrør for separering av røde blodceller og plasma ved hjelp av en sentrifuge (LW Scientific ZipCombo, ZCC-12HD-40T3) ved 1200 rpm i tre minutter. Plasma ble fryst ved -80 °C og senere analysert for kloridioner (Cl⁻), natriumioner (Na⁺) og pH (Convergys® ISE comfort Electrolyte Analyzer). Blodprøveresultater fra dag 3, 7, 17, 20, 27 og 38 i forsøket er presentert i denne rapporten.



Figur 2. Blodprøven ble tatt fra dorsalvenen ved hjelp av hepariniserte 1 ml engangssprøyter. Foto: Anders Gjørwad Hagen/NIVA

2.2.3 Gjelleprøver til histopatologisk vurdering

Den andre gjellebuen på fiskens venstre side ble klippet ut og fiksert på bufret formalin (Figur 4). Histopatologiske vurderinger ble gjort på HE-fargede gjellelevssnitt, fremstilt etter standard prosedyre. Eventuelle gjelleskader ble notert. Gjellelevssnitt fra følgende forsøksgrupper og tidspunkter ble vurdert histopatologisk (Tabell 2).



Figur 3. Dissekering av venstre gjellebue nr 2 for histologiske undersøkelser. Foto: Anders Gjørwad Hagen/NIVA

Tabell 2. Utvalgte gjellelevssnitt som ble vurdert for histopatologiske forandringer.

Aldersgruppe	Forsøksgruppe	Prøvetidspunkt	Antall (n)
1+	Kontroll	Før eksponering	10
1+	Kontroll	17 dager eksponering	10
1+	Kloramin 30 µg/l	17 dager eksponering	10
1+	Kloramin 60 µg/l	17 dager eksponering	10
2+	Kontroll	Før eksponering	10
2+	Kontroll	17 dager eksponering	10
2+	Kloramin 30 µg/l	17 dager eksponering	10
2+	Kloramin 60 µg/l	17 dager eksponering	10

2.2.4 Prøvetaking av slim fra fiskens hud

Det ble tatt slimprøver fra fiskens hud like etter at fisken var avlivet. Prøven ble tatt ved å legge et sterilt medisinsk filterpapir (2,5 x 7 cm) (Kimberly-Clark, Irving, TX, USA) på fiskens venstre side fra bak gjellelokket til ca. bak ryggfinnen for fisk med alder 2+. For 1+ var størrelsen på filterpapiret 1,25 x 7 cm og dekket området fra rett bak gjellelokket til like foran sporden (Figur 4). Papiret ble rullet sammen med en pinsett etter at det hadde ligget på fiskehuden i ca. 10 sekunder. Papiret ble overført til den øverste delen av et Spin-X® polypropylene sentrifugerør (0,22 µm, Costar, Corning, NY, USA) og lagret på is.

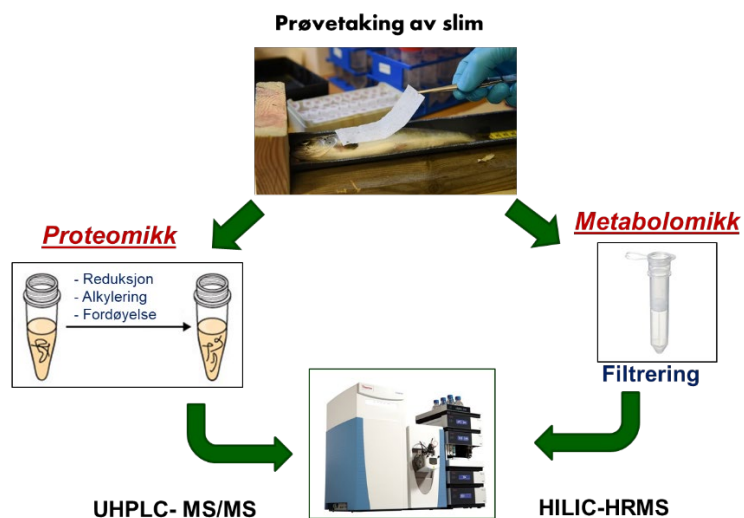
Senere samme dag ble slimvæsken ekstrahert fra de medisinske papirene ved sentrifugering (500 × g i 10 minutter ved 4 °C). Slimvæsken ble samlet i den nedre delen av sentrifugerørene og lagret ved -80 °C inntil videre analyse av protein- og metabolittsammensetning.



Figur 4. Prøvetaking av fiskeslim med filterpapir. Foto: Anders Gjørwad Hagen/NIVA

Analysemetodene for bestemmelse av protein- og metabolittkomponenter i fiskeslimet er kostbare metoder, og et begrenset utvalg av prøvematerialet inngikk i selve analysene. Prøver fra uttakene den 25. mai (like før kloreksponering), 11. juni (17 dager kloreksponering) og 29. juni (21 dager

restituering) ble valgt ut til disse analysene. Til sammen 34 fisk av alder 2+ ble inkludert i proteomikkanalysen og 140 fisk, både 1+ og 2+ ble undersøkt for metabolitter. Se Figur 5 for en forenklet skjematisk beskrivelse av stegene i prøvetakingen.



Figur 5. Forenklet skjematisk figur som viser stegene i prøvetakingen, bearbeiding og analyseringen av fiskeslim for påvisning av ulike metabolitter og proteiner.

2.2.4.1 Slimanalyser – proteomikk

Den totale mengden proteiner i slimvæskeprøvene ble bestemt ved å bruke Lowry assay (DC Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Prøvene ble målt etter fortyning med fosfatbufret saltvann (PBS) (pH 7.4) i forholdet 1:2, og gjennomsnittlig proteinmengde ble beregnet ut fra alle verdier som passet inn i en kalibreringskurve som strakk seg fra 0,1 - 1 mg/ml bovint serum albumin (BSA) i PBS.

Proteiner ble redusert, alkylert og fordøyd med enzym direkte i løsningen. Etter prepareringen ble prøvene analysert ved hjelp av ultra høyoppløselig væskechromatografi-massespektrometri (UHPLC-MS/MS) (Dionex Ultimate 3000 UHPLC), se Fæste mfl. (2016) for nærmere beskrivelse av metodikken for untargeted proteomikk.

Analysedataene ble behandlet videre med programmet "Proteome Discoverer 1.0" (Thermo Fisher Scientific). Detekterte proteiner ble sammenlignet med en proteindatabase (UNIPROT-database) som inneholder 9987 kjente proteiner fra atlantisk laks (*Salmo salar*). Visualiseringen av proteindata ble gjort ved hjelp av programmet PEAKS Studio Viewer versjon 5.3 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Canada).

2.2.4.2 Slimanalyser - metabolomikk

Prøvene ble analysert med en såkalt ikke-spesifikk metode basert på normalfase-kromatografi koplet til høyoppløsende massespektrometri (HILIC-HRMS). Metoden sikter på å detektere så mange metabolitter som mulig, men identiteten til hver komponent blir ikke undersøkt og beskrevet. Prøvene ble tint i romtemperatur før de ble overført til et prøveglass for kromatografi. En kvalitetskontrollprøve (QC) ble laget ved å slå sammen volumer på 5 µl prøvemateriale fra 33 utvalgte prøver med tilstrekkelig stor slimmengde (> 20 µl). Alle forsøksgrupper var representert innenfor disse 33 prøvene, se Ivanova mfl. (2018) for detaljert beskrivelse av metodikk.

3 Resultater

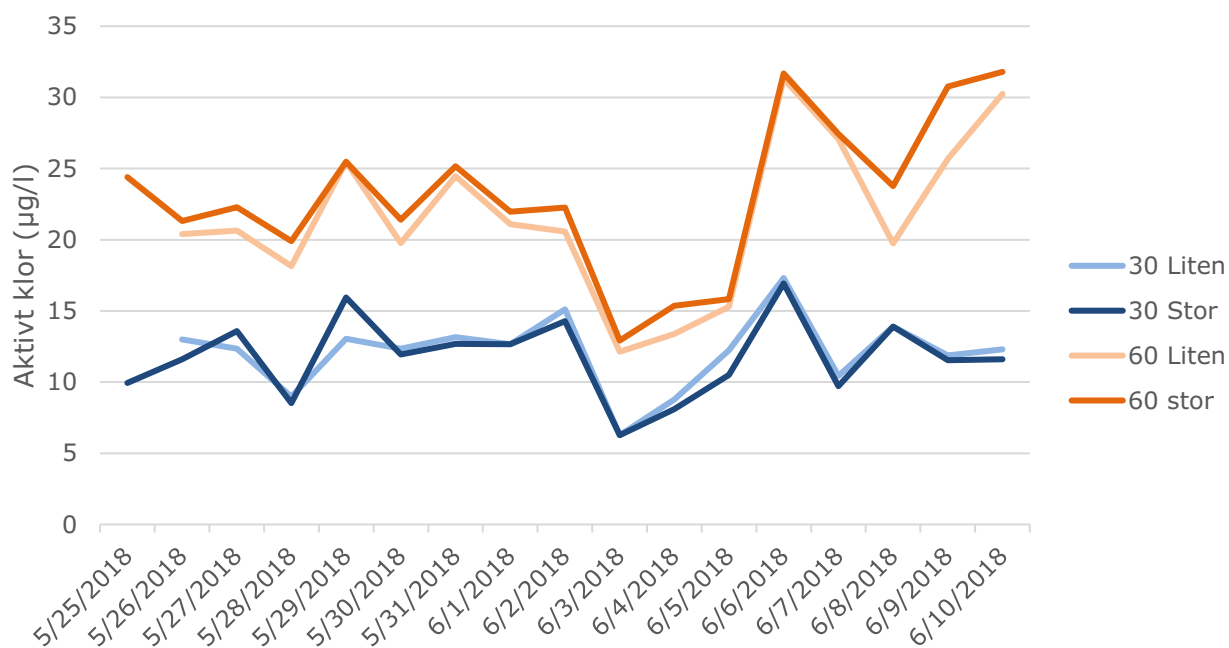
3.1 Vannanalyser

Råvannet fra Glitra var moderat kalkrikt ($11,8 \pm 2,2$ mg Ca/l), klart ($0,82 \pm 0,05$ NTU), og med pH på 7,8 (min: 7,61, maks: 7,90) (Tabell 3). Vannkjemien i råvannet var stabil gjennom hele forsøksperioden. For fullstendig oversikt over målte verdier i råvannet i forsøksperioden, se Vedlegg A.

Tabell 3. Vannkjemi under forsøksperioden. Analyse av jern, kalsium, mangan, TOC og KOF ble gjort av Eurofins. Konduktivitet, pH, temperatur og turbiditet er målt på forsøkslokaliteten. Gjennomsnittsverdien for pH er beregnet for konsentrasjonen av H^+ og tilbakeregnet til pH.

