

Effekter av kloramineksponering på stor, voksen laks (*Salmo salar*)



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 av kloramineksponering på stor, voksen laks (<i>Salmo salar</i>)	Løpenummer 7474-2020	Dato 28.02.2020
Forfatter(e) Sigurd Hytterød ² , Kjetil Olstad ³ , Tobias Holter ³ , Johannes Rusch ² , Øyvind Garmo ¹ , Mona Gjessing ² , Marianne Kraugerud ⁴ og Anders Gjørwad Hagen ¹ ¹ Norsk institutt for vannforskning, ² Veterinærinstituttet, ³ Norsk institutt for naturforskning, ⁴ FishVetGroup.	Fagområde Vannressursforvaltning	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Møre og Romsdal	Sider 29
Oppdragsgiver(e) Miljødirektoratet M-1650 2020		Oppdragsreferanse Jarle Steinkjer 19087455
		Utgitt av NIVA Prosjektnummer 180127

Sammendrag

Forsøk har vist at lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* er svært følsom for klorforbindelser, og at lave konsentrasjoner fjerner parasitten fra laksunger uten at laksunger påvirkes i vesentlig negativ grad. Høsten 2019 fikk Gyroklorprosjektet tilgang til stor villaks i fangsthuset i Driva, og kunne dermed undersøke effekter av kloreksponering på dette livsstadiet av laks. Fysiologiske og biokjemiske parametere i blod, samt histologiske snitt fra gjeller, ble studert i forbindelse med at to grupper voksen villaks fra elva Driva ble eksponert for gjennomsnittlig klorkonsentrasjoner på henholdsvis 9,5 og 23 µg klor/l over en periode på 14 dager. Fisken ble deretter holdt i friskt vann i ytterligere tre uker (restitusjon). Forsøket inkluderte også laksunger med *G. salaris*-infeksjon, der disse ble eksponert for samme klorkholdig vann som den store fisken. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom fisken i de kloreksponerte forsøksgruppene og kontrollgruppen, verken for ulike blodparametere eller ved histopatologiske undersøkelser av gjeller. Det var heller ingen visuelle forskjeller i adferd mellom forsøksgruppene under kloreksponeringen. Forsøket har dermed vist at stor, voksen laks fra Driva kan eksponeres for 23 µg klor/l over en periode på 14 døgn uten at fisken påvirkes i vesentlig negativ grad. *Gyrodactylus salaris*-infeksjonen ble redusert til 0 og 0,7 % av startinfeksjonen i gruppene eksponert for 23 og 9,5 µg klor/l i 13 dager. Forsøket har vist at det er et godt terapeutisk vindu mellom dosen som har effekt på henholdsvis *G. salaris* og stor, voksen laks. Fisken tolererer en kloreksponering i mer enn dobbelt så lang tid som det tar å eliminere infeksjoner med *G. salaris* på opp mot 2000 parasitter per fisk.

Fire emneord	Four keywords
1. Monokloramin	1. Monochloramine
2. <i>Gyrodactylus salaris</i>	2. <i>Gyrodactylus salaris</i>
3. Fysiologi	3. Physiology
4. Atlantisk laks	4. Atlantic salmon

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

Anders Gjørwad Hagen

Prosjektleder

Atle Hindar

Faglig kvalitetssikrer

ISBN 978-82-577- 7209-3

NIVA-rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institutt for vannforskning. Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse.

Effekter av kloramineksponering på stor, voksen laks (*Salmo salar*)

Forord

Gyroklorprosjektet har som overordnet mål å utrede om klorforbindelser kan brukes i behandling mot *Gyrodactylus salaris* i norske laksevasdrag. I februar 2019 fremla prosjektgruppa et forslag for Miljødirektoratet der videre utredning av klor som bekjempelsesmiddel i kampen mot parasitten ble skissert. Med utgangspunkt i et treårig prosjekt støttet Miljødirektoratet forslaget om å eksponere stor, voksen laks fra Driva for klorkonsentrasjoner som er relevante for behandling mot *G. salaris*.

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

Forsøket som rapporteres her er gjennomført i fangsthuset ved fiskesperra i Snøvasmelan i Driva. Vi vil takke Driva elveeierlag for tilgang til forsøksfisken og spesielt alle som jobber med stamfisk i fangsthuset. En spesiell takk til Inger Helen Sira Hagen (lokal koordinator) for god hjelp med gjennomføring av prosjektet. Vi vil også takke Pål Adolfsen (Veterinærinstituttet) for hjelp med *Gyrodactylus*-undersøkelsene og Helge Bardal og Roar Sandodden (Veterinærinstituttet) for å bistå under prøveuttakene. Kim Magnus Bærum, NINA Lillehammer, har gjort statistiske analyser av blodfysiologidata.

Forsøkene er gjennomført med tillatelse fra Mattilsynet i henhold til *Forskrift om bruk av dyr i forsøk* med FOTS-ID 20203.

Oslo, 28.02.2019

Anders Gjørwad Hagen,
prosjektleder

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	9
2	Metode	10
2.1	Forsøkslokalitet og forsøksoppsett	10
2.2	Protokoll	11
2.2.1	Prøvetaking og undersøkelse av fisk	11
2.2.2	Prøvetaking og vannkjemiske analyser	13
2.3	Biologiske prøver og analyser	15
2.3.1	Blodanalyser	15
2.3.1	Gjelleprøver til histopatologisk vurdering	15
2.3.2	Vurdering av fiskeadferd	16
2.3.3	Statistikk for biologiske analyser	16
3	Resultater	17
3.1	Vannanalyser	17
3.2	Biologiske undersøkelser	17
3.2.1	Kondisjonsfaktor	17
3.2.2	Blodparametere	18
3.2.3	Histopatologiske vurderinger av gjeller	20
3.3	Effekt på <i>Gyrodactylus salaris</i>	21
4	Diskusjon	22
5	Konklusjon	25
6	Referanser	26
	Vedlegg	29

Sammen drag

Forsøk har vist at lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* er svært følsom for klorforbindelser, og at lave konsentrasjoner fjerner parasitten fra laksunger uten at yngelen påvirkes i vesentlig negativ grad. Disse funnene har gitt grunnlag for å etablere Gyroklorprosjektet der det overordnede målet er å utrede om klorforbindelser kan brukes som skånsom behandling mot *G. salaris* i smittede vassdrag.

I et fangsthuset ved en fiskesperre i Driva fanges voksen villaks for å hindre videre oppvandring og gyting i øvre deler av vassdraget. Laks i Driva er infisert med *G. salaris*, og fiskesperra reduserer utbredelsesområdet til parasitten i elva. Høsten 2019 fikk Gyroklorprosjektet tilgang til stor villaks i fangsthuset, og kunne dermed undersøke effekter av kloreksonering på dette livsstadiet.

Fysiologiske (plasmaklorid, hematokrit, hemoglobin, laktat, kreatinin, totalt protein) og biokjemiske parametere (alanin aminotransferase, kreatinin kinase, laktat dehydrogenase) i blod, samt histologiske snitt fra gjeller ble studert i forbindelse med at to grupper voksen villaks fra elva Driva ble eksponert for gjennomsnittlig klorkonsentrasjoner på henholdsvis 9,5 og 23 µg klor/l over en periode på 14 dager. Fisken ble deretter holdt i friskt vann i ytterligere tre uker (restitusjon). En kontrollgruppe ble holdt i vann uten klortilsetning gjennom hele forsøksperioden. Forsøket inkluderte også laksunger med *G. salaris*-infeksjon, der disse ble eksponert for samme klorkholdig vann som den store fisken.

Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom fisken i de kloreksonerte forsøksgruppene og kontrollgruppen, verken for ulike blodparametere eller ved histopatologiske undersøkelser av gjeller. Det var heller ingen visuelle forskjeller i adferd mellom forsøksgruppene under kloreksoneringen. Forsøket har dermed vist at stor, voksen laks fra Driva kan eksponeres for 23 µg klor/l over en periode på 14 døgn uten at fisken påvirkes i vesentlig negativ grad.

Startinfeksjonen for *G. salaris* var høy, med gjennomsnittlig 1717, 1698 og 1943 parasitter per fisk i gruppene med 23 µg klor/l, 9,5 µg klor/l og kontroll. Ved forsøkets slutt var *G. salaris*-infeksjonen redusert til 0 og 0,7 % av startinfeksjonen i gruppene Cl-lav (9,5 µg klor/l) og Cl-høy (23 µg klor/l). Reduksjonen i antall *G. salaris* fra 100 % til 0 tok noe lenger tid enn det som tidligere er observert ved eksponering for tilsvarende klordoser. Årsaken er ikke kjent, men den lave temperaturen i forsøksperioden kan være en mulig forklaring.

Forsøket har vist at det er et godt terapeutisk vindu mellom dosen som har effekt på henholdsvis *G. salaris* og stor, voksen laks. Fisken tolererer en kloreksonering i mer enn dobbelt så lang tid som det tar å eliminere infeksjoner med *G. salaris* på opp mot 2000 parasitter per fisk.

Summary

Title: Effects from chloramine exposure in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*).

Year: 2020

Author(s): Sigurd Hytterød, Kjetil Olstad, Tobias Holter, Johannes Rusch, Øyvind Garmo, Mona Gjessing, Marianne Kraugerud and Anders Gjørwad Hagen.

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577- 7209-3

Previous experiments have shown the salmon parasite *Gyrodactylus salaris* to be profoundly susceptible to chlorine-compounds and that even low concentrations can remove the parasite from juvenile salmon without substantial negative impact on the fish. These findings laid the foundation for the creation of the “Gyroklor”-project of which the overarching goal is to determine whether chlorine compounds can be used as a mild treatment against *G. salaris* in infected watersheds.

At a fish migration barrier in River Driva adult wild Atlantic salmon were caught in a trap house to prevent salmon migration and spawning further upstream. This measure also reduces the area in which the parasite is present. In autumn 2019, the “gyroklor”-project was granted access to mature wild salmon in the trap house and it was therefore possible to examine the effects of the exposure to chlorine on fish at that life stage.

A range of physiological parameters (plasmachloride, hematocrit, hemoglobine, lactate creatinine, total protein) and biochemical parameters (alanine aminotransferase, creatinine kinase, lactate dehydrogenase) of blood were analysed together with histological sections from gills after two groups of mature/adult wild salmon from River Driva had been exposed to concentrations of 9,5 µg/l and 23 µg/l of chlorine respectively for a period of 14 days. The fish were subsequently kept in untreated water for a further 3 weeks which constituted the restitution phase. A control group was held in ambient river water without additional chlorine throughout the entire duration of the experiment. In addition, the experiment included juvenile Atlantic salmon infected with *G. salaris* which were exposed to the same chlorine concentrations as the adult fish.

No significant differences between the fish of the exposed groups and the control group were detected, neither in the various blood parameters, nor after histopathological examination of the gills. Furthermore, no behavioural changes (visual observation) between the control group and the fish exposed to both chlorine concentrations were found. This experiment has therefore, proven that large adult salmon from River Driva can be exposed to concentrations up to 23 µg chlorine/l for 14 days without observed negative impact on the fish.

The initial infection of *G. salaris* was high, with an average of 1717, 1698 and 1943 parasites per fish for the group exposed to 23 µg chlorine/l, 9,5 µg chlorine/l and the control group, respectively. At the end of the experiment the Infection of *G. salaris* had been reduced to 0 % and 0,7 % of the starting infection for the low treatment group (9,5 µg chlorine/l) and the high treatment group (23 µg chlorine/l), respectively. The reduction of parasite numbers from 100 % to zero lasted longer than previously observed, when exposing infected salmon to similar concentrations of chlorine. The reason for this is unknown but the low water temperatures during the experimental phase may serve as a possible explanation.

