

Ferskvannsbehandling mot lakselus – laboratoriumsforøk med adult lus

Jon Anders Stavang, Lars A. Hamre, Frank Nilsen

Sea Lice Research Centre, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen

1. Samandrag

Ei rad med laboratorieforsøk er gjennomført for å sjå kva effekt ferskvatn har på vaksne lakselus. Ein har i tillegg underøkt om pH og CO₂ kan påverke overleving. Forsøka viste at ein har 13 – 44 % effekt av ferskvatn etter 4 timar. Effekten av 24 timar eksponering for ferskvatn var mellom 44 og 77 % tap. CO₂ og pH hadde ingen signifikant effekt på lusetap når desse verdiane er innafor det som er fysiologisk forsvarleg for laksen.

Forsøka viser at det er låg effekt av ferskvatn etter 4 timars eksponering og 24 timars behandling i ferskvatn gir moderat effekt. Dette peikar på at kort eksponering (fire timar) for ferskvatn ikkje åleine er effektivt nok som behandlingsmetode mot lakselus.

Summary in English:

Several experiments were conducted in order to assess the toxic effect of fresh water (FW) on adult *L. salmonis*. The results demonstrated an effect from 13 – 44 % after 4 hours of FW treatment and 44 to 77 % lice loss after 24 hours treatment. The additional effect of CO₂ and pH was also assessed but no significant increase in lice loss was observed when these values were within safe range for the host.

The present study did not reveal any strong short term (four hour) effect after FW exposure to adult salmon lice and other additional stressors are probably required in order to get a high effect.

2. Innleiing

Lakselus er ein strengt marin parasitt som er tilpassa eit liv i fullt sjøvatn. Sidan lakselus er vanleg på sjøaure som lever i fjordstrok må lakselus klare korte opphald i ferskvatn/brakkvatn når verten av ulike årsaker kjem inn i slike habitat. Hahnenkamp og Fyhn (1985) gjennomførte studiar av osmoregulering hos lakselus ved ulike osmolaritetar. Dei fann at lakselus som ikkje sit på verten har liten evne til å osmoregulere og dei dør raskt i ferskvatn.

Når vaksne lakselus var på verten fann dei at evna til osmoregulering var langt betre og dei kunne overleve mange dagar i fullt ferskvatn. Undersøking av genregulering av lakseluscopepodittar har vist avgrensa evne til å handtere ferskvatn og ved 2,6% var det klare teikn på osmotisk samanbrudd (Sutherland et al., 2012).

Omfang og organisering: Prosjektet har eit begrensa omfang, og den praktiske delen er gjennomført i perioden 01.10-31.12.2014. Analysearbeidet har vore gjennomført i 2014/2015. Prosjektet har ikkje hatt ei eiga styringsgruppe, men har vore leia av professor Frank Nilsen, UiB, som også er direktør ved Sea Lice Research Centre (SLRC).

3. Problemstilling og formål

Ferskvatn er prøvd ut som badebehandling i brønnbåt, men resultatene er relativt dårlege med låg effekt som direkte kan tilskrivas ferskvatn og ikkje handtering av fisken (som i seg sjølv kan gi 40 - 50% lusetap). Det er likevel rapportert om høg effekt (90%) i enkelt tilfeller (Gifas, 2013). Det er knytt usikkerheter til om miljøparameterar har betydning for effekten av behandling med ferskvatn. Målet med dette prosjektet er å teste effekten av ferskvatn mot vaksne lakselus i kontrollerte laboratorieforsøk, der ein også vil sjå på effekten av endra pH, CO₂ og temperatur i ferskvatnet. I tillegg vil ein gjere forsøk på å identifisere celler/vev hos lakselus som er knytte til osmoregulering.

Prosjektet er iverksett for å undersøke kva effekt ferskvatn har på lakselus og kva betydning endringar i pH, CO₂ og temperatur har i denne samanheng. Dette er verdifull kunnskap ved gjennomføring av ulike avlusningstiltak og av betydning for oppdrettsnæringa.

4. Prosjektgjennomføring

Prosjektet har vore gjennomført i Sea Lice Research Centre sine lokale ved UiB. Personar tilknytt SLRC med relevant kompetanse har delteke i arbeidet med prosjektet.