Parameter	Gjennomsnitt (SD)	Antall prøver	Benevning
Turbiditet	0,82 (0,05)	23	NTU
Konduktivitet	0,07 (0,01)	23	mS/cm
Temperatur	12,70 (1,30)	23	(°C)
pH	7,81	18	$-\log_{10}[H^+]$
Jern (Fe)	70,9 (60,9)	6	$\mu\text{g/l}$
Mangan (Mn)	19,9 (22,2)	6	$\mu\text{g/l}$
Kalsium (Ca)	11,8 (2,2)	6	mg/l
Total organisk karbon (TOC)	2,9 (0,3)	6	mg/l
Kjemisk oksygenforbruk (KOF Mn)	2,7 (0,4)	6	mg O_2/l

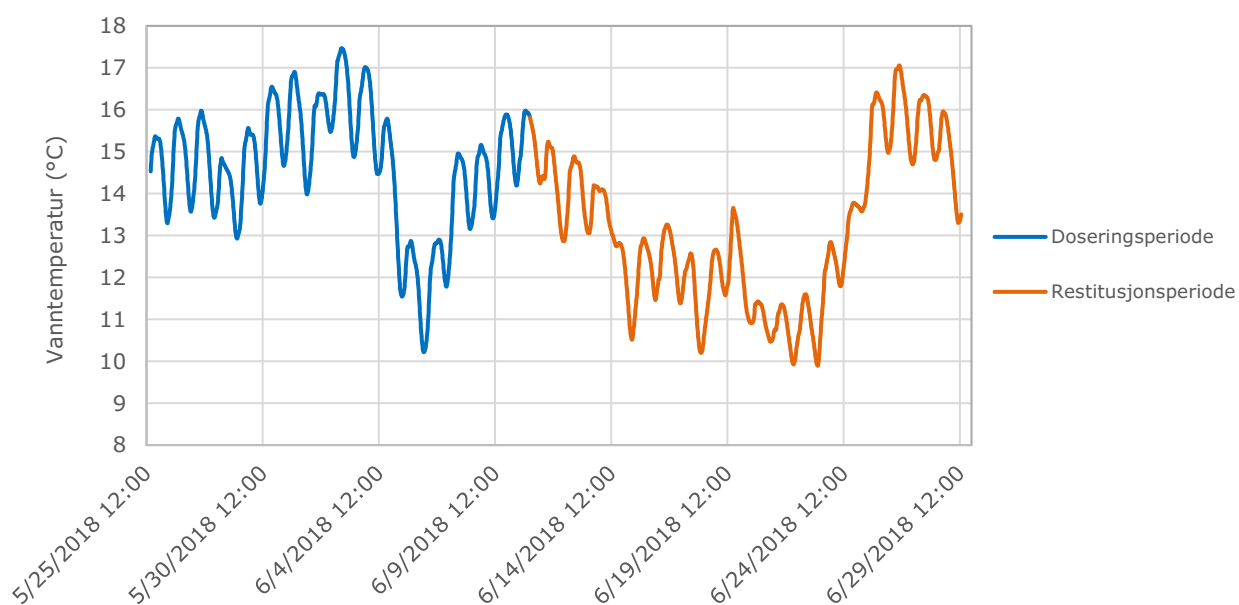
Som vist i Figur 6 var målt konsentrasjon av aktivt klor relativt stabile i perioden fra 25. mai til 2. juni. Deretter fulgte to dager (03.06 og 04.06) da det ble registrert lavere nivåer før konsentrasjonene økte mot slutten som følge av økt dosering. Gjennomsnittskonsentrasjon av aktivt klor for Cl 30-gruppen var $11,5 \pm 2,8$ $\mu\text{g/l}$, mens Cl 60-gruppen hadde en gjennomsnittlig målt konsentrasjon på $22,1 \pm 6,3$ $\mu\text{g/l}$ gjennom doseringsperioden.



Figur 6. Gjennomsnittlig målt aktivt klor av triplikate prøver fra hver gruppe, hver dag gjennom doseringsperioden.

3.1.1 Vanntemperatur

Det var ingen avvik i målt temperatur mellom de seks temperaturloggerne som var plassert i ett av replikatene i hver gruppe. Resultatene fra temperaturloggerne fremstår derfor som én kurve. Temperaturen i forsøkskarene var $13,9\text{ °C} \pm 1,8\text{ °C}$. Endringene i temperaturer er relatert til de naturlige svingningene i elva Glitra, der vannet tas fra.



Figur 7. Temperaturdata fra temperaturloggerne i eksponeringsperioden (blå) og restitusjonsperioden (oransje)

3.2 Biologiske undersøkelser

3.2.1 Kondisjonsfaktor

Kondisjonsfaktoren (K-faktor) avtok signifikant både for kontrollgrupper og eksponeringsgrupper for 1+ og 2+ fisk gjennom forsøksperioden (lineær regresjon; koeffisient fra -0,0018 til -0,0035; $p < 0,005$; statistikk kjørt i SigmaPlot for Windows). Variasjonen var noe større i datamaterialet for 1+ enn for 2+ med R^2 -verdier henholdsvis fra 0,11 til 0,21 for 1+ og 0,25 til 0,39 for 2+. Denne forskjellen i variasjon kan skyldes for lav oppløsning (få desimaler) på vekta som ble brukt.

Kondisjonsfaktoren (k-faktor) avtok signifikant både for kontrollgrupper og eksponeringsgrupper for 1+ og 2+ fisk gjennom forsøksperioden (lineær regresjon; koeffisient fra -0,0018 til -0,0035; alle grupper med $p < 0,05$; statistikk kjørt i SigmaPlot for Windows). Variasjonen var noe større i datamaterialet for 1+ enn for 2+ med R^2 -verdier henholdsvis fra 0,11 til 0,21 for 1+ og 0,25 til 0,39 for 2+. Denne forskjellen i variasjon kan sannsynligvis tilskrives unøyaktighet i vekta som ble brukt. Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor for gruppene per uttak er vist i Tabell 4 og resultater fra lineær regresjonsanalyse er gitt i Tabell 5.

Tabell 4. Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor med standardavvik ved prøveuttak (dato) for alle forsøksgrupper gjennom forsøket.

Dato	Kontroll 1+	SD	CL30 1+	SD	CL 60 1+	SD	Kontroll 2+	SD	CL30 2+	SD	CL60 2+	SD
25.05.2018	0,86	0,08	0,92	0,08	0,88	0,07	0,88	0,03	0,86	0,05	0,86	0,04
28.05.2018	0,89	0,07	0,98	0,09	0,90	0,13	0,88	0,06	0,86	0,04	0,84	0,05
01.06.2018	0,91	0,06	0,85	0,08	0,87	0,08	0,87	0,03	0,84	0,07	0,84	0,04
11.06.2018	0,79	0,06	0,80	0,08	0,78	0,07	0,84	0,04	0,79	0,04	0,79	0,03
14.06.2018	0,90	0,10	0,81	0,07	0,78	0,06	0,83	0,04	0,79	0,03	0,79	0,04
18.06.2018	0,83	0,14	0,79	0,07	0,79	0,06	0,82	0,04	0,80	0,03	0,81	0,03
29.06.2018	0,78	0,10	0,84	0,06	0,80	0,12	0,78	0,04	0,76	0,03	0,78	0,04

Tabell 5. Resultater fra lineær regresjon for k-verdi mot prøveuttak (dato) for alle forsøksgrupper gjennom forsøket. Krysningpunkt (intercept), stigningsskoeffisient, r^2 og p-verdi er oppgitt. Statistikk kjørt i SigmaPlot for Windows.

Gruppe	Intercept	Slope	r^2	p
Kontroll 1+	0,890	-0,0025	0,11	< 0,05
CL30 1+	0,910	-0,0035	0,21	< 0,05
CL60 1+	0,877	-0,0031	0,17	< 0,05
Kontroll 2+	0,884	-0,0026	0,39	< 0,05
CL60 2+	0,855	-0,0025	0,36	< 0,05
CL60 2+	0,844	-0,0018	0,25	< 0,05

3.2.2 Fiskeatferd

Det var ingen endringer i atferd i kontrollgruppene (1+ og 2+) gjennom forsøksperioden og scoreverdier for atferd i begge kontrollgruppene ble derfor satt til 0 gjennom hele forsøket (Tabell 6). Scoreverdier for atferd varierte mellom 0 og 1 i alle de kloreksponerte gruppene med unntak av én scoreverdi som ble vurdert til 2, i gruppen 1+ eksponert for 30 μg klor/l den 14. juni. Det var ingen systematisk økning i score gjennom eksponeringsperioden. Det var flest observasjoner av atferdsavvik i gruppen av ettåringer eksponert for vann tilsatt 60 μg klor/l, sammenliknet med de

andre eksponerte gruppene. Det ble gjennomgående observert flere atferdsavvik for de eksponerte gruppene av 1+, sammenliknet med 2+. Det var ingen observert forskjell i atferd mellom de to eksponeringene CI 30 og CI 60 for gruppene av 2+.

Tabell 6. Oppsummerte data fra scoreskjema for atferd gjennom forsøket.

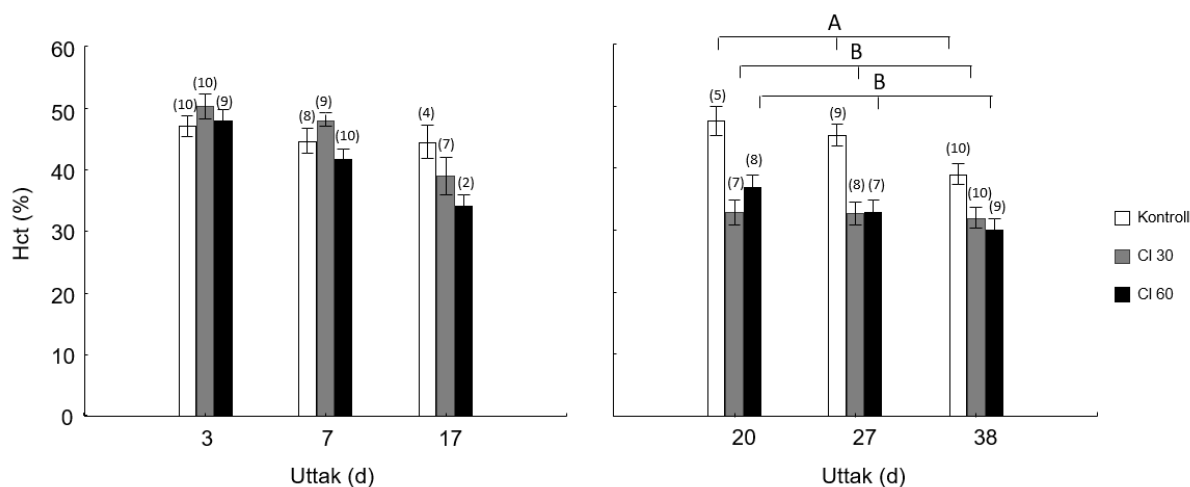
Gruppe	Antall atferdsavvik	Min – maks	Gjennomsnitt
CI 30 1+	19	0-2	1,05
CI 30 2+	14	0-1	1,00
CI 60 1+	35	0-1	1,00
CI 60 2+	12	0-1	1,00
Kontroll (1+ og 2+)	0	0	0

3.2.3 Hematokrit

Effektene av eksponeringene på hematokrit under eksponerings- og restitusjonsperiodene ble undersøkt med Two-ways ANOVAs med eksponerings-/kontrollgrupper og uttaksdag som uavhengige variabler for gruppene med 1+ og 2+. Signifikans mellom gruppene ble undersøkt med LSD post hoc tester. En oversikt over verdiene som ble målt i forsøket kan sees i Tabell 7.

Generelt gikk hematokritverdiene ned i alle gruppene under eksponeringen av ettåringene (ANOVA; $p < 0,05$). Det var også en trend for effekt av kloreksponering på hematokritverdiene (ANOVA; $p = 0,06$). Årsaken til at denne effekten ikke var signifikant kan være få analyserbare prøver i det siste uttaket i gruppen som ble eksponert for den høyeste konsentrasjonen av kloramin. Tallene må derfor tolkes med forsiktighet for gruppen med 1+. Det var ikke noen signifikant interaksjonseffekt mellom uttaksdag og eksponeringsgruppe ($P = 0,13$), Figur 8.