The study has proven that there is a good therapeutic margin between *G. salaris* and large adult wild Atlantic salmon since the fish tolerate exposure to chlorine for more than twice the duration required to eliminate infections of up to 2000 parasites per fish.

1 Introduksjon

Gyrodactylus salaris tilhører en dyregruppe med akvatiske parasitter som på norsk kalles haptormark. Parasitten lever i ferskvann og den infiserer primært laks (*Salmo salar*), hvor den finnes på kroppen og finnene. *G. salaris* ble innført til Norge på 70-tallet og den er påvist i 51 norske elver (Hytterød mfl. 2020). 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 *G. salaris*. Per januar 2020 er 38 vassdrag friskmeldt, 5 vassdrag er ferdigbehandlet, men fortsatt ikke friskmeldt og åtte vassdrag fordelt på to smitteregioner har kjent forekomst av *G. salaris* (Hytterød mfl. 2020). 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) etterfulgt av et feltforsøk i Lierelva og Batnfjordelva (Hagen mfl. 2018, 2019a), har bekreftet at klorforbindelser kan fjerne *G. salaris* fra laksunger i naturlig elvevann uten alvorlige effekter på fisken. I tillegg ble det under forsøkene i Drammenselva konstatert at klor tilsatt som monokloramin øker varigheten av den toksiske effekten mot *G. salaris* sammenlignet med klor tilsatt som natriumhypokloritt (upublisert). 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, Powel & Clark 2002, 2003). Sammen med resultatene fra forsøkene med *G. salaris* nevnt over, la dette grunnlag for å utrede monokloramin som et potensielt kjemikalium til bekjempelse av *G. salaris* i norske lakselver.

Klor kan være giftig for fisk (Larson mfl. 1978), 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 varierer 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 klorkonsponering av laks infisert med *G. salaris* (Hagen mfl. 2014, 2018, 2019b). Hagen mfl. 2019b viste også at laksunger (ett- og toåringer) kan eksponeres for 22 µg klor/l i 14 dager uten alvorlige konsekvenser for fisken.

Atlantisk laks er kjent som en av de mest følsomme fiskeartene i ferskvann når det gjelder endringer i vannkvalitet, for eksempel i forbindelse med forurening av elver (Grande mfl. 1978, Lien mfl. 1992, Polèo mfl. 1997). Det er også dokumentert at livsstadiene innenfor denne arten har forskjellig

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

tålegrenser for surt og aluminiumsrikt vann (Jensen & Leivstad 1989, Polèo & Muniz 1993). Behandling med aluminium mot *G. salaris* i norske elver har vist at voksen, gytemoden laks har lavere tålegrense enn lakseyngel for denne typen behandling (Pettersen mfl. 2007, Bardal mfl. 2008), og det var derfor relevant å undersøke om det er tilsvarende forskjeller i følsomhet mellom stor, voksen laks på gytevandring og lakseyngel ved eksponering for giftige klorforbindelser. I denne studien er fysiologiske og biokjemiske parametere i blod, samt histologiske snitt fra gjeller studert. To grupper med stor, voksen villaks fra elva Driva ble eksponert for gjennomsnittlige klorkonsentrasjoner på 9,5 og 23 µg klor/l (heretter omtalt som Cl-lav og Cl-høy) over en periode på 14 dager. Det ble også undersøkt om fisken evner å restituere eventuelle effekter fra kloreksponeing.

2 Metode

Forsøket ble gjennomført fra 19. september til 29. oktober 2019 ved elva Driva. Laksen i elva er infisert med *Gyrodactylus salaris*. Hensikten med forsøket var å undersøke om stor, voksen laks påvirkes av klor innenfor de nivåer som er aktuelle å tilsette til et vassdrag hvis klor skal brukes som behandlingsmetode mot *G. salaris*. To grupper med stor, voksen villaks fra Driva ble holdt i forsøkskar og eksponert for klorforbindelser i 14 dager. Villaksunger som var infisert med *G. salaris*, ble eksponert for det samme klorholdige vannet, for å studere hvordan kloreksponeingen av den store laksen påvirket parasittinfeksjonen.

2.1 Forsøkslokalitet og forsøksoppsett

Forsøket ble satt opp innendørs i et hus (fangsthuset) på elvebredden ved siden av en fysisk fiskesperre i elva Driva. Sperra er bygget ca. 25 km oppstrøms Sunndalsøra, der Driva munner ut i havet. Sperra hindrer laksen i å vandre videre oppover i vassdraget og på denne måten reduseres utbredelsesområdet for laksen, og dermed også for *G. salaris* i Driva. Ved fiskesperrea er det laget en fisketrapp som leder anadrom fisk direkte inn i fangsthuset. Der håves laks ut og individer som skal brukes i levende genbank blir valgt ut og holdt i kar frem til stryking. Overskuddsfisk fra dette arbeidet ble benyttet i våre forsøk.

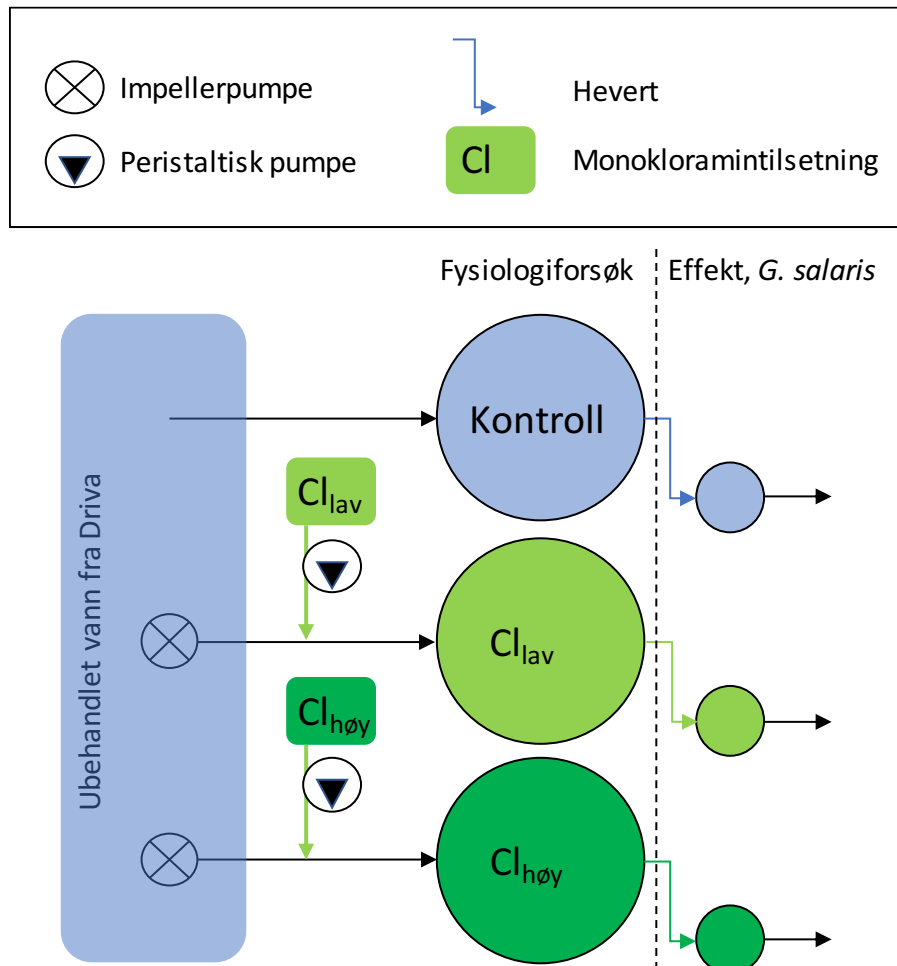
To grupper av stor villaks ble eksponert for to ulike konsentrasjoner av klor, 9,5 og 22 µg klor/l, heretter omtalt som Cl-lav og Cl-høy. En tredje forsøksgruppe ble holdt i grovfiltret elvevann uten klortilsetning og fungerte som kontrollgruppe.

Forsøksoppsettet ble konstruert som et åpent system med kontinuerlig vanngjennomstrømning. Vann fra Driva ($T = 4,4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ble pumpet inn i to store, sirkulære kar ($D = 2,75 \text{ m}$, $H = 1,3 \text{ m}$, $V = 7700 \text{ l}$) der en kran på tilførselslangene sikret stabil vanngjennomstrømning på 83-85 l/min i forsøksperioden. Vannet ble ledet inn i karene gjennom et fordelingsrør av plast ($D = 120 \text{ mm}$) som var festet loddrett ned langs karveggen. Røret var perforert med hull langs den ene siden og innvannet laget dermed en stabil, sirkulær vannstrøm i karet slik at fisken kunne stå uanstrengt mot strømretningen. Fordelingsrøret sikret også at vann ble distribuert inn i hele karetets høyde samt at tilsatt kloraminløsning ble godt innblandet. Oppholdstiden på vannet i forsøkskarene var ca. 90 minutter. Kontrollkaret fikk vanntilførsel fra eksisterende røropplegg i fangsthuset med tilnærmet samme gjennomstrømningshastighet som i kloreksponeeringskarene.

Klor som monokloramin ble tilsatt fra en stamløsning (500 mg Cl/l) ved hjelp av peristaltiske pumper (Watson-Marlow 323S, 304MC fem-kanals kassettpumpehode) med doseringsvolum på mellom 5,4 ml/min og 13,4 ml/min til de to forsøkskarene Cl-lav og Cl-høy. Ny stamløsning ble laget daglig ved at 15,6 gram ammoniumklorid (NH_4Cl) først ble løst i 5 liter elvevann. Deretter ble 52 ml 20 % natriumhypokloritt (NaClO) og 117 ml 1,0 M natriumhydroksid (NaOH) blandet ut i 20 liter elvevann.

Stamløsningen (V = 25 l) ble ferdigstilt ved at 20 liter NaClO/NaOH-løsning ble helt over i 5 liter NH₄Cl.

Små kar (V = 10 l) for hold av *G. salaris*-infiserte laksunger fra Driva ble plassert slik at de fikk tilført vann fra hvert sitt store forsøkskar ved hjelp av hevertprinsippet. På denne måten kunne laksunger med *G. salaris*-infeksjonen og stor laks eksponeres for det samme vannet. En skjematisk tegning av forsøksoppsettet er vist i Figur 1.



Figur 1. Skjematisk fremstilling av forsøksoppsett. Store sirkler representerer forsøkskarene der stor, voksen laks ble eksponert for klorholdig vann. Små sirkler representerer forsøkskarene der laksunger med *G. salaris* ble eksponert for vannet fra de store karene.