Det har vorte gjennomført to ulike forsøk med laks:

- 1) Effekt av pH, CO₂ og temperatur på lakselusaktivitet
- 2) Effekten av ferskvatn (FW) og CO₂ på lus som er på laks

Generelt for forsøk med laks: I forsøka som er utført er det nytta vaksne hann- og hulus av stamma LsGulen som er avla i laboratorium (Hamre et al 2009). Alle forsøk med fisk er gjennomført i etter gjeldane reglar i Noreg. All fisk vart svelta i 24 timar før forsøk. Fisk vart bedøva med 4,5 mL benzocain (20%) og 15 mL methiomedat (0,5%) i 15 L sjøvatn før vaksne lus vart plassert manuelt på fisken (10-12 lus/fisk i forsøk 1 og 20-22 lus/fisk i forsøk 2). I forsøk 2 vart det også tatt ut lus for å teste overleving og prøvar til qPCR. I begge forsøka var lusemengda lik i kontrollgruppa som gjekk i sjøvatn heile tida og gruppa som vart eksponert for ferskvatn.

FW= ferskvatn med salinitet 0
SW = sjøvatn med salinitet 34

Effekten av FW til avlusing vart testa ved at 11 fisk forsiktig vart overført til FW eller SW (tidspunkt 0). Kara hadde ein flow på 6-8 L/min og utvatnet vart filtrert for å fange opp lus som var losna frå fisken. Fisken med lakselus vart eksponert for FW i 24 timar. Etter 24 timar vart vatnet tappa ned i karet til om lag $\frac{1}{4}$ av volumet før FW vart erstatta med SW. Etter 48 timar vart forsøket avslutta (tidspunkt 48). Fisken hadde då vore eksponert i FW i 24 timar og så observert i SW i 24 timar. Det vart tatt ut ein fisk etter 0,5, 1, 4, 8 og 24 timar etter at fisken kom i FW. Etter 48 timar vart resterande fisk avliva. Filter i avløpet vart undersøkt og lus talt opp ved dei same tidspunkta. Det gjennomsnittlege talet på lus/fisk vart rekna ut på kvart tidspunkt med utgangspunkt i talet på lus i filter, talet på lus frå fiskane som vart tatt ut og talet på lus på dei fiskane som vart avliva etter 48 timar. Spesifikt lusetap («specific lice loss rate» SLR) vart kalkulert ved formel $SLR = \ln(L2-L1)/(t2-t1)$, der $t1 = \text{tid1}$, $t2 = \text{tid2}$, $L1 = \text{lus/fisk ved } t1$, $L2 = \text{lus/fisk ved } t2$.

1) Effekt av pH, CO₂ og temperatur på lakselus aktivitet

pH vart redusert ved å tilsetje 6M HCl til vatn (FW eller SW) og det vart først laga til einingar på pH 4,5. Desse pH 4,5 einingane vart så fortynna for å få vatn (FW eller SW) med pH 5,5 og 6,5. pH vart målt med WTW pH-meter (Cond 3110, Weilheim, Tyskland). Ti lus i to replikater vart inkubert i vatn (FW og SW) med ulike pH og aktiviteten vart notert. I FW vart aktivitet observert ved 0, 15 og 30 minuttar etter inkubering. For SW vart aktivitet observert ved 0, 15, 30 og 60 minuttar etter inkubering. Aktivitet vart delt inn i 3 ulike kategoriar, der 3 vart gitt til lus som hadde normal aktivitet og respons ved berøring med ein pinsett. Lus i kategori 2 satt tett på veggen i inkubatoren og viste liten respons ved berøring med pinsett. Lus i kategori 1 var urørlege og viste ingen respons ved kontakt og låg urørleg på botnen av inkubatoren.

CO₂-haldig vatn vart laga ved å boble gass direkte i FW eller SW til metting. Det metta vatnet (FW og SW) vart så fortynna, og ein laga vatn med pH 4,5, 5,5, ellet 6,5. CO₂-konsentrasjon vart så berekna basert på pH og alkaliniteten. Forsøk vart gjennomført som for pH. I tillegg vart endring i temperatur innført ($\pm 5^\circ\text{C}$). Forsøket vart gjentatt 2 gonger.

2) Effekten av ferskvatn (FW) og CO₂ på lus som er på laks

Det vart sett opp eit forsøk der laks infisert med lakselus vart behandla med FW som var tilført CO₂. Forsøket vart utført med CO₂ konsentrasjon som ikkje skal redusere velferda til laksen. FW-CO₂ vart laga ved å boble CO₂ i header tank som vart tilført kar fisken var i (5-6 L/min). pH vart målt kontinuerleg, og CO₂ nivået var mellom 15-25 mg/L gjennom forsøket. Fisk infisert med 10-12 vaksne lus vart overført direkte frå SW til FW- CO₂ og halde der i 4 timar. Kontrollgruppa fekk tilsvarende behandling med FW. Det vart nytta 4 fisk i FW- CO₂ og 4 fisk til kontrollgruppa. Forsøket vart gjennomført 2 gonger (totalt 8 +8 fisk).