Under restitusjonsperioden var det en synkende trend i hematokritverdier for fisken i gruppene av 1+ (ANOVA; $p < 0,01$). Det var også en signifikant effekt av eksponeringsgruppe på hematokrit (ANOVA; $P < 0,01$). Dette skyldes at de kloreksponerte fiskene hadde signifikant lavere hematokritverdier sammenliknet med kontrollgruppen (post-hoc; $P < 0,05$), men det var ikke forskjell mellom CI 30- og CI 60-gruppene ($P > 0,05$). Det var heller ikke noen signifikant interaksjonseffekt mellom uttaksdag og eksponeringsgruppe ($P = 0,22$).

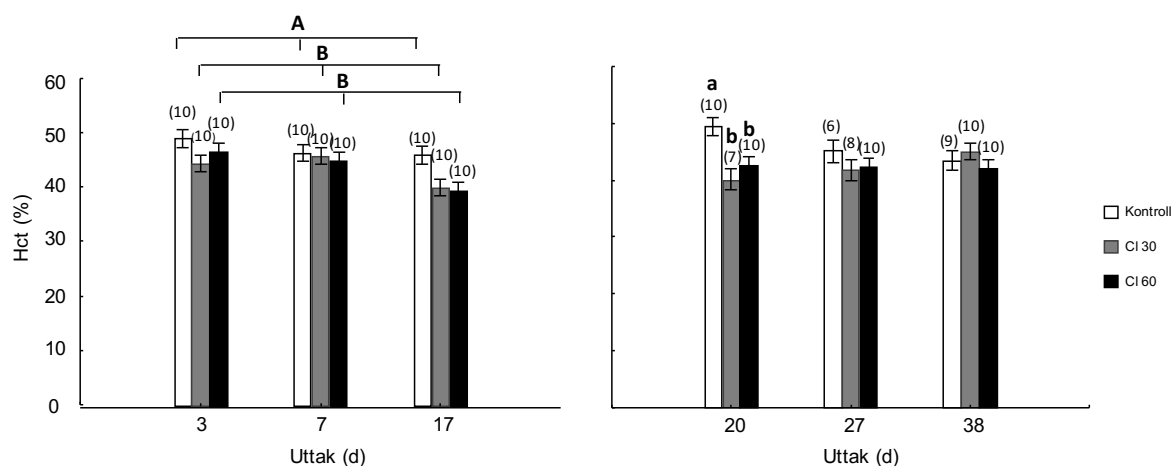


Figur 8. Hematokritverdier i gruppene med 1+ under eksponering (venstre) og i restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk som ble prøvetatt i hver gruppe ved det

aktuelle tidspunktet. Klammene med store bokstaver A og B viser signifikante forskjeller mellom eksponeringsgrupper, uavhengig av uttaksdag.

Hematokritverdiene for toåringene ble redusert i eksponeringsperioden (ANOVA; $p < 0.01$). Hematokritverdiene for fisken i de kloreksponte gruppene var signifikant lavere sammenliknet med kontrollgruppen i eksponeringsperioden (ANOVA; $p < 0,05$), men det var ikke noen signifikant interaksjonseffekt mellom eksponeringsgruppene og uttaksdag i denne perioden (ANOVA; $p = 0,28$).

I restitusjonsperioden var det en signifikant interaksjonseffekt mellom uttaksdag og eksponeringsgruppe (ANOVA; $P < 0.05$). Hematokritverdiene for de kloreksponte fiskene ved første uttaksdag i restitusjonsperioden var signifikant lavere sammenliknet med kontrollgruppen (post-hoc; $p < 0,05$), men det var ikke signifikant forskjell mellom CI 30- og CI 60-gruppene ($p > 0,05$). Det var ingen signifikant forskjell mellom kontrollgruppen og de kloreksponte gruppene senere i restitusjonsperioden ($p > 0,05$).

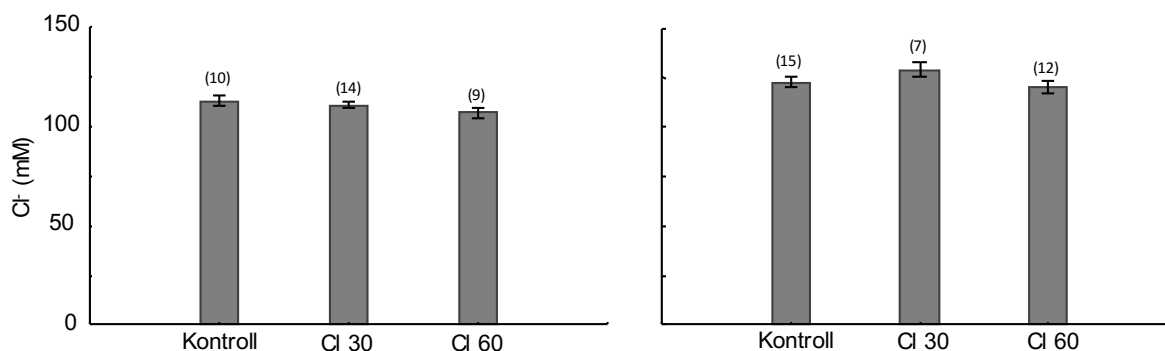


Figur 9. Hematokritverdier i gruppene med 2+ under eksponering (venstre) og i restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk i gruppen. Klammene med store bokstaver A og B viser signifikante forskjeller mellom eksponeringsgrupper, uavhengig av uttaksdag. Små bokstaver a og b viser signifikante forskjeller innen samme uttaksdag.

3.2.4 Plasmaelektrolytter

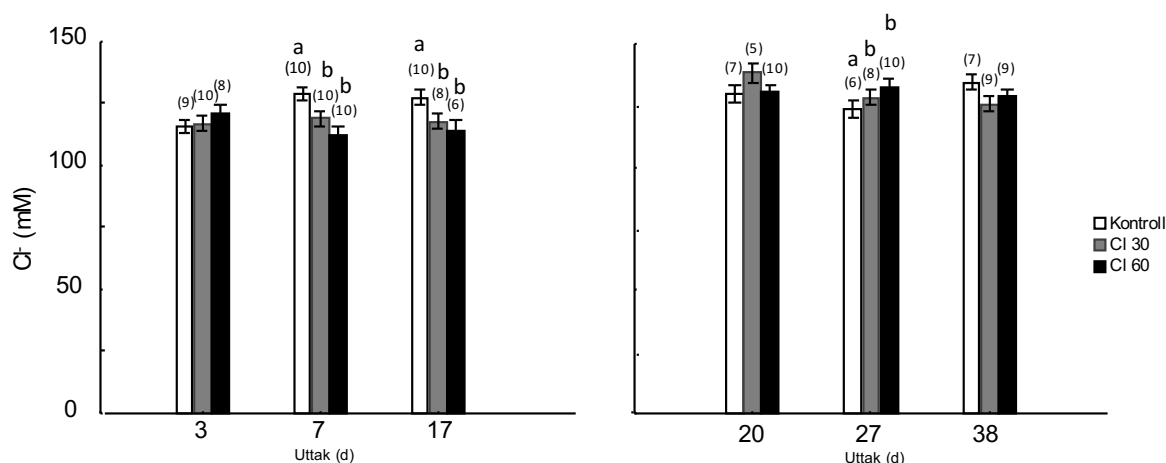
For å få nok data til å gjøre statistiske analyser på ettåringene ble uttaksdagene for de ulike eksponeringsgruppene slått sammen. Eksponeringsperioden og restitusjonsperioden ble vurdert uavhengig av hverandre. Forskjellene mellom eksponeringsgruppene ble undersøkt med One-Way ANOVAs. I gruppene av toåringene ble behandlingenes effekt på plasmaelektrolyttene under eksponerings- og restitusjonsperioden undersøkt med Two-ways ANOVAs. Eksponeringsgruppe og uttaksdag ble vurdert som uavhengige variabler. En oversikt over verdiene som ble målt i forsøket kan sees i Tabell 7.

Etter eksponeringsperioden gikk plasmakloridkonsentrasjonene opp i alle grupper. Det var ingen signifikante forskjeller i plasmaklorid hos 1+ mellom de eksponerte gruppene og kontrollgruppen, hverken i eksponeringsperioden ($p = 0,23$) eller i restitusjonsperioden ($p = 0,19$) (Figur 10).



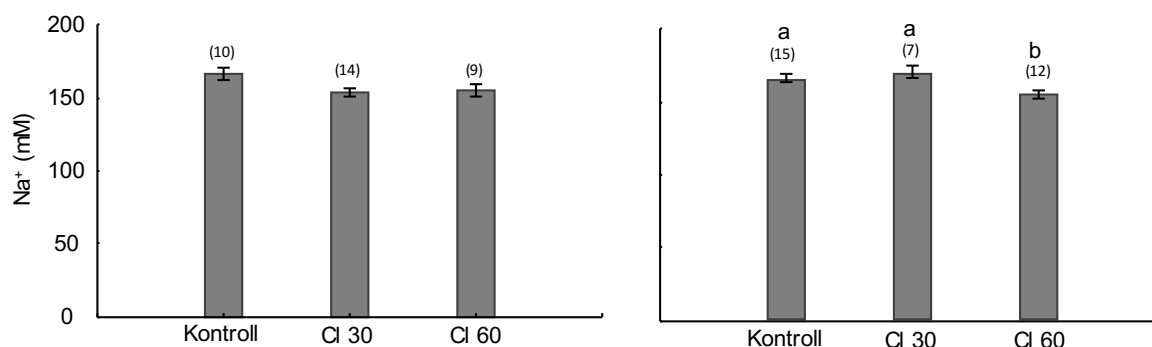
Figur 10. Plasmakloridverdier i gruppene med 1+ under eksponerings- (venstre) og restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene over stolpene viser antall fisk i gruppen.

For gruppene av toåringer var det en signifikant interaksjonseffekt mellom eksponeringsgruppe og uttaksdag (ANOVA; $p < 0.01$). Ved dag 7 og 17 var det signifikant lavere plasmakloridkonsentrasjoner hos de eksponerte fiskene sammenliknet med kontrollgruppen (post-hoc; $p < 0,05$; Figur 11). Etter eksponering gikk plasmakloridkonsentrasjonene raskt opp for de kloreksponte gruppene, og det var ingen signifikant *reduert* plasmakloridkonsentrasjon i de kloreksponte gruppene sammenliknet med kontrollgruppen i restitusjonsperioden.



Figur 11. Plasmakloridverdier i gruppene med 2+ under eksponerings- (venstre) og restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk i gruppen. Små bokstaver a og b viser signifikante forskjeller innen samme uttaksdag.

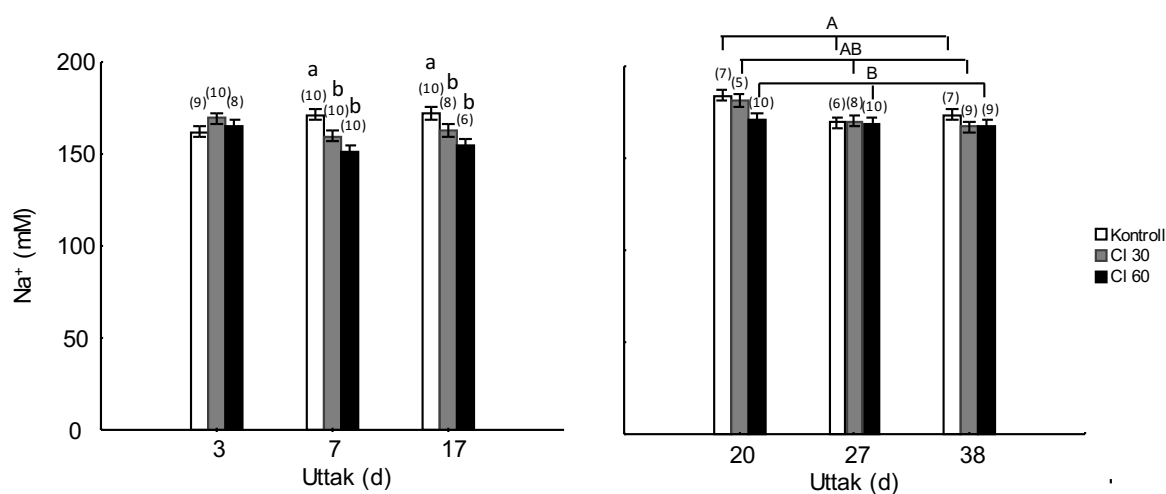
Det var en trend for lavere plasmanatriumkonsentrasjon i de kloreksponte gruppene av ettåringer sammenliknet med kontrollgruppen under eksponeringen (One-way ANOVA; $p = 0,06$). I restitusjonsperioden var det signifikant lavere natriumverdier for Cl 60-gruppen sammenliknet med Cl 30- og kontrollgruppe (post-hoc; $p < 0,05$), Figur 12.