2.2 Protokoll

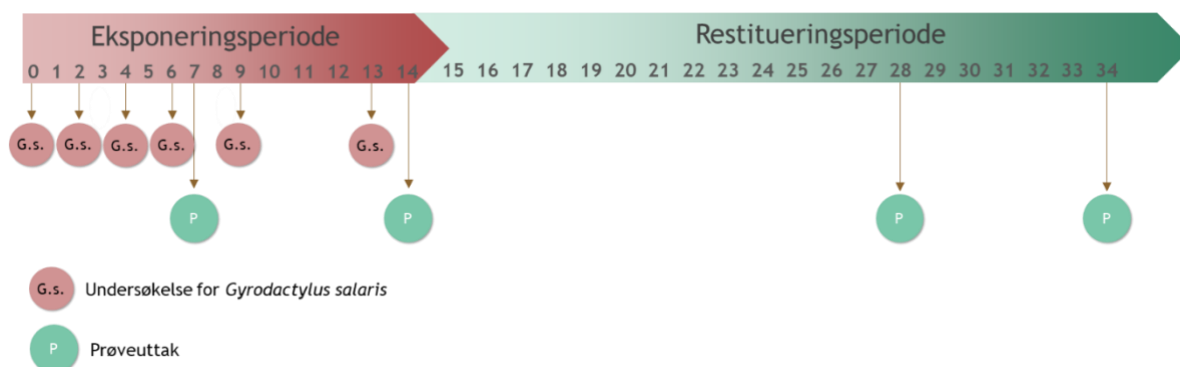
2.2.1 Prøvetaking og undersøkelse av fisk

Stor, voksen laks som ble brukt i forsøket var fanget i fiskefella i fangsthuset i løpet av sommeren 2019, og deretter holdt i kar frem til forsøksstart. Forsøksfisken hadde dermed ulike holdetid i kar før forsøket. Laksen varierte i størrelse (Lengde 46,5-110 cm, vekt 0,64-9,85 kg, se Tabell 1) og alder. Livshistorien til laksen varierte mellom individer som hadde vært ett år i sjøen til eldre fisk med fire-fem år i sjø. Totalt 126 laks ble fordelt likt på de tre forsøkskarene.

Tabell 1 - Lengde, vekt (gjennomsnitt \pm sd) og kjønnsfordeling oppgitt som antall hanner/hunner per prøveuttak.

Uttak	CI-høy			CI-lav			Kontroll		
	Lengde	Vekt	Kjønn	Lengde	Vekt	Kjønn	Lengde	Vekt	Kjønn
1	83,9 \pm 22,2	5,3 \pm 3,4	5/3	83,9 \pm 18,2	4,7 \pm 2,5	3/5	70,1 \pm 17,4	3,0 \pm 2,6	6/2
2	68,5 \pm 14,7	2,7 \pm 2,1	5/3	65,0 \pm 11,1	2,2 \pm 1,4	7/1	67,0 \pm 12,5	2,4 \pm 1,3	7/1
3	73,2 \pm 18,8	3,4 \pm 2,7	6/2	64,8 \pm 14,1	2,2 \pm 1,9	7/1	66,0 \pm 19,0	2,6 \pm 2,6	5/3
4	75,8 \pm 19,3	3,7 \pm 3,7	2/6	67,9 \pm 16,2	2,4 \pm 2,6	7/1	68,7 \pm 22,3	3,2 \pm 3,3	6/2

Fisken ble plassert i sine respektive kar den 19. september og kloreksporingen ble startet dagen etter. I løpet av det første døgnet ble vanntilførselen til de to karene med kloramintilsetning kraftig redusert fordi pumpene som sørget for vannforsyningen ble delvis tettet med løv. Morgen den 20.09.2019 var vanntilførselen svært lav, det ble målt lav O₂-metning i begge kar (CI-lav = 61 % og CI-høy = 71 %) og fisken var synlig preget, spesielt i gruppen CI-lav. Klortilsetningen, som på dette tidspunktet hadde pågått i ca. 18 timer, ble stanset umiddelbart, og rikelig med oksygenrikt vann fra det integrerte rørsystemet i Fangsthuset ble tilført til karene. Utbedring av systemet ble gjennomført før kloreksporing ble startet på nytt den 25. september. Vannforsyningen var stabil gjennom hele eksponeringsperioden på 14 dager. Ved ny oppstart av forsøket den 25. september ble det også tatt ut seks fisk fra hvert kar til prøvetaking. Dette prøveuttaket ble gjennomført for å etablere prøvetakningsprotokoll og for å teste prøvetakingsutstyret. Forsøksfisken hadde da vært eksponert for klor i 18 timer og i tillegg vært utsatt for en kort periode med lav O₂. Prøvene ble derfor ansett som lite egnet/verdifulle for å studere effekter av klor, og prøvematerialet fra dette uttaket ble ikke analysert. Videre gjennom forsøksperioden ble det tatt ut åtte laks fra hvert av karene ved fire prøveuttak, henholdsvis 7 og 14 dager etter oppstart av kloreksporing og 14 og 26 dager etter endt kloreksporing (se Figur 2).



Figur 2. Tidslinje over eksponeringsperioden og restitueringsperioden med oversikt over dager det ble gjennomført prøveuttak av voksen laks og *G. salaris*-undersøkelse av laksunger.

Ved prøvetaking ble én og én fisk tatt ut fra sitt respektive kar ved hjelp en langskaftet hov. Det ble lagt vekt på tilfeldig utvalg, og at hovingen skulle foregå rolig slik at den øvrige fisken i karet ble så lite berørt som mulig. Fisken ble avlivet i bedøvelsesbad (FinguelVet; 200 mg/l i ca. 2 minutter). Deretter ble lengde og vekt målt, før blodprøve ble tatt fra dorsalvenen. Den andre gjellebuen på fiskens venstre side ble skåret ut og fiksert på bufret formalin for senere snitting og farging. Hemoglobin og hematokrit ble målt umiddelbart etter prøvetaking mens alanin aminotransferase (ALAT), kreatinin kinase (CK), totalt protein (TP), laktat dehydrogenase (LDH), kreatinin, plasmaklorid og laktat ble analysert i laboratorium av FishVetGroup.

Laksunger ($n = 14$) infisert med *G. salaris* ble fanget i Driva ved hjelp av elektrisk fiskeapparat den 4. september. De ble holdt i et kar (90 l) med gjennomstrømmende, ubehandlet ellevann i tre uker frem til forsøksstart. Like før kloreksporing ble startet ble laksungene fordelt på tre forsøkskar med 5, 5 og 4 fisk i gruppene Cl-lav, Cl-høy og kontroll. Underveis i forsøket viste det seg at totalt 3 fisk (1 i kontroll, 2 i Cl-høy) var ørret eller hybrid mellom ørret og laks. Disse ble tatt ut av forsøket etter telling den 25. september. Før laksungene ble satt i karene ble nøyaktig antall *G. salaris* på hver fisk bestemt ved telling i en stereolupe (Leica MZ 7₅, 10x-15x forstørrelse). Før telling ble fisken bedøvet i bad med FinquelVet (15 mg/l) i ca. fire minutter. Under selve tellingen av parasitter ble fisken holdt i plastkar med vedlikeholdskonsentrasjon av FinquelVet (halv dose av bedøvelseskonsentrasjon). For individer med >1000 *G. salaris* ble antallet parasitter estimert til nærmeste 100-tall, ettersom det ikke lar seg gjøre å telle nøyaktig når antallet blir større enn 1000 per fisk. Etter telling av *G. salaris* ble laksungene overført fra bedøvelsesløsningen til et lite kar med friskt vann, og det ble påsett at fisken våknet fra bedøvelsen før de ble tilbakeført til respektive forsøkskar. Antall *G. salaris* ble notert på alle fisk i hver forsøksgruppe etter 0, 2, 4, 6, 9 og 13 dager med kloreksporing. Verken den store, voksne laksen eller laksungene ble fôret gjennom forsøket, og individenes oppholdstid i karene varierte etter når de var fanget i Fangsthuset (stor fisk) eller med el-fiskeapparat (yngel) før forsøksstart, samt når i forsøksperioden de ble tatt ut til prøvetaking.

2.2.2 Prøvetaking og vannkjemiske analyser

Gjennom kloreksporeringsperioden på 14 dager ble turbiditet, ledningsevne og temperatur målt daglig i alle forsøkskar ved bruk av en håndholdt sonde (YSI 650 MDS), mens pH ble målt med et WTW 340i pH-meter. Temperatur ble også målt kontinuerlig med HOBO temperaturlogger (TidbiT v2, UTBI-001, Onset, Cape Cod, USA) i alle de tre store karene gjennom hele forsøksperioden med loggeintervall på 30 min. Det ble tatt prøver for bestemmelse av mengde totalt organisk karbon (TOC) og kjemisk oksygenforbruk (permanganat-metoden) to ganger før eksponeringsperioden, to ganger i løpet av eksponeringsperioden, og tre ganger i løpet av restitusjonsperioden. Disse prøvene ble også analysert for flere parametere (se Tabell 2) for å gi en god karakterisering av vannkjemien før, under og etter eksponeringsperioden.

Ellevannet fra Driva var moderat kalkrikt ($5,5 \pm 0,94$ mg Ca/l), ikke turbid ($1,0 \pm 0,2$ NTU) og hadde nøytral pH (gjennomsnittlig pH på 7,2), se Tabell 2 og Tabell 4. Vannkjemien i råvannet var relativt stabil gjennom hele forsøksperioden. For fullstendig oversikt over målte verdier i råvannet i forsøksperioden, se Tabell 2.

Tabell 2 - Gjennomsnittsverdier med standardavvik for vannkjemiske parametere basert på totalprøver (n = 7) fra tidsrommet 20. september til 23. oktober. Vannkjemiske parametere fra prøver i klordoseringsperioden (3. oktober og 6. oktober) er i tillegg oppgitt i egne kolonner til høyre i tabellen. Gjennomsnittsverdien for pH er beregnet ved å konvertere verdiene til konsentrasjonen av H⁺ og tilbakeregnet til pH. Analysene er gjennomført av Eurofins.

Parameter	Benevning	Gjennomsnitt ± sd (n = 7)	03.10.2019	06.10.2019
Alkalitet	mmol/l	0,25 ± 0,04	0,23	0,28
*Ammonium	µg N/l	3,71 ± 3,68	10,00	5,00
Kalium	mg/l	0,84 ± 0,12	0,84	0,92
Kalsium	mg/l	5,47 ± 0,94	5,01	6,19
Klorid	mg/l	1,65 ± 0,36	1,66	1,76
Magnesium	mg/l	0,49 ± 0,07	0,46	0,55
Natrium	mg/l	1,43 ± 0,21	1,44	1,48
Nitrat	µg N/l	101,14 ± 31,75	86,0	130,00
Sulfat	mg/l	3,00 ± 0,60	2,75	3,24
Kjemisk oksygenforbruk Mn	mg O ₂ /l	1,41 ± 0,28	1,50	1,20
Kond_Temp	°C	24,19 ± 0,13	24,30	24,30
Konduktivitet	mS/m	4,11 ± 0,71	3,84	4,54
Jern	µg/l	27,93 ± 22,65	28,90	11,90
Mangan	µg/l	1,13 ± 0,73	1,31	0,73
pH	pH	7,22	7,20	7,23
Løst organisk karbon (DOC)	mg C/l	1,44 ± 0,28	1,50	1,30
Total nitrogen	µg/l	187,14 ± 37,29	170,00	220,00
Total organisk karbon (TOC)	mg C/l	1,49 ± 0,26	1,50	1,40

*Fire målinger ble bestemt til <2. Disse er satt til 1,0 ved beregning av gjennomsnitt.