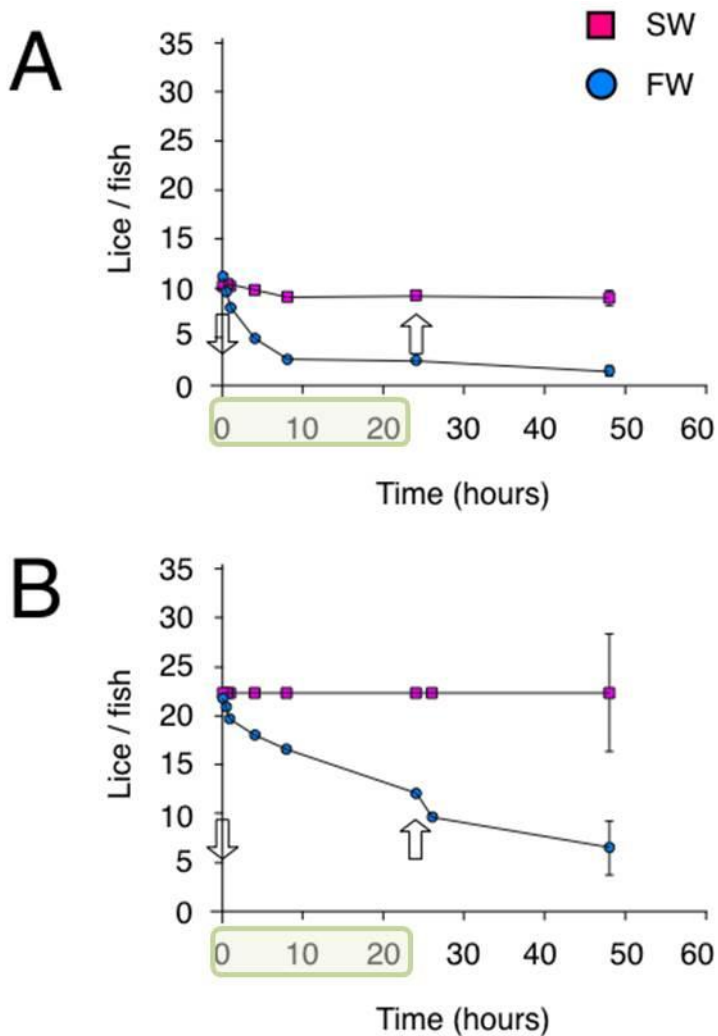
Denne tilnærminga er den mest hensiktsmessige i forhold til kunnskap ein har om lakselus ved SLRC, og for samanlikning med tidlegare forsøk/studiar som er utført.

5. Oppnådde resultat, diskusjon og konklusjon

Resultat av oppnådde resultat i prosjektet er samanfatta i dei to hovuddelane for gjennomføring av prosjektet. I tillegg er det og ein del med beskrivelse av identifisering av vev/celler som er involvert i osmoseregulering hos lakselus.