Figur 12. Plasmanatriumverdier i gruppene med 1+ under eksponerings (venstre) og restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk i gruppen. Små bokstaver a og b viser signifikante forskjeller mellom eksponeringsgruppene.

Det var en signifikant interaksjonseffekt mellom eksponeringsgruppe og uttaksdag under eksponeringen (ANOVA; $p < 0.01$) for gruppene av toåringer. Ved dag 7 og 17 var det signifikant lavere plasmanatriumkonsentrasjoner hos de kloreksonerte gruppene sammenliknet med kontrollgruppen (post-hoc; $p < 0,05$; Figur 13).

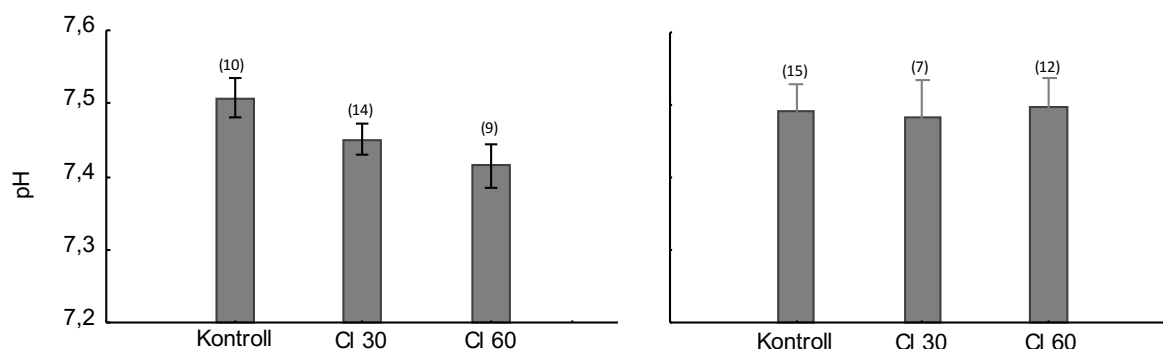
Det var en generell reduksjon av plasmanatriumverdiene for toåringene i restitusjonsperioden (ANOVA; $p < 0,01$). I denne perioden var også natriumverdiene signifikant lavere hos Cl 60-gruppen sammenliknet med kontrollgruppen (post-hoc; $p < 0,05$), men Cl 30-gruppen skilte seg ikke signifikant verken fra kontrollgruppen eller fra Cl 60-gruppen ($p > 0,05$). Forskjellene i plasmanatrium mellom de eksponerte gruppene og kontrollgruppene ved dag 27 og dag 38 var små men signifikante. Forskjellene vurderes imidlertid som svært små mellom de kloreksonerte gruppene og kontrollgruppene, og siden verdiene er innenfor normalområdet for laks er det trolig ikke er noen fysiologisk relevant forskjell mellom gruppene.



Figur 13. Plasmanatriumverdier i gruppene med 2+ under eksponerings (venstre) og restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk i gruppen. Klammene

med store bokstaver A, B og AB viser signifikante forskjeller mellom eksponeringsgrupper, uavhengig av uttaksdag. Små bokstaver a og b viser signifikante forskjeller innen samme uttaksdag.

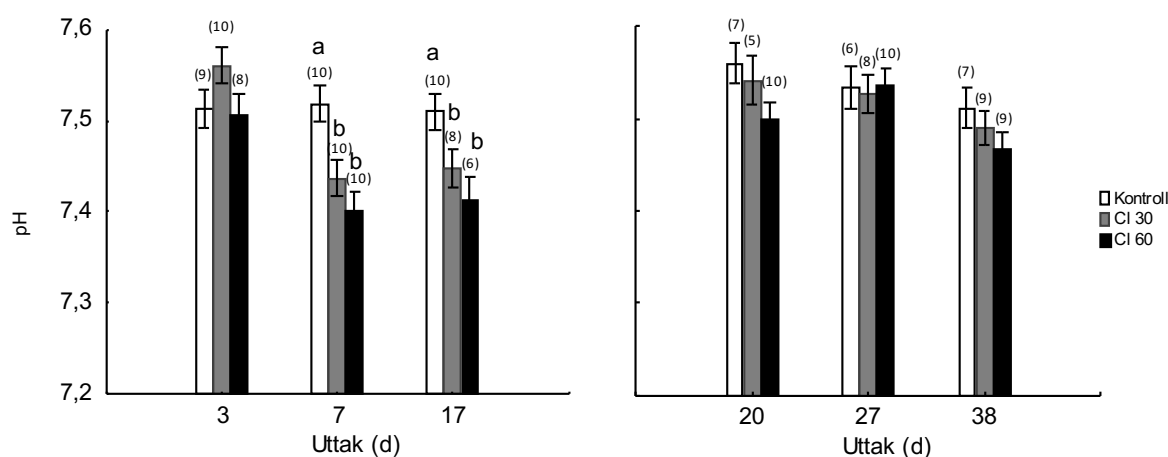
Det var en trend som viste en svak reduksjon i pH for den kloreksonerte fisken i gruppene med 1+ under eksponeringsperioden, særlig for CI 60-gruppen, men endringen var ikke signifikant (One-way ANOVA; $p>0,08$). Etter eksponering gikk pH i de kloreksonerte gruppene raskt opp, og det var ingen signifikante endringer i pH mellom gruppene i restitusjonsperioden (One-way ANOVA; $p=0,88$).



Figur 14. Plasma-pH i gruppene med 1+ under eksponerings (venstre) og restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk i gruppen.

Det var en signifikant interaksjonseffekt mellom gruppe og uttaksdag (Two-way ANOVA; $p<0,01$) for toåringene. I eksponeringsgruppene var det signifikant lavere pH ved dagene 7 og 17 sammenliknet med kontrollgruppen (post-hoc; $p<0,05$). Etter eksponering var det en indikasjon på at pH-verdiene for de kloreksonerte gruppene restituerer raskt.

I restitusjonsperioden var det ingen signifikante forskjeller mellom gruppene av toåringene (ANOVA; $p=0,14$). Det var heller ikke noen signifikante interaksjonseffekter mellom behandling og uttaksdag (ANOVA; $P=0,62$). Det var imidlertid en signifikant effekt av uttaksdag (ANOVA; $p<0,05$), som indikerer at det har vært en gradvis lavere plasma-pH hos alle gruppene samlet gjennom restitusjonsperioden.



Figur 15. Plasma-pH i gruppene med 2+ under eksponerings (venstre) og restitusjonsperioden (høyre). Tallverdiene rett over stolpene viser antall fisk i gruppen. Små bokstaver a og b viser signifikante forskjeller innen samme uttaksdag.

Tabell 7. Gjennomsnittlige verdier, standardavvik (StdD) og n for hematokrit, plasmaklorid, plasmanatrium og plasma-pH ved uttaksdag for alle forsøksgrupper gjennom forsøket.