I eksponeringsperioden ble det tatt vannprøver for analyse av klorkonsentrasjon minimum én gang per dag. Prøvene ble tatt fra innløpsvannet og utløpsvannet til kloreksponeringskarene, samt i utløpsvannet til kontrollkaret. I tillegg ble det tatt vannprøver i avløpsvannet til de to små karene der *G. salaris*-infiserte laksunger ble eksponert for klor. Det ble også tatt daglig vannprøve av råvannet, før dette ble ledet inn i forsøksoppsettet. Denne prøven fungerte som en referanseprøve. De åtte vannprøvene ble analysert for klor umiddelbart i feltlaboratoriet som var etablert i tilknytning til forsøkslokaliteten. Hver prøve ble filtrert til tre sentrifugerør (unntatt vannprøven fra kontrollkaret som ble filtrert til ett rør) gjennom et membranfilter med porestørrelse 0,45 µm. Filtratet (25 ml) ble tilsatt 0,15 ml fosfatbuffer² og deretter ristet før 0,15 ml av en fargereagens basert på N,N-dietyl-p-fenylendiaminsulfat (DPD)³ ble tilsatt. Til slutt ble alle prøvene tilsatt én dråpe med kaliumjodid og ristet. Prøvene (n = 28) stod deretter én time beskyttet fra direkte sollys 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 referansevannet ble trukket fra og differansen ble brukt til å beregne klorkonsentrasjonen (aktiv klor) basert på en standardkurve. Standardene ble laget ferske hver morgen ved å fortynde en klørøsløsning med kjent klorkonsentrasjon i 50 ml MilliQ vann. Deretter ble 0,3 ml fosfatbuffer og 0,3 ml DPD tilsatt til alle prøvene. Standardprøvene ble ristet etter tilsetning av hvert kjemikalium før de ble satt mørkt i 15 minutter. Absorbans ble deretter avlest i spektrofotometeret.

² 30 g dinatriumhydrogenfosfat, 46 g kaliumdihydrogenfosfat og 0,8 g EDTA i 1 liter MilliQ

³ 1,5 g DPD, 2 ml konsentrert svovelsyre og 0,2 g EDTA i 1 liter MilliQ

2.3 Biologiske prøver og analyser

2.3.1 Blodanalyser

Umiddelbart etter blodprøvetakingen (kanyle 21 G, 0,8 mm og hepariniserte 4,9 ml beholder S-Monovette® 4,9 ml, Li-hep, 90x13 mm, Figur 3) ble hemoglobinnivået i blodet målt ved hjelp av en Hemocue Hb 201+ Analyser med Hemocue Hb 201 microkyvetter. Litt av blodet ble overført fra sprøyten til to kapillærrør og sentrifugert (LW Scientific ZipCombo, ZCC-12HD-40T3) ved 1200 RPM i tre minutter før hematokrit ble målt som prosent pakket cellevolum (PCV) med hematokritskive. Resterende blod ble separert i røde blodceller og plasma ved hjelp av en Hettich EBA200 sentrifuge (5000 RPM i 10 minutter). Plasma ble fryst ved -20 °C og senere analysert for Alanin aminotransferase (ALAT), kreatinin kinase (CK), totalt protein (TP), laktat dehydrogenase (LDH) og kreatinin. Blodprøveresultater fra uttak 2, 3, 4 og 5 er presentert i denne rapporten.



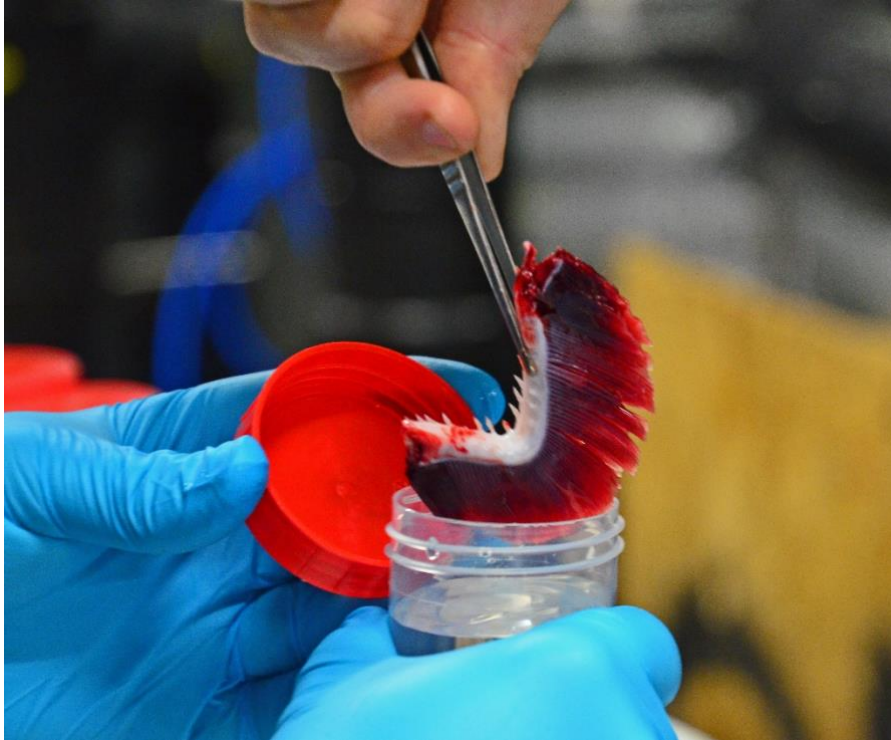
Figur 3 - Blodprøven ble tatt fra dorsalvenen. Foto: Johannes Rusch/Veterinærinstituttet

2.3.1 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 utvalgte forsøksgrupper og tidspunkter ble vurdert histopatologisk (Tabell 3).

Tabell 3 - Utvalgte gjellelevssnitt som ble vurdert for histopatologiske forandringer.

Forsøksgruppe	Prøvetidspunkt	n
Kontroll	To uker eksponering	8
Cl-høy	To uker eksponering	8
Kontroll	Tre uker restituering	8
Cl-høy	Tre uker restituering	8



Figur 4 - Dissekering av gjellebue for histologiske undersøkelser. Foto: Johannes Rusch/Veterinærinstituttet

2.3.2 Vurdering av fiskeadferd

Fisken hadde daglig tilsyn gjennom hele forsøksperioden og eventuelle adferdsendringer ble notert. Erfaringer fra tidligere forsøk har vist at det er vanskelig å kvantifisere adferden på laks mellom ytterpunktene «normal adferd» og «død fisk». Det ble derfor ikke gitt en adferdsscore slik som i andre forsøk med laks og klor (Hagen mfl. 2019b).

2.3.3 Statistikk for biologiske analyser

Eventuell effekt av eksponering og / eller tid på de enkelte parameterne ble testet ved hjelp av lineære modeller, med henholdsvis negativ binomialfordeling eller normalfordeling ettersom hva som var mest passende for de spesifikke måleverdiene. Analysen ble gjort ved hjelp av statistikkprogrammet R (v. 3.6.2), og for oppsett av de negative binomiale modellene ble det benyttet pakken MASS (Venables & Ripley 2002). Behandlingseffekten inngikk i en interaksjon med tid i alle modeller, for å tillate at behandlingseffekten kan variere over tid. Signifikante effekter på de forskjellige måleverdiene ble bestemt med bakgrunn i en p-verdi på 0,05.

Verdier fra måling av hemoglobin er justert i henhold til Clark mfl. (2008).

3 Resultater

3.1 Vannanalyser

Klorkonsentrasjonen i forsøksgruppene Cl-lav og Cl-høy var tilnærmet lik i innløpsvannet og utløpsvannet (Tabell 4). Varierende vannføring i Driva under forsøket, som følge av nedbør og snøsmelting, førte til noe varierende vannkjemi i råvannet. Dette ga seg utslag i klorforbruket, og det ble registrert noe varierende klorkonsentrasjoner fra dag til dag. I Cl-lav-karet ble det målt 9,5 µg klor/l i gjennomsnitt (min 5,9 µg/l og maks 14,1 µg/l) gjennom forsøksperioden. I Cl-høy karet ble det målt 23,2 µg klor/l i gjennomsnitt (min: 11,2 µg/l, maks: 30,8 µg/l). En strømstans på grunn av uvær på morgenen den 1. oktober ga et opphold i klordoseringen på 12 timer. pH, konduktivitet, O₂-metning og turbiditet var stabil i alle forsøkskarene gjennom eksponeringsperioden. Temperaturen var synkende gjennom eksponeringsperioden, fra 6,4 °C den 25. september til 2,5 °C den 9. oktober. Laveste registrerte temperatur var 0,8 °C den 7. oktober.

Tabell 4 – Gjennomsnittlige verdier med standardavvik gjennom eksponeringsperioden fra 25. september til 9. oktober. G. s. = *Gyrodactylus salaris*.

Målepunkt	Klor (µg/l) n = 13	Temp (°C) n = 650	pH (-log [H+]) n = 13	H (mS/cm) n = 12	O ₂ -metning (%) n = 12	Turbiditet (NTU) n = 12
Cl-lav innløp	9,5 ± 1,2	4,4 ± 2,25	7,1	37,8 ± 4,4	96,7 ± 4,97	1,0 ± 0,2
Cl-lav avløp	9,3 ± 0,9	-	-	-	-	-
Cl-lav G. s. kar avløp	9,1 ± 1,2	-	-	-	-	-
Cl-høy innløp	23,2 ± 1,4	4,4 ± 2,25	7,1	38,0 ± 4,5	94,7 ± 4,75	1,0 ± 0,2
Cl-høy avløp	22,2 ± 1,4	-	-	-	-	-
Cl-høy G. s. kar avløp	21,9 ± 1,1	-	-	-	-	-
Kontroll	0	4,2 ± 2,25	7,2	37,7 ± 4,7	96,6 ± 5,0	1,0 ± 0,2

3.2 Biologiske undersøkelser

3.2.1 Kondisjonsfaktor

Det var en signifikant reduksjon i kondisjonsfaktoren (k-faktor) hos fisk i alle forsøksgruppene gjennom forsøksperioden (lineær regresjon; p < 0,05). Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor for gruppene per uttak er vist i Tabell 5 og resultater fra lineær regresjonsanalyse er gitt i Tabell 6.

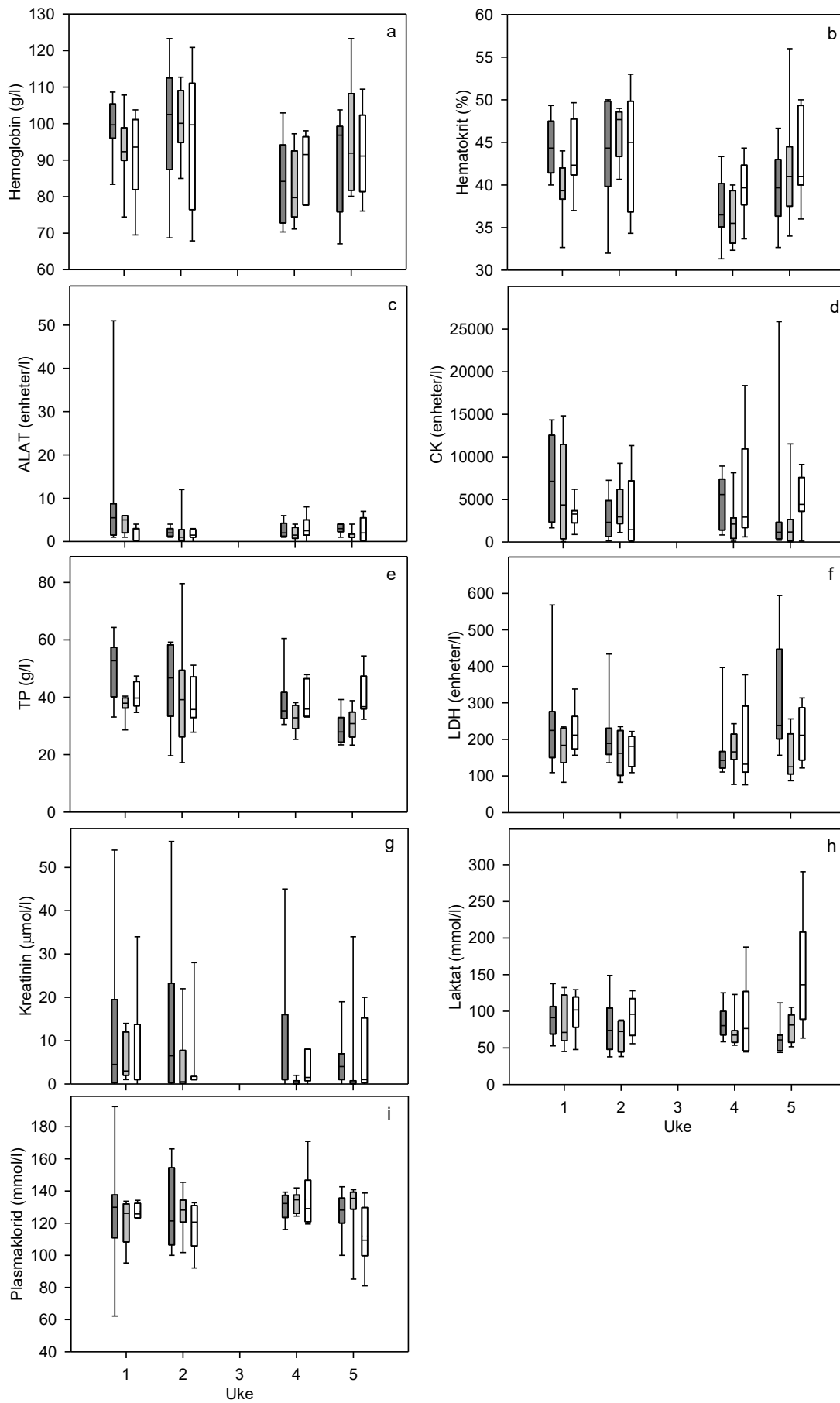
Tabell 5 - Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor ± standardavvik ved hvert prøveuttak for alle forsøksgrupper.