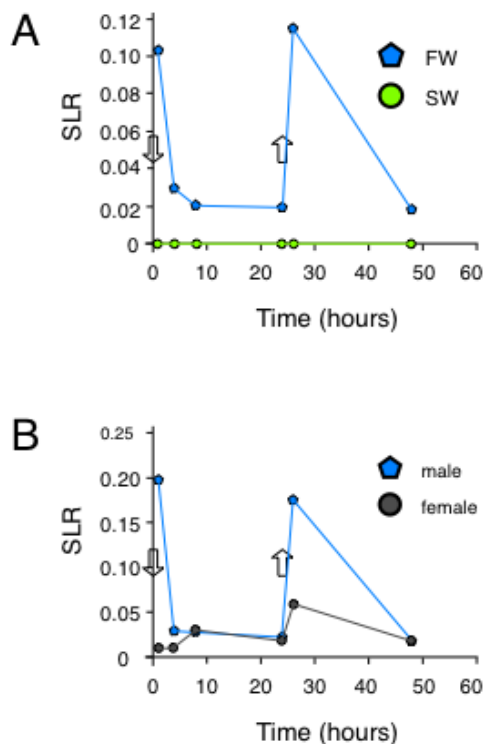
1) Effekt av ferskvatn

Det er gjort to forsøk der adult lakselus vart eksponert for ferskvatn (FW) i 24 timar med teljing av lusetap (Figur 1). I første forsøk vart det sett på 11 lus/fisk dagen før forsøket starta. Fisken vart så flytta forsiktig over i tank med FW og halde der i 24 timar med overvaking av lusetap ved filtrering av utløpsvatn. Lusetapet var størst rett etter overføring til FW (Figur 1 A) og flata ut etter 8 timar. Etter 24 timar var 77% av lusa tapt, flest hannar. Fisken vart overført til sjøvatn (SW) og 48 timar etter forsøksstart var det totale lusetapet 87%. Dette viser at det også var lusetap når fisken vart sett tilbake til SW (Figur 1A). Forsøket vart gjort igjen med 22 lus/fisk der 50% hadde vakse opp på fisken (dvs fisken vart smitta med copepodittar) og resterande lus var sett på fisken som vaksne på same måte som første forsøk. Det vart lagt inn eit ekstra sampling punkt 2 timar etter at fisken vart overført til SW. På same måte som i første forsøk var lusetapet størst rett etter at fisken var eksponert for FW (Figur 1B). Etter 24 timar var tapet 44 %, signifikant mindre enn i første forsøket. Dette har truleg samanheng med at mange av lusa hadde vakse opp på fisken og med dette truleg sat fastare på fisken og betre tolte stresset frå FW. Fisken vart overført til SW etter 24 timar og etter 48 timar vart forsøket avslutta. Det totale lusetapet var på 70 %. Prøven som var teken 2 timar etter at fisken var overført til SW, viste at ein fekk eit lusetap rett etter overføring til SW.



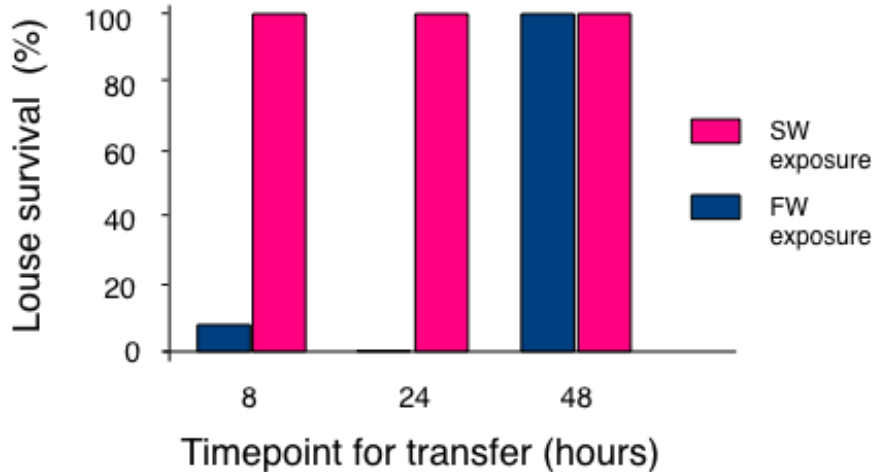
Figur 1. Respons til adult lakselus på ferskvatn (FW) ved 24 timar eksponering (markert med grønt). Piler indikere endring i salinitet frå SW til FW (ned) og tilbake til SW (opp). Lus vart talt opp i filter og frå fisk tatt ut ved dei ulike tidspunkta, og er nytta til å berekne lus/fisk i karet ved dei ulike tidspunkta. Siste teljing vart gjort på 6 fisk frå kvar gruppe. Standardavvik er gitt ved endepunkt 48 timar etter start av forsøk (dvs 24 timar eksponering for FW og 24 timar etter at fisken er tilbake i SW). **A** medium infeksjonsnivå, **B** høgt infeksjonsnivå.

Det vart også rekna ut “specific loss rate” SLR i forsøk to (Figur 2). Dette viser at lusetapet er like stort når fisken går frå SW til FW (forsøksstart) som FW til SW (avslutta eksponering etter 24 timar) (Figur 2A). Det er og klart at tapet av hannar er langt større enn tapet av hoer (Figur 2B). Dette er nok knytta til åtferda til lakselus der hannane er meir bevegelege enn hoene og på denne måten truleg blir meir eksponert for FW. Eit teikn på at hoene også var påverka av FW, fann ein ved at etter 4 timar hadde 50% slept eggstrengene, eit klart teikn på stress. Lusetap i kontrollen (SW) var null i begge forsøka.