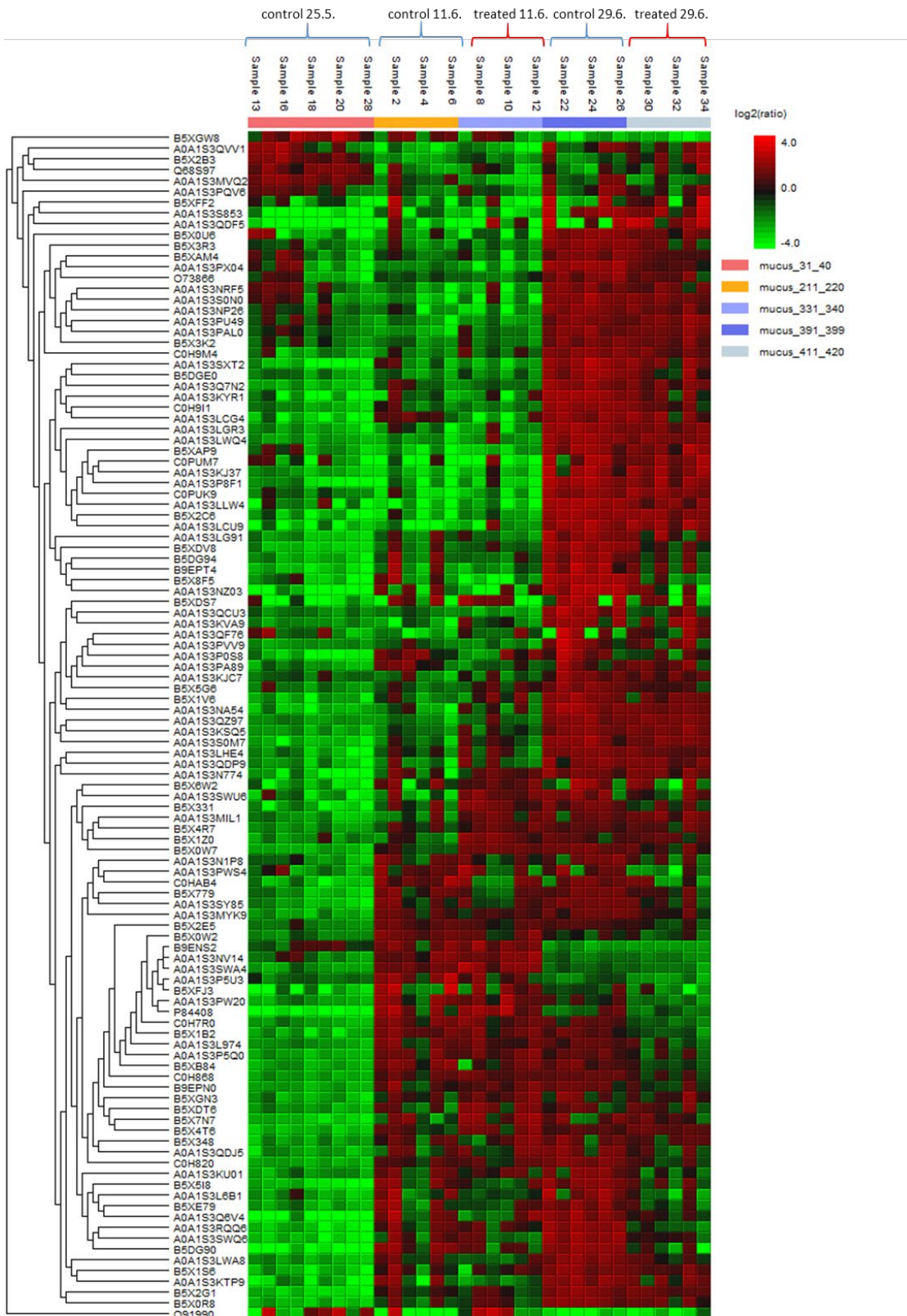
	Uttak (d)	Hematokrit			Plasmaklorid			Plasmanatrium			Plasma-pH		
		Snitt	StdD	n	Snitt	StdD	n	Snitt	StdD	n	Snitt	StdD	n
Alder 1+													
Kontroll	3	47,1	5,29	10	117,1	3,43	5	162,1	7,37	5	7,52	0,048	5
	7	44,7	5,74	8	108,8	8,74	5	170,4	9,74	5	7,49	0,087	5
	17	44,5	5,29	4	-	-	0	-	-	0	-	-	0
	20	47,8	2,66	5	114,1	18,38	2	159,6	19,23	2	7,45	0,078	2
	27	45,5	4,73	9	115,9	11,03	6	168,0	3,68	6	7,47	0,052	6
	38	39,2	4,52	10	131,5	4,17	7	165,6	8,89	7	7,52	0,042	7
CI 30	3	50,3	6,23	10	115,6	6,65	7	161,8	5,13	7	7,51	0,077	7
	7	48,0	2,89	9	105,8	7,52	5	147,4	17,75	5	7,38	0,102	5
	17	39,0	8,09	7	103,4	1,77	2	140,6	21,57	2	7,39	0,000	2
	20	33,0	7,42	7	128,4	3,54	4	173,2	2,69	4	7,50	0,103	4
	27	32,9	4,85	8	124,5	-	1	159,9	-	1	7,52	-	1
	38	32,2	3,87	10	134,3	3,39	2	168,8	17,82	2	7,44	0,021	2
CI 60	3	48,0	5,08	9	108,7	7,27	4	166,4	5,43	4	7,49	0,074	4
	7	41,8	5,13	10	107,4	5,49	5	147,5	8,32	5	7,38	0,040	5
	17	34,3	2,47	2	-	-	0	-	-	0	-	-	0
	20	37,1	8,07	8	110,6	15,94	3	147,1	29,01	3	7,44	0,056	3
	27	33,0	4,87	7	125,1	1,69	3	162,9	9,07	3	7,55	0,044	3
	38	30,2	4,08	9	122,5	9,05	6	154,9	5,33	6	7,50	0,081	6
Alder 2+													
Kontroll	3	49,5	5,13	10	115,8	11,71	9	162,5	8,75	9	7,51	0,085	9
	7	46,9	5,22	10	129,1	4,72	10	171,7	7,99	10	7,52	0,053	10
	17	46,5	6,13	10	127,6	12,56	10	172,4	10,22	10	7,51	0,058	10
	20	49,5	5,04	10	129,4	12,42	7	184,5	10,66	7	7,56	0,078	7
	27	45,2	9,41	6	123,1	12,74	6	169,5	6,27	6	7,53	0,093	6
	38	43,4	2,05	9	134,3	3,35	7	173,6	5,16	7	7,51	0,056	7
CI 30	3	45,0	3,54	10	117,2	7,83	10	169,9	8,77	10	7,56	0,067	10
	7	46,2	5,23	10	119,0	8,11	10	160,2	11,34	10	7,44	0,049	10
	17	40,5	4,39	10	118,1	10,40	8	162,9	6,49	8	7,45	0,055	8
	20	40,1	2,59	7	138,1	3,27	5	181,7	5,21	5	7,54	0,048	5
	27	41,8	4,10	8	128,1	11,30	8	170,5	6,36	8	7,53	0,068	8
	38	45,1	5,69	10	125,6	10,84	9	167,3	8,63	9	7,49	0,040	9
CI 60	3	47,2	5,80	10	121,4	7,50	8	165,8	11,32	8	7,51	0,060	8
	7	45,5	3,29	10	112,6	7,67	10	152,3	10,80	10	7,40	0,069	10
	17	39,9	4,18	10	114,5	7,73	6	154,8	7,74	6	7,41	0,042	6
	20	42,6	3,73	10	130,2	7,82	10	171,6	10,16	10	7,50	0,052	10
	27	42,3	4,72	10	132,7	2,47	10	169,1	3,37	10	7,54	0,045	10
	38	42,0	5,03	10	128,5	10,18	9	168,0	11,06	9	7,47	0,044	9

3.2.5 Histopatologiske vurderinger av gjeller

Ved histologiske vurderinger av gjeller fra laksunger ved prøveuttaket etter 17 dager med kloreksponering ble gjellene fra fisk i alle forsøksgruppene, både 1+ og 2+ vurdert som friske.

3.2.6 Slimanalyser – proteomikk

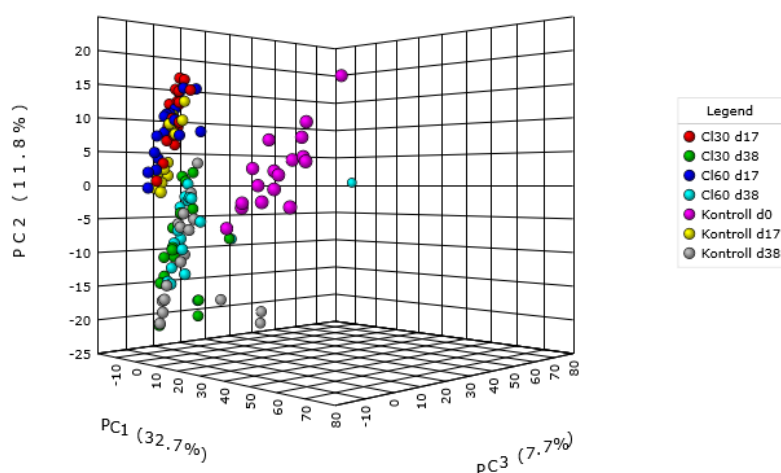
Etter filtrering og kvalitetssikring av peptider og proteiner mot en database som inneholder kjente lakseproteiner, ble til sammen 3461 påviste proteiner fremstilt i et varmekart (Figur 16). Varmekartet gir en grafisk fremstilling av den relative mengden proteiner som ble påvist i fiskeslimprøvene. Proteinene er organisert i en matrise der radene angir representative proteiner innenfor proteingrupper og der kolonnene angir enkeltprøver. Proteiner med stor grad av likhet (identitet) er plassert nær hverandre, det vil si at protein i rad 3 og 4 har større likhetsgrad enn protein i rad 1 og 20. Fargekodene angir den relative signalstyrken av proteinet i en prøve i forhold til alle målte proteiner i den samme prøven og er uttrykt med en skala fra 4 (lys rød) til -4 (lys grønn) med prøve 1 fra 11. juni som referansepunkt. Rød farge betyr at proteinet ble målt med høy relativ signalstyrke og grønn farge betyr at den relative signalstyrken var lav sammenlignet med referanseprøven. Det er tydelig fra varmekartet at proteiner fra slimprøvene ved uttaket den 25. mai, før eksponering, generelt ble detektert med mindre intensitet enn ved prøvetidspunktet etter 17 dager eksponering for 60 µg tilsatt klor/l (11. juni). Det var ingen tydelige forskjeller i proteinuttrykk mellom kloreksponert fisk og kontrollfisk ved dette tidspunkt for de fleste proteiner, men noen unntak. Ved siste prøveuttak, da fisken var holdt i vann uten klortilsetning (restitusjon) i 21 dager (29. juni), ble de fleste proteiner målt med høyere intensitet enn ved uttaket den 11. juni (flere røde felter). Ved dette prøveuttaket var det større variasjon i proteinuttrykk mellom kloreksponert gruppe og kontrollgruppen, sammenlignet med prøveuttaket den 11. juni. Generelt sett hadde uttakstidspunkt en større innflytelse på intensitetene til proteinene enn eksponering for klor. Likevel finnes det flere proteiner som viser lav signalstyrke enn høy signalstyrke i prøver fra klorbehandlet fisk ved begge uttakstidspunktene sammenlignet med kontrollfisken.



Figur 16. Varmekart der radene viser proteingrupper og der hver kolonne representerer én prøve. Fargene viser med hvilken signalstyrkeproteinene ble målt i forhold til prøve 1 (11.6) på en skala fra 4 til -4 (lys rød = 4 og lys grønn = -4).

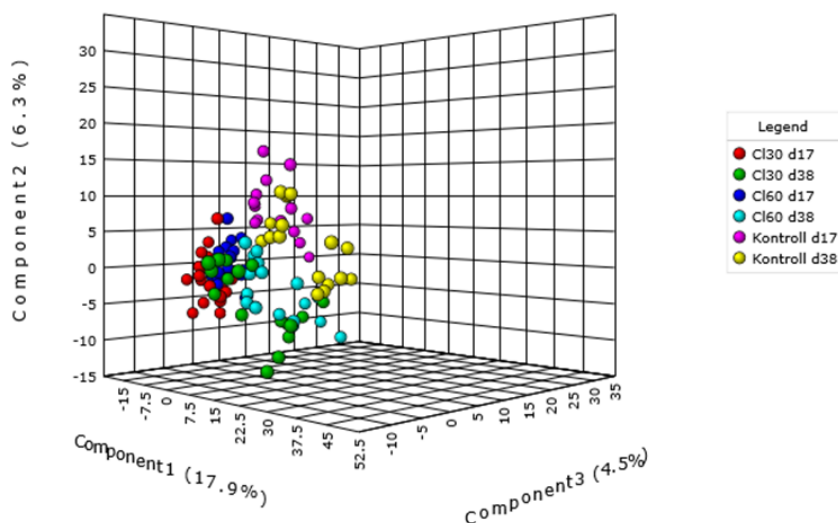
3.2.7 Slimanalyser – metabolomikk

Det ble påvist 1906 metabolitter i slim fra til sammen 140 fisk. Metabolitter med et relativt standardavvik $\geq 30\%$ i forhold til QC-standarder, som ble analysert gjentatte ganger gjennom hele den instrumentelle analysen, ble fjernet. Dermed gjenstod 932 metabolitter som inngikk i den videre dataanalysen. 29 % av disse var tilstede i alle prøvene. Hovedkomponentanalyse (PCA) ble brukt for å belyse den totale variasjonen blant metabolittene (Figur 17). De metabolske profilene fra kloresponert fisk og de respektive kontrollfiskene fordelte seg samlet innenfor ulike områder ved hvert prøvetidspunkt (Figur 17). Dette betyr at det var små forskjeller i metabolske profiler mellom kloresponert- og kontrollfisk, men at de metabolske profilene var tydelig forskjellige ved de ulike prøvetidspunktene. Dette viser at metabolittsammensetningen endret seg med tiden i forsøksperioden (Figur 17). Tid i forsøk hadde dermed en større betydning enn kloresponeringen for hvordan metabolittprofilene i fiskeslimet ble uttrykt.



Figur 17. Tredimensjonalt score-plot fra prinsipal komponentanalyse av 932 metabolitter fra fiskeslim ekstrahert fra laks (1+ og 2+) som var eksponert for vann tilsatt 30- og 60 μg klor/l, og fra respektive kontrollfisk. Tallene i parentes viser variasjonen som forklares av hver komponent.

Videre analyse av de 932 metabolittene ved bruk av partial least squares-discriminant analyse (PLS-DA) som inkluderer gruppetilhørigheten under klassifiseringsprosessen viser en liten, men signifikant forskjell i metabolittprofiler mellom de kloresponerte fiskegruppene og kontrollgruppene (Figur 18).



Figur 18. Tredimensjonalt score-plot fra partial least squares-discriminant analyse av 932 metabolitter fra fiskeslim ekstrahert fra laks (1+ og 2+) som var eksponert for vann tilsatt 30- og 60 μg klor/l, og fra respektive kontrollfisk. Tallene i parentes viser variasjonen som forklares av hver komponent.