Prøveuttak	Cl-lav	Cl-høy	Kontroll
1	0,71 ± 0,06	0,75 ± 0,05	0,72 ± 0,05
2	0,72 ± 0,04	0,74 ± 0,09	0,74 ± 0,06
3	0,70 ± 0,07	0,72 ± 0,07	0,70 ± 0,08
4	0,64 ± 0,07	0,71 ± 0,08	0,71 ± 0,11

Tabell 6 - Resultater fra lineær regresjon for k-verdi mot prøveuttak (dato) for alle forsøksgrupper gjennom forsøket. Krysningspunkt (intercept), stigningskoeffisient, r² og p-verdi er oppgitt. Statistikkpakke: SigmaPlot for Windows.

Gruppe	Intercept	Slope	r ²	p
Cl-høy	0,786	-0,0162	0,06	< 0,05
Cl-lav	0,773	-0,0231	0,15	< 0,05
Kontroll	0,747	-0,0084	0,02	< 0,05

3.2.2 Blodparametere



Figur 5. Fordeling av verdier for a; hemoglobin, b; hematokrit, c; alanin aminotransferase (ALAT), d; kreatinin kinase (CK), e; totalt protein (TP), f; laktat dehydrogenase (LDH), g; kreatinin, h; laktat og i; plasmaklorid i blodprøver fra laks. Uttak er etter én og to ukers kloresponering (uke 1 og 2) og etter to og tre ukers restitusjon i vann uten klor (restitusjon; uke 4 og 5). Merk forskjellig skala på x-akser. Data er presentert som boks-plot for gruppene CI-høy (mørk grå), CI-lav (lys grå) og kontroll (hvit). Nedre og øvre grense for boksene angir henholdsvis 25 og 75 persentiler. Nedre og øvre grense for 10 og 90 persentiler er vist som horisontale markører ved enden av vertikale linjer. Horisontal heltrukken linje inne i hver boks angir medianverdien.

Hemoglobin

Etter syv dagers kloresponering lå hemoglobinnivået mellom 91 og 99 g/l i de tre forsøksgruppene, og etter ytterligere syv dagers eksponering var det mellom 96 og 100 g/l (Vedlegg; Tabell 1). Det var ingen signifikante forskjeller mellom CI-gruppene og kontrollgruppa. Den statistiske analysen av hemoglobinverdiene viser at det var en signifikant sammenheng med uttak alene, det vil si en forskjell i hemoglobinnivå gjennom forsøksperioden, men det var ingen signifikant sammenheng med gruppe eller kombinasjon av gruppe og uttak. Den signifikante sammenhengen med uttakstidspunkt skyldes en nedgang i hemoglobinverdier over tid i forsøket, og primært de lave målingene ved det tredje uttaket, 14 dager inn i restitusjonsperioden (Figur 5a). Nedgangen i hemoglobinnivå gjaldt for alle de tre gruppene (Figur 5a), men det var ingen signifikant forskjell mellom CI-gruppene og kontrollgruppen ved dette prøveuttaket.

Hematokrit

Etter syv dager kloresponering lå hematokritnivået mellom 40,1 og 44,3 i de tre forsøksgruppene og etter ytterligere syv dagers eksponering var det mellom 43,9 og 46,1 % (Vedlegg; Tabell 1). Det var ingen signifikante forskjeller mellom CI-gruppene og kontrollgruppa gjennom eksponeringsperioden, men som for hemoglobin var det en signifikant sammenheng med prøveuttak. Dette skyldes en nedgang i hematokrit gjennom forsøksperioden, og primært mellom prøveuttak to og tre (Figur 5b). Ved det siste prøveuttaket var imidlertid hematokritverdiene steget noe, og lå mellom 39,7 og 43,3 % (Vedlegg; Tabell 1).

Alanin aminotransferase (ALAT)

Gjennomsnittverdier for alanin aminotransferase (ALAT) varierte gjennom forsøket og lå fra 1,4 til 10,5 enheter/l (Vedlegg; Tabell 1). Ved analyse av hele datamaterialet var det tilsynelatende en signifikant sammenheng både med forsøksgrupper, uttak og kombinasjonen av gruppe og uttak for ALAT. Én fisk skilte seg imidlertid ut med ALAT på 51 enheter/l, og all signifikans bortfaller ved fjerning av denne enkeltmålingen. Verdien på 51 er mer enn 17 ganger høyere enn det øvrige gjennomsnittet av ALAT-verdier, og vi velger derfor å tolke utviklingen i ALAT uten denne enkeltverdien. Det konkluderes derfor med at det ikke er noen signifikant effekt på ALAT-verdier mellom CI-grupper og kontrollgruppe, og det er heller ingen signifikant endring i ALAT gjennom forsøksperioden (Figur 5c).

Kreatinin kinase (CK)

Gjennomsnittsverdier for kreatinin kinase (CK) varierte gjennom forsøket og lå mellom 2359 og 15561 enheter/l (Vedlegg; Tabell 1). Det var ingen signifikant sammenheng i CK med forsøksgrupper, uttak eller kombinasjonen av grupper og uttak.

Totalt protein (TP)

Analysen av totalt protein (TP) viser at det var en signifikant sammenheng med prøveuttak, men ikke med forsøksgrupper eller kombinasjonen av forsøksgruppe og prøveuttak. Den signifikante sammenhengen med uttak indikerer en nedgang i TP over tid i forsøksperioden, og nedgangen synes større for gruppene CI-høy og CI-lav enn for kontrollgruppen (Figur 5e). Det ble derfor gjort en nærmere undersøkelse i form av lineær regresjonstest for TP-verdier mot uttak per gruppe. Denne analysen viste en signifikant nedgang over tid for gruppen CI-høy ($p < 0,001$). Det var imidlertid ingen

signifikant effekt i TP-nivå som følge av uttak for gruppene Cl-lav og kontroll (p-verdier hhv 0,145 og 0,972).

Laktat dehydrogenase (LDH)

Gjennomsnittsnivåene for laktat dehydrogenase (LDH) varierte mellom 154 og 309 enheter/l (Vedlegg; Tabell 1). Det var ikke signifikant endring i LDH-nivåer med tid i forsøksperioden, men det var en signifikant sammenheng med forsøksgruppe, der effekten sannsynligvis skyldes forhøyede LDH-nivå i gruppen Cl-høy ved siste prøveuttak (Figur 5f). Det bemerkes en stor variasjon rundt gjennomsnittene i analysen av LDH (Figur 5f).

Kreatinin

Analysen av verdier for kreatinin viser sammenheng med forsøksgruppe alene, men ikke med prøveuttak eller kombinasjon av gruppe og uttak. Den signifikante sammenheng med gruppe skyldes trolig svært lave verdier for gruppen Cl-lav i restitusjonsperioden (Figur 5g). Det bemerkes en stor variasjon rundt gjennomsnittet for kreatinin (Figur 5g).

Laktat

Gjennomsnittsverdier for laktat varierte noe gjennom forsøket, og spesielt i kontrollgruppen der det var en økning i gjennomsnittlig laktatnivå fra 106 mmol/l ved tredje prøveuttak til 150 mmol/l ved fjerde prøveuttak (Vedlegg; Tabell 1). Analysen av verdier for laktat viser signifikant sammenheng med gruppe alene og med kombinasjonen gruppe og uttak, men ikke med uttak alene. De signifikante effektene skyldes en økning i laktat-verdier for kontrollgruppen utover forsøket, og med den forhøyede verdier mot slutten av forsøket (Figur 5h).

Plasmaklorid

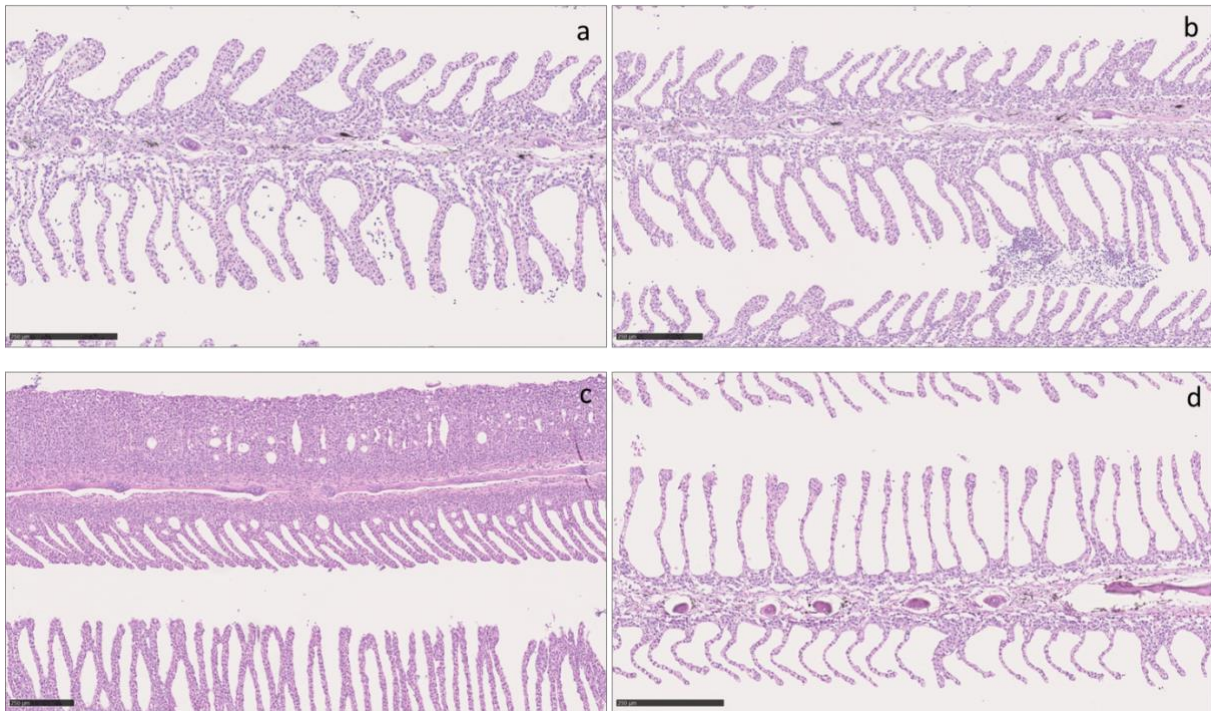
Gjennomsnittsverdiene for plasmaklorid var relativt stabil gjennom hele forsøksperioden i gruppen Cl-høy, der konsentrasjonen varierte mellom 126,5 og 130,6 mmol/l (Vedlegg; Tabell 1). Det var noe større variasjon fra uttak til uttak i gruppen Cl-lav (min = 116,3 og maks = 133,2 mmol/l) og kontroll (min = 112,1 og maks = 127,3 mmol/l) (Vedlegg; Tabell 1). Det var ingen signifikant sammenheng med verken gruppe, uttak eller kombinasjonen av de to for plasmaklorid. Det er imidlertid interessant å merke seg at gjennomsnittsverdien for plasmaklorid, på samme måte som for laktat, var svært lav (112,1 mmol/l) i kontrollgruppen ved siste prøveuttak (Figur 5i).