4 Diskusjon

Under en eventuell fullskala behandling med klor mot *G. salaris* i et vassdrag kan det oppstå korte perioder med høyere klorkonsentrasjoner i vannet enn det som er nødvendig for å fjerne parasitten. Slike forhold kan forekomme lokalt eller i større deler av vassdraget. Forhøyede klorkonsentrasjoner kan oppstå ved tekniske utfordringer med doseringsutstyr, unøyaktig dosering av klor i forhold til vannføring, lokalt dårlig innblanding av kjemikaliene og liknende. Det var derfor et behov for å studere responser og effekter på laks ved eksponering for høyere konsentrasjoner av klor enn det som kan forventes under en behandling i et naturlig vassdrag. Formålet i dette prosjektet har vært å studere fysiologiske effekter i blod, fysiske effekter i form av skader på gjellene, biokjemiske endringer i slimlaget og atferdsendringer ved høye klordoser. Videre har det i denne studien også vært undersøkt om fisken evner å restituere eventuelle subletale effekter fra kloreksponeringen. I den videre diskusjonen fremheves observerte endringer i fysiologiske parametere og atferd. Det diskuteres også hvorvidt fysiologiske forstyrrelser restitueres innenfor en tidsperiode på 21 dager.

Variasjon i kjemiske og fysiske forhold i vannet vil på flere nivåer kunne medføre endringer i effekten av klor som behandlingsskjemikaliem. I det videre legges det derfor vekt på å beskrive de rådende forholdene under forsøket. Råvannet som ble tatt fra Glitra, var moderat kalkrikt, og pH var stabil litt over 7 akkurat som under forsøket i 2017 (Hagen mfl. 2018). Vannet var imidlertid betydelig klarere i 2018 med TOC- og KOF-Mn-verdier omtrent halvert sammenlignet med i 2017. Under forholdene som forelå i 2017, forble 25-35 % av tilsatt klor i aktiv form ved måling 10 minutter etter at monokloramin var tilsatt til ellevannet. I dette forsøket var dette forholdet økt til 40 % av kloren som ble tilsatt vannet. Det økte utbyttet kan skyldes flere forhold, men det er nærliggende å anta at klarere vann er en årsak til at høyere andel av tilsatt klor holdt seg på aktiv form. En annen viktig faktor er at det behandlede vannet i forsøket i 2017 var i kontinuerlig kontakt med bunnsubstratet i Glitra. Dette kan ha redusert mengden aktiv klor i vannet, sammenliknet med forsøket i 2018.

Mangan var noe høyere i 2018 enn i 2017, men det er tvilsomt om det har vært nok til å påvirke klor. Harp (2002) hevder at kloraminer ikke oksiderer mangan. De andre vannkjemiske parameterne ga ingen indikasjon på vesentlige endringer i forhold som påvirker klorforbruk.

Nivået av aktivt klor varierte i forsøksperioden, og i perioden 4. – 6. juni ble det målt lavere konsentrasjoner av aktivt klor. Dette skyldtes trolig høyere nedbrytning av klor i doseringsløsningene enn forventet. Økningen av målt aktivt klor fra 6. juni skyldes at doseringen av kloramin ble oppjustert på grunn av den lavere målte klorkonsentrasjonen, men også fordi fisken basert på atferdsobservasjonene ble vurdert som lite påvirket av behandlingen.

Alle adferdsendringer som ble observert i løpet av forsøket ble vurdert som «svakt redusert fluktnespons», altså score 1, bortsett fra ved ett tidspunkt under eksponeringen der én av fiskegruppene ble vurdert til å være moderat påvirket (score 2). Sammenliknet med adferden til kontrollfisken ble det følgelig kun observert små endringer hos laksungene ved eksponering for gjennomsnittlige konsentrasjoner på 11,5 og 22,1 µg klor/l i 17 dager. Endringene bestod i redusert fluktnespons, det vil si at kloresponert fisk i noe mindre grad enn kontrollfisk responderte i form av økt svømmeaktivitet når karlokket ble løftet til side, og fisken ble lyst på med lykt. Økt svømmeaktivitet under atferdsundersøkelsen ble vurdert som normal atferd, og kontrollgruppen fungerte som en referanse på normalitet. Angivelse av scoreverdier var i enkelte tilfeller utfordrende, og metodikken må anses som subjektiv. Resultatene innenfor de enkelte fiskegruppene med 1+ og 2+ vurderes likevel som pålitelige fordi direkte sammenligning mot atferd i de respektive kontrollgruppene alltid var tilgjengelig.

I en behandlingssituasjon vil det være ønskelig å kunne bruke atferdsobservasjoner som en indikator på fiskens helsesituasjon. Kun svake endringer i atferd kan tolkes som at fisken var lite påvirket av kloresponeringen. Alternativt kan det være slik at effekter fra klorbehandling ikke gir adferdsendringer som fanges opp i den type undersøkelser som ble gjort i dette forsøket. Dette i kontrast til aluminiumbehandlinger, der fisk som er negativt påvirket av behandlingen viser redusert svømmeaktivitet og nedsatt fluktnespons (Pettersen mfl. 2005). Resultatene viser at det var fysiologiske effekter av klorbehandlingen på fisken. Dette reflekteres ikke tydelig i atferdsobservasjonene, og er derfor et viktig resultat som må legges til grunn ved visuell vurdering av fiskens helse ved eventuelle klorbehandlinger mot *G. salaris* i vassdrag.

Resultatene viser at 1+ og 2+ av laks utfra en vurdering av atferd tåler eksponering for inntil 60 µg klor/l tilsatt som kloramin i 17 dager, men resultatene må sees i sammenheng med fysiologiske funn.

Klor er et oksidasjonsmiddel som kan ha en korrosiv virkning på biologiske overflater, for eksempel på fiskegjeller. Dette antas å kunne medføre fysiologiske responser slik som endret blodkjemi og fysiske endringer i gjelleoverflaten. I dette forsøket ble det ikke påvist histopatologiske funn ved undersøkelse av gjellevevssnitt. Det ble imidlertid registrert endringer i fysiologiske blodparametere som hematokritverdier, plasmaklorid, plasmanatrium og plasma-pH.

Fra dag 17 av eksponeringsperioden og gjennom hele restitusjonsperioden var hematokritverdiene hos den kloresponerte fisken i 1+ gruppen lavere enn det som er beskrevet som normalverdier for laks (44-49 %) (Sandnes mfl. 1988), og det ble ikke observert restitusjon av hematokritverdiene gjennom restitusjonsperioden. I restitusjonsperioden sank imidlertid også hematokritverdiene i kontrollgruppen, og mot slutten av perioden var hematokritverdiene for kontrollgruppen lavere enn normalverdiene for laks, noe som indikerer at tiden fisken gikk i forsøket har ført til en reduksjon i hematokritnivå. Redusert hematokritnivå som følge av tiden fisken gikk i forsøk kan vært en medvirkende årsak til manglende restitusjon av hematokritverdiene i gruppene med kloresponert fisk. Hematokritresultatene fra gruppen med 1+ bør imidlertid tolkes med forsiktighet på grunn av utfordrende prøvetakning av svært små fisk (se kap. 2.2.2.) og lav n i enkelte prøveuttak.

For fisken i gruppen med 2+ var det en signifikant reduksjon av hematokritverdiene i begge kloreksponte grupper allerede fra dag 3, sammenliknet med kontrollgruppen. Det var imidlertid først ved dag 17 at hematokritverdiene hos den kloreksponte fisken var lavere enn det som er beskrevet som normalverdier for laks. Det var signifikant lavere hematokritverdier for de kloreksponte gruppene i starten av restitusjonsperioden (dag 20) sammenliknet med kontrollgruppen, men ingen forskjell mellom eksponeringsgruppene og kontrollgruppen senere i restitusjonsperioden (dag 20 og 38). Fisken i de kloreksponte gruppene av 2+ må derfor sies å ha vært restituert fra virkningene av kloreksporingen senest innen 10 dager etter endt eksponering. Fisken i flere av gruppene hadde imidlertid hematokritverdier som var lavere enn normalverdiene for laks, men dette var også tilfellet for kontrollgruppen. Det er derfor grunn til å anta at de relativt lave hematokritverdiene skyldes forhold som ikke er relatert til kloramineksponeringen, men for eksempel tiden fisken har gått i forsøk uten føring. Tidligere studier har vist at fisk som ikke føres vil kunne få reduserte hematokritverdier i løpet av noen uker (Foda 1975, El-Mowafi mfl. 1997). Mangel på næringstilgang kan også ha gitt fisken redusert evne til nyproduksjon av røde blodceller (erytrocytter), noe som er vist å kunne være relatert til mangel på sporstoffene jern (Fe) eller kobber (Cu) (El-Mowafi mfl. 1997). Levetiden til de røde blodlegemene i blodet til fisk varierer mellom arter, livsstadier og metabolsk status for fisken, men kan typisk være 105 ± 17 dager for regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Kruse mfl. 1988).

Hematokritresultatene skiller seg fra resultatene i eksponeringsforsøket i Glitra i 2017, der både klorekspont fisk og kontrollfisk fikk påvist økte hematokritverdier (Hagen mfl. 2018). Det ble da diskutert hvorvidt dette kunne skyldes en generell økning i størrelsen (svelling) av røde blodceller som følge av økt adrenalinkonsentrasjon (Heming mfl. 1987) på grunn av den økte stressfaktor forsøket representerte, og at bedøvelsen ved avlivning også kunne være en medvirkende årsak til de forhøyede hematokritverdiene (Phuong mfl. 2017). Avlivningsmetoden i Hagen mfl. (2018) skiller seg fra metoden i dette forsøket, der fisken ikke ble bedøvd før avlivning, men kun fikk et slag mot hodet. Dette kan være en av årsakene til at hematokritverdiene generelt var lavere i dette forsøket sammenliknet med Hagen mfl. (2018).

I forbindelse med dialysebehandling innen humanmedisin har det vært vist at kloramin fra drikkevannskilden kan diffundere gjennom dialysemembranene og reagere med hemoglobin i de røde blodcellene og oksidere dette til methemoglobin, som ikke lenger har evnen til å binde oksygen reversibelt (Eaton mfl. 1973). Den samme studien viste at røde blodceller som ble eksponert for kloramin fikk kortere levetid, og andre forsøk (Buckley mfl. 1976) har rapportert hemolytisk anemi også i fisk som følge av kloramineksponering. Det er derfor sannsynlig at blodet til fisken i vårt forsøk kan ha gjennomgått endringer som beskrevet over, og at de lave hematokritverdiene hos eksponert fisk kan skyldes hemolytisk anemi.

Det ble ikke observert signifikante forskjeller i hematokrit mellom Cl 30- og Cl 60-gruppen. En praktisk konsekvens av dette kan være at den nøyaktige konsentrasjonen av kloramin i vassdraget ikke er veldig viktig for effekten på fisk, så lenge verdiene av aktiv klor holder seg innenfor det som er observert i dette forsøket (11,5-22,1 µg aktiv klor/liter).

Det var stor forskjell mellom gruppene av 1+ og 2+ når det gjelder evnen til å restituere hematokritverdiene. Toåringene restituerte innen 10 dager fra endt eksponering, mens ettåringene ikke viste tegn til restitusjon i løpet av restitusjonsperioden på 21 dager. Dette kan skyldes at ettåringene tålte manglende næringstilgang i forsøksperioden på 38 dager dårligere enn toåringene, men vi har ikke resultater som kan underbygge en slik konklusjon.