3.2.3 Histopatologiske vurderinger av gjeller

Forsøksfisken var stor, voksen laks som hadde oppholdt seg i havet over ett til flere år. Likevel ble det observert kun sparsomme histopatologiske forandringer i gjellene til denne fisken. Gjeller fra fisk i forsøksgruppe Cl-høy, som var eksponert for kloramin i to uker, viste ingen spesielle forandringer sammenlignet med fisk fra kontrollgruppen ved samme prøveuttak. Ved siste prøveuttak, der forsøksfisken var holdt i vann uten klortilsetning i tre uker, var det samme status; ingen synlige forskjeller mellom gruppene Cl-høy og kontroll. Det var imidlertid en tendens til økt grad av hyperplasi og sammenvoksinger av lameller i kontrollgruppa ved det siste prøveuttaket. Her hadde 3 av 8 fisk uttalt overvekst av overflateceller og sammenvokste lameller (Figur 6c). Det ble også observert områder i gjellen med sammenklistrede filamenter (Figur 6a og Figur 6b) hos enkeltfisk i begge de undersøkte forsøksgruppene, men antallet individer med disse forandringene fordelte seg jevnt mellom kloreksponert gruppe og kontrollgruppen. Noe clubbing³ og lifting⁴ ble observert, og hyppigheten av disse observasjonene var også jevnt fordelt mellom forsøksgrupper og prøveuttak.

³ Fortykkelse i tuppen av sekundærlamellene (kan være mange årsaker).

⁴ Mellomrom mellom epitelet på sekundærlamellene og karene under.



Figur 6. Bilde a fra fiskegjelle i gruppe CI-høy og bilde b fra fiskegjelle i kontrollgruppen, ved prøveuttak etter 14 dager eksponering. Begge bildene viser eksempler på sammenklistrede filamenter. Bilde c er fra fiskegjelle i kontrollgruppen ved siste prøveuttak og viser eksempel på et område med høy grad av hyperplasi og sammenvoksinger av lameller. Bilde d viser eksempel på friske gjeller og er fra fisk i kontrollgruppen ved prøveuttak etter 14 dager eksponering.

3.3 Effekt på *Gyrodactylus salaris*

Startinfeksjonen for *G. salaris* var høy på de laksungene som ble eksponert for kloramin, med gjennomsnittlig 1717, 1698 og 1943 *G. salaris* per fisk i henholdsvis gruppene CI-høy, CI-lav og kontroll (Tabell 7). Ved avslutning av eksponeringsperioden var det tilbake en enkelt infisert laksunge i kontrollgruppen, og denne var infisert med 940 *G. salaris*. I gruppen CI-lav var det tilbake to laksunger med henholdsvis 5 og 17 *G. salaris*. I gruppen CI-høy var to laksunger infisert med henholdsvis 1 og 7 parasitter på dag seks. Ved neste undersøkelse, på dag ni, var begge disse laksungene fri for *G. salaris*.

Tabell 7 - Gjennomsnittlig antall *G. salaris* ved angitt dag i forsøket for gruppene CI-høy, CI-lav og kontroll. Antall laks i hver gruppe på undersøkelsestidspunktet er angitt i parentes.

	Dag 0	Dag 2	Dag 4	Dag 6	Dag 9	Dag 13
CI-høy	1717 (3)	847 (3)	175 (3)	4 (2)	0 (2)	
CI-lav	1698 (5)	735 (5)	336 (5)	163 (5)	88 (5)	11 (2)
Kontroll	1943 (3)	1397 (3)	913 (3)	1073 (3)	1325 (2)	940 (1)

4 Diskusjon

Det overordnede målet med Gyroklorprosjektet er å utrede om klorforbindelser kan brukes som behandling mot *G. salaris* i store laksevassdrag, uten å ta livet av fisken. Effekter av kloramineksposering på stor, voksen villaks er oss bekjent ikke studert tidligere, og det var derfor usikkert hva som kunne forventes av tålegrenser.

Dette forsøket har vist at stor, voksen laks fra Driva kan eksponeres for 23 µg klor/l over en periode på 14 døgn uten at fisken påvirkes i vesentlig negativ grad. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom fisken i de kloreksponte forsøksgruppene og kontrollgruppa som var holdt i vann uten klortilsetning, verken for ulike blodparametere eller ved histopatologiske undersøkelser av gjeller. Det var heller ingen visuelle forskjeller i adferd mellom forsøksgruppene under kloreksposering.

I løpet av forsøksperioden døde totalt tre fisk i fysiologiforsøket. De tre var fordelt med én fra hver forsøksgruppe. Årsaken til at disse fiskene døde er ikke kjent. Det er imidlertid ikke unormalt at enkeltindivider av stor, voksen atlantisk laks i gytestadium dør i norske elver, og dødeligheten var også innenfor det som er observert som normalt i fangsthuset (Inger Helene Hagen, pers. medd.). Det er derfor rimelig å konkludere med at kloreksposeringen ikke medførte dødelighet ut over hva som er normalt ved hold av laks under de rådende omstendighetene.

Klor er et oksidasjonsmiddel som kan ha en korrosiv virkning på biologiske overflater, for eksempel på fiskegjeller. Dette antas å kunne medføre fysiologiske og biokjemiske responser i blodet samt fysiske endringer i gjelleoverflaten. Blodparametere som ble analysert i forsøket var valgt ut for å studere eventuelle effekter av kloreksposering på fiskens vann og saltbalanse (plasmaklorid), respirasjon (laktat og hematokrit), nivå av røde blodceller (hematokrit og hemoglobin) og avfallsstoff (kreatinin). I tillegg ble det undersøkt for forandringer i utvalgte enzymer som representerer viktige organsystemer i fisken (ALAT, CK, LDH). Hematologiske, fysiologiske og histopatologiske undersøkelser er effektive metoder for å påvise toksiske effekter på et tidlig stadium i fisk (Banaee mfl. 2008). Slike forandringer indikerer toksisk stress, spesielt i blod og i blodproduserende organer (Rahman & Siddiqui 2006).

Plasmaklorid er en viktig elektrolytt som bidrar til å opprettholde en osmolaritet i blodplasma hos laks i ferskvann på ca. 300 mOsm/l. Plasmakloridnivået er derfor en god indikator på status for vann-saltbalansen i fisken. I ferskvann er laks hyperosmotisk i forhold til vannet og må ta opp ioner for å opprettholde et stabilt nivå av plasmaklorid. Dette opptaket/reguleringen foregår i all hovedsak i gjellene, og forandringer/skader i gjellene, for eksempel i cellemembranen, vil raskt komme til uttrykk i redusert nivå av plasmaklorid (Gensemer & Playle 1999). Det var derfor relevant å undersøke om plasmakloridnivået endret seg i gruppene Cl-lav og Cl-høy gjennom forsøket, sammenlignet med kontrollgruppen. Det ble ikke observert signifikante forskjeller mellom gruppene av klorekspont laks og kontrollgruppa, og dette tolkes som at klor ikke har påvirket laksens evne til å regulere nivået av Cl⁻ i blodplasma. Det ble imidlertid observert en variasjon i plasmakloridnivå i enkeltgrupper gjennom forsøket, men gjennomsnittsverdier i alle prøveuttak lå innenfor det som er beskrevet som normalverdier for laks i ferskvann (111-135 mM) (Evans 1979, 1993, Arnesen mfl. 1998, Handeland mfl. 1998, Handeland mfl. 2000, Iversen mfl. 2009, Iversen & Eliassen 2012). Det var heller ingen trender i denne variasjonen, og vi kan konkludere med at kloreksposeringen ikke påvirket plasmakloridnivået til fisken i forsøket.

Røde blodceller er den vanligste typen blodceller og utgjør 44-49 % av blodvolumet i oppdrettslaks (Sandnes mfl. 1988). Røde blodceller inneholder hemoglobin som er et protein som frakter oksygen rundt i fiskekroppen. Innenfor humanmedisin er det vist at kloramin fra drikkevann kan 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 også at røde blodceller som ble eksponert for kloramin fikk kortere levetid. Andre forsøk (Buckley mfl. 1976) har rapportert at hemolytisk anemi også kan forekomme i fisk som følge av kloramineksponering. Hagen mfl. (2019b) indikerer for eksempel at kloramineksponering kan gi redusert hematokrit hos laksunger med alder 1+ og 2+. Det ble derfor valgt å undersøke for både hematokrit og hemoglobin ved kloramineksponeringen.

Hematokritverdiene hos fisken i alle forsøksgruppene var lav gjennom hele forsøksperioden, og hovedsakelig lavere enn det som er beskrevet som normalverdier for oppdrettslaks. Det var også en tendens til nedgang i hematokrit mot slutten av forsøket. På samme tid ble det også observert en nedgang i hemoglobin hos forsøksfisken. Til tross for et noe lavt hematokritnivå og synkende hematokrit og hemoglobinnivå gjennom forsøket, var det ingen signifikant forskjell mellom kloresponerte grupper og kontrollgruppen. Det er derfor sannsynlig at lav- og redusert hematokrit og hemoglobin ikke skyldes kloramineksponeringen. Lav hematokrit kan ha flere årsaker, men i dette forsøket er det nærliggende å knytte nivåene til fiskens dårlige ernæringsstatus. Studier har vist at fisk som ikke spiser vil kunne få reduserte hematokritverdier i løpet av noen uker (Foda 1975, El-Mowafi mfl. 1997). Mangel på næringstilgang kan også gi redusert evne til nyproduksjon av røde blodceller, noe som er vist å kunne være relatert til mangel på sporstoffene jern (Fe) eller kobber (Cu) (El-Mowafi mfl. 1997). Forsøksfisken var gytemoden laks og dermed i et livsstadium der næringsinntaket er lavt. Fisken var også holdt i kar uten føring i flere uker før forsøksstart og hadde lav og avtagende k-faktor i forsøksperioden. Dette styrker antakelsen om at redusert næringsstatus er årsaken til de lave hematokrit- og hemoglobinnivåene.

Alanin aminotransferase (ALAT) er et enzym som først og fremst finnes i lever og leverceller. Ved leversykdom med celledød, er det godt samsvar mellom konsentrasjonen av ALAT i blodet og mengden skadet vev. Det var derfor forventet å finne forhøyede verdier av ALAT i blodet til forsøksfisken hvis kloresponeringen førte til skader på leverceller. Nivået for ALAT var imidlertid ikke signifikant høyere i de kloresponerte gruppene enn i kontrollgruppa, og det kan derfor fastslås at eksponeringen ikke påførte forsøksfisken leverskader. Sandnes mfl. (1988) oppgir et ALAT-nivå på 4-8 enheter/l som referanseområdet for frisk oppdrettslaks. I vårt forsøk varierte gjennomsnittlig ALAT-nivå fra 1,6 til 10,5. Vårt forsøk ble gjennomført med villaks der hvert individ hadde ulik bakgrunn, for eksempel svært forskjellig tid i sjø før tilbakevandring til Driva. Størrelsen på fisken var også svært forskjellig, men variasjonen var tilnærmet lik innenfor forsøksgruppene. I tillegg ble forsøket gjennomført i gyteperioden for laks og individene var i ulik fase i forhold til gytetidspunkt. Dette er faktorer som kan ha bidratt til variasjon i ALAT mellom individer gjennom forsøksperioden.

Nivået av totalt protein (TP) avtok gjennom forsøksperioden i begge de kloresponerte gruppene, og nedgangen var signifikant i gruppen Cl-høy. Ved begge prøveuttakene, under selve kloresponeringen, var imidlertid TP-nivået innenfor referanseområdet for oppdrettslaks på 41,6 - 56,6 g/l (Sandnes mfl. 1988). Det kan også nevnes at TP-nivået i kontrollgruppen var relativt stabilt i forsøksperioden, men at det lå under referanseområdet i tre av fire prøveuttak. Redusert nivå av TP er vist å forekomme ved sulting, malabsorpsjon og feilernæring (Pagana & Kathleen Deska 1998). Forsøksfisken i vårt forsøk var stor, voksen gytefisk, og altså i et livsstadium og miljø med dårlig tilgang på mat. Fisken hadde i tillegg gått lenge i kar uten næringstilgang og underernæring er en sannsynlig årsak til lavt og synkende TP-nivå.

Laktat dehydrogenase (LDH) er en uspesifikk indikator på vevsskade, og i mennesker vil forhøyede verdier kunne forekomme ved akutt celledød i lever, lunger, nyrer og muskulatur. LDH er et enzym som finnes i nesten alle kroppens celler og inngår i nedbrytingen av glukose til pyruvat og laktat. Dersom cellene er skadet eller dør vil det løselige enzymet lekke ut og komme over i blodet (Banaee 2008). LDH kan også være en indikator på gjellesykdom (Khazraia mfl. 2000). Det var en signifikant

forskjell i LDH-nivå mellom gruppene, der dette sannsynligvis skyldes forhøyede LDH-nivå i gruppen CI-høy ved siste prøveuttak, tre uker etter endt kloreksporing. Det kan ikke utelukkes at forhøyet LDH-nivå skyldes kloreksporingen, og da eventuelt som en forsinket respons. Andre studier har imidlertid vist at LDH responderer raskt i fisk ved kjemisk eksponering (Banaee mfl. 2008), og en slik rask respons ble ikke observert i vårt forsøk. Hemolyse kan være en mulig usikkerhet ved LDH-analysen i denne studien. Røde blodceller inneholder gjennomsnittlig 160 ganger så mye LDH som plasma og synlig hemolyse kan gi et positivt avvik på 25 – 50 enheter/l. Enkelte prøver i vårt forsøk hadde en viss grad av hemolyse, og dette kan ha påvirket resultatet. Det var imidlertid ingen forskjeller i hemolysegrad mellom prøvene fra kloreksponte grupper og kontrollgruppa, og prøvene er derfor vurdert som sammenlignbare.

Kreatinin kinase (CK) er et enzym som finnes i høyest konsentrasjon intracellulært i skjelett- og hjertemuskelatur, og i blodceller. Enzymet spalter kreatinfosfat til kreatinin, fosfat og vann. Normalt finnes CK i lav konsentrasjon i blodet, men kan stige, for eksempel ved muskelskade. Det var ingen signifikant sammenheng i CK med forsøksgrupper, uttak eller kombinasjonen av grupper og uttak. Kreatinin er et avfallsprodukt som produseres med en relativt konstant rate. Produksjonen er avhengig av muskelmassen, mens det daglige inntaket av føde har relativt liten betydning. Kreatinin skiller ut ved glomerulær filtrasjon i nyrene, og kreatinin anses som godt egent til å vurdere fysiologisk status fordi produksjons- og utskillelsesraten er relativt konstant hos det enkelte individ. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i utvikling av kreatinin-nivå gjennom forsøksperiode, eller mellom forsøksgruppene. Kreatinin varierte mye innad i hver forsøksgruppe i form av svært lave verdier for de fleste fiskene (0-2 $\mu\text{mol/l}$), men der enkeltfisk hadde nivåer av kreatinin på 30-56 $\mu\text{mol/l}$. Referanseområdet for oppdrettslaks er oppgitt til å være 26–46 μmol (Sandnes mfl. 1988). Nivåene av kreatinin var betydelig lavere i vårt forsøk, men trenden med mange lave og noen få høye verdier gjaldt for både kloreksponte grupper og kontrollgruppen. Det er derfor ikke mulig å konkludere med om kloreksporingen hadde en effekt på kreatinin-nivået i dette forsøket.

Konsentrasjonene av klor var stabile i begge karene med klortilsetning med gjennomsnittsverdier på henholdsvis 9,5 og 23 $\mu\text{g/l}$ i innløpsvannet og 9,3 og 22 $\mu\text{g/l}$ i avløpsvannet. Vannprøvene fra innløpsvannet ble tatt i karene like etter at det klortilsatte vannet hadde blandet seg i det horisontale røret som sørget for sirkulær og stabil vannstrøm i forsøkskarene. Klor tilsatt fra stamløsningen og vann fra Driva hadde dermed fått noen sekunder til å reagere før vannprøven ble tatt. Differansen mellom tilsatt klorkonsentrasjon og målt konsentrasjon i innløpsvannet viser at det var et gjennomsnittlig momentant klorforbruk på 69 % i løpet av de første sekundene. Resterende klorkonsentrasjon holdt seg deretter stabil over en tidsperiode på 90 minutter, som var oppholdstiden på vannet i de store karene. Vannkvaliteten i Driva, med relativt høy pH (7,2) og lite løst organisk karbon (DOC, 1,4 mg/l) er trolig hovedårsaken til den lave/langsomme nedbrytningen av klor, men den lave temperaturen har nok også bidratt.

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). I tidligere studier med laks og lave konsentrasjoner av kloramin er det observert antydninger til patologiske forandringer på gjellene til fisken (Hagen mfl. 2018). Det finnes imidlertid også studier av laks og kloramineksponering uten observasjon av patologiske forandringer (Hagen mfl. 2019b). I Hagen mfl. (2019b) ble gjellene til klorekspont fisk vurdert som helt friske. Begge de nevnte studiene ble gjort med laksunger (alder 1+ og 2+). I vårt forsøk med stor, voksen laks ble det ikke påvist patologiske forandringer som kan relateres til kloreksporingen. Dette viser at kloreksporing for inntil 23 μg klor/l i en periode på 14 dager ikke påvirker gjellestrukturen hos laks negativt. Eventuelle endringer i slimlaget på gjellene kan imidlertid ikke utelukkes da dette ikke kan påvises med histopatologiske undersøkelser av gjeller som er fiksert med formalin.

I tilfelle klorkonsentrasjonen i gruppen Cl-høy skulle vise seg å være for høy, med store negative effekter på fisken tidlig i forsøket, ble laksunger (alder 0+) infisert med *G. salaris* eksponert for det samme klorholdige vannet som den store fisken. Dette ble i hovedsak gjort for å sikre dokumentasjon av kloreffekt på *G. salaris*, gitt at forsøket måtte avbrytes på et tidlig tidspunkt. Hensikten med *Gyrodactylus*-undersøkelsene var derfor å sikre data til videre bruk i utviklingen av Klormetoden, og ikke å studere intensiteten av parasittinfeksjonen i detalj over tid. Laksungene som ble fanget i Driva var små, hadde svært høye infeksjoner med *G. salaris* og hadde dårlig kondisjon og helsetilstand ved forsøksstart. Bedøving og håndtering av laksungene i forbindelse med *Gyrodactylus*-undersøkelsene påførte en ekstra belastning, og dødelighet ble registrert i alle forsøksgruppene gjennom forsøket. Når enkeltfisker døde i forsøksperioden, ble også *G. salaris*-individene som var festet til denne fisken fjernet fra forsøket. Dermed faller grunnlag for å vurdere en detaljert endring i antall parasitter mellom prøveuttak bort. Det ble allikevel registrert en kraftig nedgang i parasittantall på enkeltfisker gjennom forsøket, og i Cl-høy var infeksjonen redusert til 0,2 % etter 6 dager (n = 2 fisk). Ved forsøkets slutt var *G. salaris*-infeksjonen redusert til henholdsvis 0,7 % og 0 % av startinfeksjonen i gruppen Cl-lav og Cl-høy. I kontrollgruppen holdt antallet *G. salaris* seg relativt stabilt på enkeltfisk, men på grunn av dødelighet og kun én laksunge igjen ved siste undersøkelsestidspunkt, kan ikke utviklingen vurderes.

Tidligere forsøk med kloramin og *G. salaris* (Hagen mfl. 2014, 2018) har vist at parasitten forsvinner fra laksunger etter 2-6 dager ved eksponering for 7-18 µg aktivt klor/l. Effekten på *G. salaris*-populasjonen i vårt forsøk, var derfor noe lavere enn det som er vist i de nevnte studiene. Årsaken til dette er ikke kjent, men den lave temperaturen i forsøksperioden kan være en forklaring på forsinket effekt. Det er rapportert at kloramins effekt som desinfeksjonsmiddel blir lavere ved lav temperatur. Butterfield & Wattie (1946) fant at eksponeringstiden som skulle til for å eliminere ulike bakterier var opp til 9 ganger lenger ved temperaturer på 2-6 °C enn ved 20-25 °C. Videre måtte kloraminkonsentrasjonen være opp til 4 ganger høyere ved den laveste temperaturen for å oppnå samme effekt ved samme eksponeringstid. Når *E. coli* ble eksponert for samme kloraminkonsentrasjon ved pH 7,0 og pH 8,5, måtte eksponeringstiden være 2-6 ganger lengre ved pH 8,5 for å eliminere bakteriene. Ward mfl. (1984) fant at inaktiveringsraten av ulike bakterier økte med en faktor på 5-6 når pH ble senket fra 8 til 6. Bakterier virker derfor å ha en høyere toleranse for kloramin under pH-betingelser som gjør kjemikaliet mer stabilt. Erfaringene fra dette forsøket kan tyde på at lav temperatur også reduserer effekten av kloramin på *G. salaris*. pH var høyere enn i forsøket i Batnfjordselva, men på samme nivå eller lavere enn under forsøk med vann fra Drammenselva/Glitra. Det kan også være at tålegrensene til fisk for kloramin varierer med temperatur og pH. De registrerte effektene på *G. salaris* i forsøket anses som verdifull kunnskap for den videre utviklingen av klormetoden, og betydningen av vanntemperatur vil trolig bli testet ut i Driva i 2020 under andre temperaturbetingelser.