Sammenslåingen av prøveverdiene i den statistiske analysen fra de ulike uttakene for ettåringene bidrar til å viske ut eventuelle endringer som skjer gjennom eksponeringen eller restitueringen, og fører også til å at det er vanskelig å bruke dataene til å konkludere for effekten på denne årsklassen. Datagrunnlaget er derfor for tynt til at resultatene fra ettåringene vektlegges like sterkt som for toåringsgruppen.

Plasmakloridnivåene for begge de kloreksponerte gruppene av ettåringer var lavere (begge 108 mM Cl⁻) enn det som i litteraturen er beskrevet som normalverdier for laks i ferskvann (111-135 mM Cl⁻) (Arnesen mfl. 1998, Evans 1979, Evans 1993, Handeland mfl. 1998, Handeland mfl. 2000, Iversen & Eliassen 2012, Iversen mfl. 2009). Under eksponeringsperioden var plasmakloridverdiene for kontrollgruppen også nær nedre grense (113 mM) for det som er beskrevet som normalverdier for laks i ferskvann. Under restitusjonsperioden var plasmakloridverdiene høyere i alle grupper enn under eksponeringen, og innenfor det som er beskrevet som normalverdier for laks i ferskvann. Det var signifikant reduksjon i plasmanatrium for Cl 60-gruppen sammenliknet med Cl 30- og kontrollgruppen for ettåringene, når resultatene for restitusjonsperioden vurderes samlet. Verdiene i Cl 60-gruppen var likevel på dette tidspunktet høyere (155 mM Na⁺) enn det som er beskrevet som normalverdier for laks i ferskvann (130-150 mM Na⁺) (Arnesen mfl. 1998, Evans 1979, Evans 1993, Handeland mfl. 1998, Handeland mfl. 2000, Iversen & Eliassen 2012, Iversen mfl. 2009). Verdiene av plasmaklorid- og plasmanatrium for de eksponerte gruppene av toåringer viste lik trend. Det var ingen signifikante forskjeller i plasmaioneverdier mellom kloreksponerte grupper og kontrollgrupper for toåringene etter tre dager eksponering, men det var signifikant lavere plasmaioneverdier for de eksponerte toåringene sammenliknet med kontrollgruppen 7 og 17 dager ut i eksponeringsperioden. Disse forstyrrelsene hos fisken restituerte imidlertid svært raskt for plasmaklorid, og verdiene for de eksponerte fiskene var tilsvarende eller høyere enn kontrollgruppen allerede tre dager inn i restitusjonstiden. For plasmanatrium vedvarte imidlertid en signifikant lavere verdi for Cl 60-gruppen sammenliknet med kontrollgruppen gjennom restitusjonsperioden. De signifikant reduserte verdiene av plasmanatrium og -klorid i de kloreksponerte gruppene sammenliknet med kontrollgruppene tolkes som at kloreksponering kan gi moderate forstyrrelser i ionebalansen.

Kloreksponeringen førte til en reduksjon av plasma-pH for fisken, men effekten var kun signifikant for gruppene av toåringer. Fisken restituerte tilbake til pH-verdier tilsvarende kontrollgruppen i løpet av perioden mellom dag 17 og dag 20 i forsøket. Dette er i samsvar med funn gjort i liknende studier, der regnbueørret ble eksponert for natriumhypokloritt tilsvarende 0,45 mg klor/l i 60 minutter (Powell & Perry 1996).

Det var en signifikant reduksjon i plasma-pH for toåringene gjennom restitusjonsperioden. Denne effekten var imidlertid ikke forskjellig mellom kontrollgruppen og eksponeringsgruppene, og kan derfor ikke forklares med kloreksponeringen.

Basert på observasjoner i forsøket i Glitra i 2017, der det ble sett antydninger til patologiske forandringer på gjeller hos laks som var eksponert for ca. 8 µg aktivt klor/l i 9 dager (Hagen mfl. 2018), kunne det forventes patologiske funn på gjellene i dette forsøket. Histologiske undersøkelser viste imidlertid at det ikke var patologiske endringer på fiskens gjeller som følge av klorbehandlingen, og gjellene ble vurdert som friske. Det er godt dokumentert at sterke oksidasjonsmidler kan skade fiskegjeller, og skadene kan være synlige som blødninger, hyperplasi, sammenvoksinger av lameller og nekroser (Speare mfl. 1999). Slike skader ble ikke påvist i vårt forsøk, til tross for høyere konsentrasjon av kloramin i dette forsøket enn i forsøket i 2017. Dette viser at kloreksponering for inntil 22,1 µg/l aktivt klor i en periode på 17 dager ikke påvirker gjellestrukturen hos laks negativt. Eventuelle endringer i slimlaget på gjellene kan ikke utelukkes da dette ikke kan påvises med histopatologiske undersøkelser av gjeller som er fiksert med formalin.

Slim dekker alle fiskens ytre overflater og har vital betydning for påvirkninger fra det eksterne miljøet. Slim er et svært komplekst materiale som består av blant annet proteiner og metabolitter (Zaccone mfl. 2001, Patel & Brinchmann 2017, Ivanova mfl. 2018). Dette er substanser som er viktige for slimlagets beskyttende funksjon, og de kan påvirkes av ytre faktorer som vannkvalitet (Shephard

1994, Berntssen mfl. 1997, Ledy mfl. 2003,) og infeksjose agens (Subramanian mfl. 2008, Nolan mfl. 1999), men også av indre prosesser i fisken som metabolsk aktivitet og immunologiske responser (Vatsos mfl. 2010). I tråd med dette var det grunn til å tro at eksponeringen for klor ville påvirke sammensetningen av proteiner og metabolitter i slimet i fiskehuden, både kvalitativt og kvantitativt. Proteinanalysen viste imidlertid ingen tydelige forskjeller for de fleste detekterte proteiner mellom kloreksponte grupper og kontrollgruppen, mens det i metabolittanalysen var en liten, men signifikant forskjell mellom gruppene. Begge analysene viste at det var klare forskjeller i uttrykket av metabolitter og proteiner ved de ulike prøveuttakene, og denne forskjellen var avhengig av hvor lenge fisken hadde vært i forsøket, og i mindre grad av om fisken var eksponert for klorholdig vann eller ikke. Disse funnene underbygger hypotesen om at den manglende næringstilgangen i forsøket kan ha vært en medvirkende årsak til de lave hematokritverdiene som ble observert i restitusjonsperioden for gruppen av ettåringer. Fisken ble ikke føret i forsøket, og endringer i fiskens ernæringsstatus er derfor den mest sannsynlige forklaringen på forskjellene i protein- og metabolittuttrykk gjennom forsøksperioden på 38 dager.

5 Konklusjon

Dette forsøket har gitt viktig informasjon om effekter på laksunger ved eksponering for klordoser som er relevante for behandling mot *G. salaris* i norske vassdrag. Eksponering for dobbelt så høy klordose som den som tidligere har vist seg å fjerne parasitten fra laks i løpet av 2-4 dager ga kun små blodfysiologiske forandringer hos fisken. Alle fysiologiske forandringene, med unntak av reduserte hematokritverdier hos gruppen med ettåringer, restituerte også raskt etter endt kloreksporing. Fraværet av restitusjon hos ettåringene kan både skyldes skadene fra kloreksporingen, men også det faktum at fisken ikke ble føret under forsøket. Det kan ikke utelukkes at mangel på før påvirket ettåringene negativt i større grad enn toåringene, selv om dette ikke kom til uttrykk i kondisjonsfaktormålingene.

Det var ikke var signifikante forskjeller i fysiologisk effekt mellom gruppene av toårig laks eksponert for henholdsvis 11,5 og 22,1 µg klor/l. Dette indikerer en viss grad av fleksibilitet innen doseringen av kloramin til et vassdrag, og at lokale variasjoner i klorkonsentrasjon i vassdraget kan tolereres av fisken. En slik fleksibilitet representerer en robusthet for eventuell bruk av kloramin som behandlingsskjemikalium mot *G. salaris*. Det var forventet at kloreksporingen for ca. 22 µg klor/l ville gi synlige atferdsendringer hos laksungene i eksponeringsperioden på 17 dager, men det ble kun registrert en svakt redusert fluktnespons hos klorekspont fisk sammenlignet med atferden til fisken i kontrollgruppen. Dette til tross for de nevnte endringene i blodfysiologiske parametere som hematokrit, plasmaioner og plasma-pH. Klorbehandling kan altså gi fysiologiske forstyrrelser uten at dette kommer til uttrykk som tydelige atferdsavvik. Atferdsobservasjoner er generelt en viktig indikator på fiskens helsesituasjon. Dette er derfor viktig kunnskap for en eventuell bruk av kloramin i fullskala behandlingstiltak mot *G. salaris* i elver.

Laks er kjent som den mest følsomme fiskearten i ferskvann når det gjelder endringer i vannkvalitet som for eksempel forsuring og giftig aluminium (Grande mfl. 1978, Lien mfl. 1992, Polèo mfl. 1997), og det er dokumentert at livsstadie innenfor denne arten har forskjellig tålegrenser for surt aluminiumsrikt vann (Jensen & Leivstad 1989, Polèo & Muniz 1993). Dette forsøket har vist at toårig laksunger kan eksponeres for inntil 22 µg klor/l i 17 dager uten at dette får alvorlige konsekvenser for fisken. For ettåringene er det noe vanskeligere å konkludere, på grunn av de lave hematokritverdiene i restitusjonsperioden. Ved en eventuell behandling med klor mot *G. salaris* vil det også være voksen laks i vassdraget, og det er derfor viktig å utrede følsomheten for klor hos dette livsstadiet av laks.

6 Referanser

- Anon (2014). Handlingsplan mot lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* for perioden 2014-2016. Miljødirektoratet 2014. 114s.
- Arnesen, A. M., Johnsen, H. K., Mortensen, A. & Jobling, M. (1998). Acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to 'cold' sea water following direct transfer from fresh water. *Aquaculture*, 168, 351-367.
- Berntssen, M. H. G., Kroglund, F., Rosseland, B. O. & Bonga, S. E.W. (1997). Responses of skin mucous cells to aluminium exposure at low pH in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (5), 1039–1045.
- Buckley, J. A., Whitmore, C. M. & Matsuda, R. I. (1976). Changes in blood chemistry and blood cell morphology in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following exposure to sublethal levels of total residual chlorine in municipal wastewater. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 776–782.
- Bullock, G.L., Herman, R.L. & Waggy, C. (1991). Hatchery efficacy trials with Chloramine-T for control of bacterial gill disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3 (1): 48-50.
- Eaton, J.W., Kolpin, C.F., Swofford, H.S., Kjellstrand, C.M. & Jacob, H.S. (1973). Chlorinated Urban Water: A Cause of Dialysis Induced Hemolytic Anemia. *Science* 03 Aug 1973. Vol. 181, Issue 4098, pp. 463-464.
- El-Mowafi, A.F.A., Maage, A., Lorentzen, M., Hassanein, E.I. & Julshamn, K. (1997). Tissue indicators of element status in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts: effect of fasting. *Aquaculture Nutrition* 1997 3; 73–80.
- Eriksen, T. E. (2018). Korttidseffekter på elvelevende bunnfauna av kloraminbehandling mot parasitten *Gyrodactylus salaris* i Glitra. NIVA-rapport 7237-2018. 28s.
- Evans, D. H. (1979). Fish. In: Maloiy, G. M. O. (ed.) *Comparative physiology of osmoregulation in animals*, Vol. 1. Academic Press, London, p. 305–390
- Evans, D.H. (1993). Osmotic and ionic regulation. In: *The Physiology of Fishes*. Edited by Evans D.H. CRC Press, Boca Raton, pp. 315–341.
- Foda, A. (1975). Effects of Starvation on Hatchery-Reared Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Technical report series no. MAR/T-75-2. Resource Development Branch, Fisheries and Marine Service, Department of the Environment. Halifax, Nova Scotia. 12s.
- From, J. (1980). Chloramine-T for control of bacterial gill disease. *Prog. Fish-Cult* 42:85-86.
- Fæste, C.K., Moen, A., Schniedewind, B., Anonsen, J.H., Klawitter, J. & Christians, U. (2016). Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for the quantitation of Anisakis simplex proteins in fish. *Journal of Chromatography A*. Volume 1432, 5 February 2016. Pages 58-72.
- Grande, M., Muniz, I.P. & Andersen, S. (1978). Relative tolerance of some salmonids to acid waters. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20, 2076-2084.

Hagen, A.G., Hytterød, S. & Olstad, K. (2014). Low concentrations of sodium hypochlorite affect population dynamics in *Gyrodactylus salaris* (Malmberg, 1957); Practical guidelines for the treatment of the Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parasite. *Journal of Fish Diseases* 37, 1003-1011.

Hagen, A.G., Hytterød, S., Olstad, K., Garmo, Ø.A., Darrud, M., Holter, T.H., Svendsen, J., Mo, T.A., Escudero, C., Martínez-Frances, E. & Gjessing, M. (2018). Forsøksbehandling med monokloramin mot *Gyrodactylus salaris* i elva Glitra. NIVA- rapport 7238-2018. 26s.

Hagen, A.G., Hytterød, S., Olstad, K., Garmo, Ø.A., Darrud, M., Holter, T.H. & Martínez-Francés, E. (2019). Utvikling av klormetoden mot *Gyrodactylus salaris* - feltforsøk i Batnfjordelva. NIVA- rapport 7359-2019. 44s.

Handeland, S.O., Berge, A., Björnsson, B.T. & Stefansson, S.O. (1998). Effects of temperature and salinity on regulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts in seawater. *Aquaculture* 168: 289-302.

Handeland, S.O., Berge, A., Björnsson, B.T., Lie, O. & Stefansson, S.O. (2000). Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts at different temperatures. *Aquaculture* 181: 377-396.

Harp, L.D. (2002). Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater. Technical Information Series. Booklet No.17, Hach Company.

Heming, T.A., Randall, D.J. & Mazeaud, M.M. (1987). Effects of adrenaline on ionic equilibria in red blood cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiol Biochem.* Mar;3(2):83-90.

Hytterød, S., Hansen, H., Johansen, K. & Larsen, S. (2018). The surveillance programme for *Gyrodactylus salaris* in Atlantic salmon and rainbow trout in Norway 2017. Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual report 2017. Oslo: Norwegian Veterinary Institute 2018. 4s.

Ivanova, L., Haitam, T., Grove, S., Kristoffersen, A.B. & Uhlig, S. (2018). Workflow for the Targeted and Untargeted Detection of Small Metabolites in Fish Skin Mucus. *Fishes* 2018, 3, 21.

Iversen, M., Eliassen, R.A., & Finstad, B. (2009). Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar L.* Transport and transfer to sea. *Aquaculture Research* 40, 233-241.

Iversen, M. & Eliassen, R. (2012) Stressovervåkning av settefiskproduksjonen i Mainstream Norway AS 2009 - 2011. Stresskartlegging av laksesmolt (*Salmo salar L.*), og effekten av stressreducerende tiltak på stressnivå, dyrevelferd og produksjonsresultatet. UiN-rapport nr 05/2012. 54s.

Jensen, E.A. & Leivstad, H. (1989). Surt vann og smoltproduksjon. Sluttrapport fra Vannbehandlingsprosjektet Salar/BP 1984-87, 82s.

Kruse, C. & Sordyl, H. (1988). Bestimmung der Mittleren Lebenszeit von Erythrozytten bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri R.*) mittels Cr51-markierung, *Wiss. Z. Wilhelm-Pieck-Univ., Rostock. Naturwiss. R.*, 1988, vol. 37, pp. 93-96.

- Ledy, K., Giambérini, L. & Pihan, J.C. (2003). Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta* fario in acidic, aluminium-containing stream water. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol. 56: 235-240.
- Lien, L., Raddum, G. G. & Fjellheim, A. 1992. Critical loads of acidity to freshwater -- fish and invertebrates. *Naturens Tålegrense Fagrapport 23*, Norwegian Institute for Water Research, Oslo. 36s.
- Nolan, D.T., Reilly, P. & Bonga, S.E.W. (1999). Infection with low numbers of the sea louse, *Lepeophtheirus salmonis*, induces stress-related effects in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 947–959.
- Patel, D.M. & Brinchmann, M.F. (2017). Skin mucus proteins of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Biochem Biophys Rep*, 9: 217-225.
- Pettersen, R.A., Hytterød, S., Mo, T.A., Poléo, A.B.S., Hagen, A.G., Flodmark, L.E.W., Høgberget, R., Olsen, N., Kjøsnes, A.J., Øxnevad, S., Håvardstun, J., Kristensen, T., Sandodden, R., Moen, A. & Lydersen, E. (2005). Kjemisk behandling mot *Gyrodactylus salaris* i Lærdalselva 2005. NIVA- rapport 5169-2006. 24s. <http://hdl.handle.net/11250/213133>
- Puong, L.M., Damsgaard, C., Huong, D.T.T., Ishimatsu, A., Wang, T. & Bayley, M. (2017). Recovery of blood gases and haematological parameters upon anaesthesia with benzocaine, MS-222 or Aqui-S in the air-breathing catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Ichthyological Research* 64, 84-92.
- Poléo, A.B.S. & Muniz, I.P. (1993). The effect of aluminium in soft water at low pH and different temperatures on mortality, ventilation frequency and water balance in smoltifying Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Environ. Biol. Fish.* 36, 193-203.
- Poléo, A.B.S., Østbye, K., Øxnevad, S.A., Andersen, R.A., Heibo, E. & Vøllestad, L.A. (1997). Toxicity of acid aluminium-rich water to seven freshwater fish species: A comparative laboratory study. *Environ. Pollut.* 96, 129-139.
- Powell, M.D. & Perry, S.F. (1996). Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood during exposure to chloramine T, paratoluenesulphonamide, and hypochlorite. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 53, No. 4: pp. 701-708. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/f95-250>
- Sandnes, K., Lie, Ø. & Waagbø, R. (1988). Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 32, 129-136.
- Shephard, K. L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in fish biology and fisheries* 4(4), 401-429.
- Singleton, H.J. & Bio, R.P. (1989). Ambient water quality criteria for chlorine. Technical appendix. Resource Quality section, Water Management Branch, Ministry of Environment, Province of British Columbia, Victoria, Canada. 105s.
- Smith, S.A., McAllister, P.E., Hrubec, T.C. & Veit, H.P. (1993). Survey of endemic diseases of cultured rainbow trout in Virginia. *Proceedings of the Aquaculture Association of Canada*, vol. 10. Charlottetown, P.E.I. pp. 62.

Speare, D.J., Carvajal, V. & Horney, B.S. (1999). Growth Suppression and Branchitis in Trout Exposed to Hydrogen Peroxide. *Journal of Comparative Pathology* 120, 391-402.

Subramanian, S., Ross, N.W. & MacKinnon, S.L. (2008). Comparison of the biochemical composition of normal epidermis mucus and extruded slime of hagfish (*Myxine glutinosa* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 25:625-632.

Thorburn, M.A. & Moccia, R.D. (1993). Use of chemotherapeutics on trout farms in Ontario. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5:85-91.

Vatsos I. N., Kotzamanis Y., Henry M., Angelidis P. & Alexis M. N. (2010). Monitoring stress in fish by applying image analysis to their skin mucous cells. *European Journal of Histochemistry* 54, 107– 111.

World Health Organization (2006). *Guidelines for Drinking- Water Quality, Vol. 1, Recommendations*, 3rd edn. World Health Organization. Available at:
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf [Accessed 11 November 2018].

Zaccone, G., Kapoor, B.G., Fasulo, S. & Ainis, L. (2001). Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. *Advances in Marine Biology*. Volume 40:253–276.

Vedlegg A.

Tabell 8. Oversikt over temperatur, konduktivitet og turbiditet (målt med YSI 650 MDS), samt pH, jern, mangan, kalsium, totalt organisk karbon (TOC) og kjemisk oksygenforbruk (KOF Mn) fra laboratorieanalyser (Eurofins).

Dato	Temperatur (°C)	Konduktivitet (µS/cm)	Turbiditet (NTU)	PH	Jern (µg)	Mangan (µg/l)	Kalsium (mg/L)	TOC (mg/l)	KOF Mn
25.05.2018	14,30	0,081	0,9	7,87	35,2	3,44	13,8	3,2	3,2
26.05.2018	13,31	0,084	0,9		186,0	61,7	14,5	3,2	3,1
27.05.2018	13,38	0,079	0,8	7,85					
28.05.2018	13,21	0,074	0,9	7,87					
29.05.2018	12,72	0,074	0,8	7,90	36,6	6,9	12,4	2,9	2,6
30.05.2018	12,88	0,075	0,8	7,81					
31.05.2018	13,72	0,077	0,8	7,80					
01.06.2018	14,77	0,074	0,8	7,78					
02.06.2018	14,54	0,074	0,8						
03.06.2018	13,97	0,069	0,8	7,79	72,9	21,3	11,0	2,8	2,5
04.06.2018	13,62	0,067	0,8	7,85					
05.06.2018	10,95	0,065	0,8	7,81					
06.06.2018	9,76	0,063	0,9	7,78					
07.06.2018	10,89	0,063	0,8	7,88	76,7	22,5	10,2	2,7	2,4
08.06.2018	12,15	0,062	0,8	7,78					
09.06.2018	12,34	0,063	0,8	7,83					
10.06.2018	13,25	0,062	0,8	7,74					
11.06.2018	13,19	0,066	0,8	7,80					
12.06.2018	11,96	0,063	0,8	7,61					
13.06.2018	12,33	0,063	0,8	7,65					
14.06.2018	12,00	0,061	0,8						
15.06.2018									
16.06.2018									
17.06.2018									
18.06.2018	10,15	0,071	0,9						
29.06.2018	12,56	0,057	0,7		18,0	3,7	8,9	2,6	2,3

Tabell 9 - Resultater fra atferdsundersøkelsen gjort daglig i behandlingsperioden fra 25.05.2018 - 10.06.2018. Ingen fiskekar ble noen gang gjennom forsøket tildelt høyere score enn 2, som for øvrig bare skjedde vet ett enkelt tilfelle den 14.06.2018 i kar 30L-2.

Dato	Tid	30S-1	30S-2	30S-3	30L-1	30L-2	30L-3	60S-1	60S-2	60S-3	60L-1	60L-2	60L-3
25.05.18													
26.05.18	10:08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27.05.18	12:45	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
28.05.18	14:00	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
29.05.18	13:40	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
30.05.18	10:00	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
31.05.18	10:30	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
01.06.18	15:00	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
02.06.18	10:15	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
03.06.18	12:45	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
04.06.18	10:40	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05.06.18	09:36	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
06.06.18	10:08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07.06.18	11:54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
08.06.18	08:10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
09.06.18	08:30	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
10.06.18	09:00	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
11.06.18	08:51	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
12.06.18	10:20	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
13.06.18		0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
14.06.18	09:00	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1
15.06.18													
16.06.18													
17.06.18													
18.06.18	08:30	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
19.06.18													
20.06.18													

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsliv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00
www.niva.no • post@niva.no