5 Konklusjon

Dette forsøket har bidratt med viktig kunnskap om effekt av kloreksponeing på *G. salaris* og på stor, voksen villaks. Forsøket bekrefter at parasitten er svært følsom for klorforbindelser, og at stor laks tolererer eksponering i 14 dager for doser av klor som fjerner parasitten på seks dager. Kloreksponeingen førte ikke til signifikante effekter, verken for ulike blodparametere eller ved histopatologiske undersøkelser av gjeller. Det var heller ingen visuelle forskjeller i adferd mellom forsøksgruppene under kloreksponeingen. Forsøket har dermed vist at ved lav vanntemperatur og nær nøytral pH kan stor, voksen laks fra Driva eksponeres for 23 µg klor/l over en periode på 14 døgn uten at fisken påvirkes i vesentlig negativ grad. Dette indikerer en god fleksibilitet med tanke på dosering av kloramin til et vassdrag under en eventuell behandling mot *G. salaris*, og at lokale variasjoner med forhøyede klorkonsentrasjoner lokalt i elva kan tolereres av fisken.

6 Referanser

- Anon (2014). Handlingsplan mot lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* for perioden 2014-2016. Miljødirektoratet 2014. 114 s.
- 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, pp. 351-367.
- Bardal, H., Sandodden, R., Stensli, J.H. (2008) Tiltak mot *Gyrodactylus salaris* i Lærdalsregionen i 2008. Veterinærinstituttets rapportserie 10-2009. Oslo: Veterinærinstituttet; 2009. 24 s
- 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: pp. 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): pp. 48-50.
- Butterfield, C. T. & Wattie, E. (1946). Influence of pH and Temperature on the Survival of Coliforms and Enteric Pathogens When Exposed to Chloramine. *Public Health Reports (1896-1970)*, 61(6), pp. 157-192.
- Clark, T.D., Eliason, E.J., Sandblom, E., Hinch, S.G. & Farrell, A.P. 2008. Calibration of a hand-held haemoglobin analyser for use on fish blood. *Journal of Fish Biology*, 73, pp. 2587-2595.
- 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; pp. 73–80.
- Eriksen, T. E. (2018). Korttidseffekter på elvelevende bunnfauna av kloraminbehandling mot parasitten *Gyrodactylus salaris* i Glitra. NIVA-rapport 7237-2018. 28 s.
- Evans, D. H. (1979). Fish. In: Maloiy, G. M. O. (ed.) *Comparative physiology of osmoregulation in animals*, Vol. 1. Academic Press, London, pp. 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. 12 s.
- From, J. (1980). Chloramine-T for control of bacterial gill disease. *Prog. Fish-Cult* 42: pp. 85-86.
- Grande, M., Muniz, I.P. & Andersen, S. (1978). Relative tolerance of some salmonids to acid waters. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20, pp. 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, pp. 1003-1011.
- Hagen, A.G., Hytterød, S., Olstad, K., Garmo, Ø.A., Darrud, M., Holter, T.H., Svendsen, J., Mo, T.A., Escudero, C., Martinez-Frances, E. & Gjessing, M. (2018). Forsøksbehandling med monokloramin mot *Gyrodactylus salaris* i elva Glitra. NIVA- rapport 7238-2018. 26 s.
- Hagen, A.G., Hytterød, S., Olstad, K., Garmo, Ø.A., Darrud, M., Holter, T.H. & Martínez-Francés, E. (2019a). Utvikling av klormetoden mot *Gyrodactylus salaris* - feltforsøk i Batnfjordelva. NIVA- rapport 7359-2019. 44 s.
- Hagen, A.G., Hytterød, S., Olstad, K., Garmo, Ø., Darrud, M., Holter, T., Martínez-Francés, E., Höglund, E., Uhlig, S., Fæste, C.K., Ivanova, L. & Gjessing, M. (2019b). Effekter på laks (*Salmo salar*) ved eksponering for monokloramin. NIVA-rapport 7358-2019. 37 s.
- 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: pp. 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: pp. 377-396.
- Hytterød, S., Fornes, G. J., Larsen, S., Mohammad, S. N., Darrud, M., Rolén, E., Welde, H. I., Svendsen, J., Soleim, K. B. and Hansen, H. (2020). The surveillance programme for *Gyrodactylus salaris* in Atlantic salmon and rainbow trout in Norway 2019. Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual report 2019. Oslo: Norwegian Veterinary Institute 2020. 6 s.
- 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, pp. 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. 54 s.
- Jensen, E.A. & Leivstad, H. (1989). Surt vann og smoltproduksjon. Sluttrapport fra Vannbehandlingsprosjektet Salar/BP 1984-87, 82s.
- Khazraiiinia, P., Payghan, R., Azari Takami, Gh., (2000). Studies on the effect of experimental acute ammonia toxicity on serum enzymes, urea and cholesterol in common carp. *Journal of Veterinary department of Tehran University*. 55 (3), pp. 29 -32.
- Kruse, C. & Sordyl, H. (1988). Bestimmung der Mittleren Lebenszeit von Erythrozyten bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* R.) mittels Cr51-markierung, *Wiss. Z. Wilhelm-Pieck-Univ., Rostock. Naturwiss. R.*, 1988, vol. 37, pp. 93-96.
- 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. 36 s.
- Pagana and Kathleen Deska, 1998. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. (1998). St. Louis: Mosby, Inc.
-

- Pettersen, R.A., Hytterød, S., Mo, T.A., 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. (2007). Kjemisk behandling mot *Gyrodactylus salaris* i Lærdalselva 2005/2006 – Sluttrapport (2007) NIVA- rapport 5349-2007. 27 s.
- Polèo, 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, pp. 193-203.
- Polèo, 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, pp. 129-139.
- 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.
- 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. 105 s.
- 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, pp. 391-402.
- Thorburn, M.A. & Moccia, R.D. (1993). Use of chemotherapeutics on trout farms in Ontario. Journal of Aquatic Animal Health, pp. 5:85-91.
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Ward, N.R., Wolfe, R.L. & Olson, B.H. (1984). Effect of pH, application technique, and chlorine-to-nitrogen ratio on disinfectant activity of inorganic chloramines with pure culture bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 48, pp. 508–514.
- 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].

Vedlegg

Vedlegg; Tabell 1 - Blodverdier (gjennomsnitt ± sd og n) for alle forsøksgrupper ved prøveuttak 1-4.

Gruppe	Uttak	Hemoglobin; g/l*			Hematokrit; %			ALAT u/l			CK u/l			TP g/l			LDH U/l			Kreatinin µmol/l			Laktat mmol/l			Klorid mmol/l		
		Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n	Snitt	SD	n
Cl-høy	1	99,0	7,74	8	44,3	3,31	8	10,5	16,63	8	7455	4958	8	49,5	10,53	8	248,8	141,91	8	12,8	18,54	8	90,4	26,94	8	127,4	36,16	8
	2	100,0	17,20	8	43,9	6,25	8	2,3	1,04	8	2864	2515	8	44,7	14,70	8	216,3	94,35	8	14,1	19,19	8	79,8	38,41	8	128,9	24,69	8
	3	84,3	11,44	8	37,3	3,70	8	2,6	1,85	8	4836	3031	8	38,7	9,66	8	170,9	93,51	8	8,9	16,22	8	84,6	21,87	8	130,6	8,19	8
	4	89,6	13,66	8	39,7	4,58	8	3,0	1,07	8	4202	8796	8	28,8	5,42	8	309,1	154,48	8	5,6	6,37	7	63,4	21,52	8	126,5	13,07	8
Cl-lav	1	93,3	10,40	7	39,7	3,67	7	4,0	2,00	7	6214	5685	7	37,1	4,04	7	175,0	56,82	7	5,6	5,19	7	82,5	32,67	7	120,4	13,96	7
	2	100,2	9,04	8	46,1	3,16	8	2,5	3,96	8	4032	2719	8	41,1	19,02	8	163,4	58,43	8	4,3	7,94	8	67,2	20,55	8	126,7	12,75	8
	3	82,4	9,52	8	36,1	3,00	8	1,8	1,47	6	2359	2582	8	32,7	4,53	8	171,0	51,08	8	0,4	0,74	8	72,2	21,77	8	133,2	6,26	8
	4	95,6	15,48	8	42,0	6,69	8	1,4	1,19	8	2388	3820	8	31,3	5,33	7	153,8	62,09	8	4,4	11,98	8	78,2	19,45	8	129,1	18,25	8
Cl-kontroll	1	91,0	11,58	8	43,4	4,21	8	2,1	1,55	8	3263	1527	8	40,7	4,50	8	223,0	59,45	8	7,1	12,41	8	97,4	27,07	8	127,3	4,50	8
	2	96,1	18,75	8	44,3	6,81	8	1,6	1,06	8	3217	4378	8	38,2	8,26	8	172,9	42,77	8	4,5	9,50	8	92,0	26,49	8	118,2	14,70	8
	3	89,5	8,45	7	39,6	3,47	7	3,2	2,71	6	5900	6688	6	38,7	6,63	6	183,8	113,45	6	3,3	3,67	6	89,7	53,19	6	134,8	19,27	6
	4	91,2	11,64	8	43,3	5,39	8	2,8	2,71	8	5051	2833	8	40,3	7,65	8	213,3	71,42	8	6,3	8,28	8	150,4	75,18	8	112,1	19,73	8

Vedlegg; Tabell 2 - Statistiske tester av biologiske analyser

Hematokrit						Laktat dehydrogenase					
Analysis of Variance Table						Analysis of Variance Table					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Gruppe	2	53,27	26,637	1,1858	0,3107	Gruppe	2	1,4541	0,72705	4,6242	0,01254 *
Uttak	3	620,62	206,872	9,2091	2,56E-05 ***	Uttak	3	0,8701	0,29002	1,8446	0,14565
Gruppe:Uttak	6	167,28	27,88	1,2411	0,2941	Gruppe:Uttak	6	1,0902	0,18171	1,1557	0,33829
Residuals	82	1842,03	22,464			Residuals	81	12,7355	0,15723		
Hemoglobin						Kreatinin					
Analysis of Variance Table						Analysis of Deviance Table					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Df	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
Gruppe	2	21,9	10,96	0,069	0,93335	NULL			91	114,34	
Uttak	3	2261	753,65	4,7457	4,21E-03 ***	Gruppe	2	7,4283	89	106,91	0,02438 *
Gruppe:Uttak	6	674,9	112,49	0,7083	0,643781	Uttak	3	4,1047	86	102,8	0,25038
Residuals	82	13022,2	158,81			Gruppe:Uttak	6	6,3331	80	96,47	0,38693
Alanin aminotransferase						Laktat					
Analysis of Deviance Table						Analysis of Variance Table					
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
NULL			90	132,901		Gruppe	2	20327	10163,6	8,145	0,000598 ***
Gruppe	2	13,203	88	119,698	0,001359 **	Uttak	3	4299	1432,9	1,1483	0,3347252
Uttak	3	17,125	85	102,573	0,000666 ***	Gruppe:Uttak	6	19257	3209,4	2,572	0,024839 *
Gruppe:Uttak	6	13,748	79	88,826	0,032586 *	Residuals	81	101075	1247,8		
Kreatinin kinase						Klorid					
Analysis of Deviance Table						Analysis of Variance Table					
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
NULL	92	119,48				Gruppe	2	663,5	331,77	1,0244	0,3636
Gruppe	2	1,1161	90	118,36	0,5723	Uttak	3	1225,5	408,51	1,2613	0,2932
Uttak	3	2,9647	87	115,4	0,3971	Gruppe:Uttak	6	1583,6	263,93	0,8149	0,5615
Gruppe:Uttak	6	7,1111	81	108,29	0,3107	Residuals	81	26233,9	323,88		
Total protein											
Analysis of Variance Table											
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)						
Gruppe	2	395,6	197,81	2,1557	0,1225						
Uttak	3	1232,6	410,88	4,4776	0,00587 **						
Gruppe:Uttak	6	1160,5	193,41	2,1077	0,06134 .						
Residuals	80	7341	91,76								

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 samfunnsniv.



Norsk institutt for vannforskning

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