Figur 2. Spesifikk tapsrate (SLR) av lakselus som respons på 24 timar eksponering i ferskvatn (FW) og overføring til fullt sjøvatn. Verdiane er henta frå forsøk 2 ovanfor (høgt infeksjonsnivå). **A** Total SLR av lus som respons på enten 24 timar i FW etterfølgt av 24 timar i SW eller 48 timar i SW (kontroll). **B** SLR av hann- og holus som respons på 24 timar i FW etterfølgt av 24 timar i SW. Piler indikerer start / stopp på FW behandling.

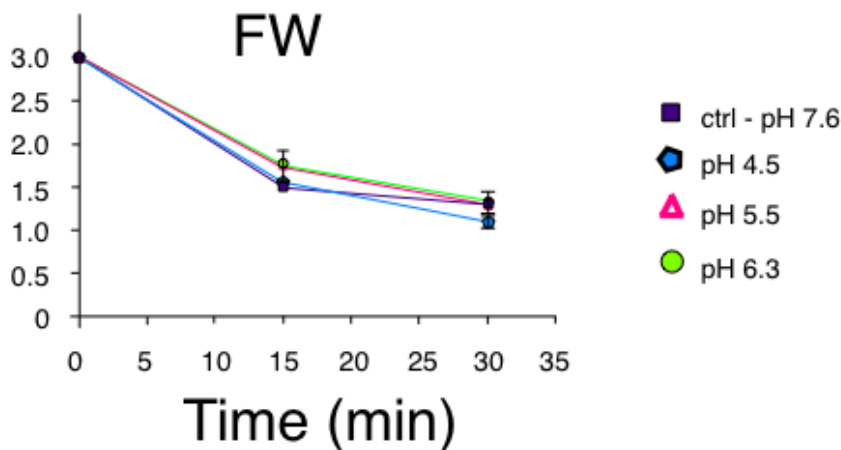
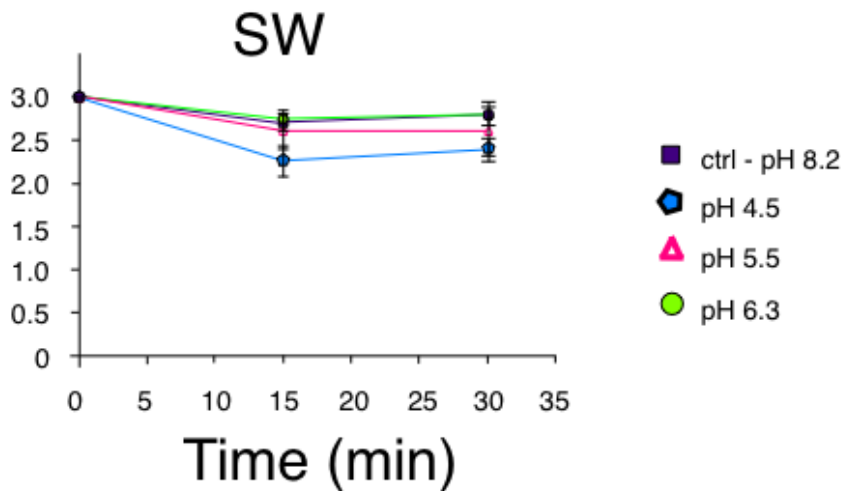
Overleving av lakselus i SW etter ulik eksponeringstid i FW vart også undersøkt (Figur 3). Her vart lusa teken av laks som hadde vore ulik tid i FW og overført til inkubatorar med sjøvatn (SW) og observert. Bakgrunnen for dette forsøket, er at lakselus er avhengig av verten for å osmoregulere i FW (Hahnenkamp og Fyhn 1985). Resultatet var overraskande og 8% overlevde etter 8 timar FW eksponering, medan ingen overlevde etter 24 timar eksponering. Lus som vart teken av etter at fisken hadde kome tilbake til SW og vore der 24 timar hadde ingen dødelegheit (Figur 3). Det ser dermed ut til at ein brå endring i salinitet er skadeleg for lusa utan omsyn til retninga av endringa (dvs om saliniteten går opp eller ned).



Figur 3. Overleving av lakselus teken av laks i FW til ulike tider (8 timar, 24 timar og 24 timar +24 timar SW reakklimatisering) og overført til SW inkubatorar. Tal lus som var med i forsøket: FW; 8 timar; n=12, 24 timar; n=4, 48 timar; n=12. SW; 8 timar, 24 timar, 48 timar; n=12.

2) Effekt av pH, CO₂ og temperatur på aktivitet og overleving av lakselus

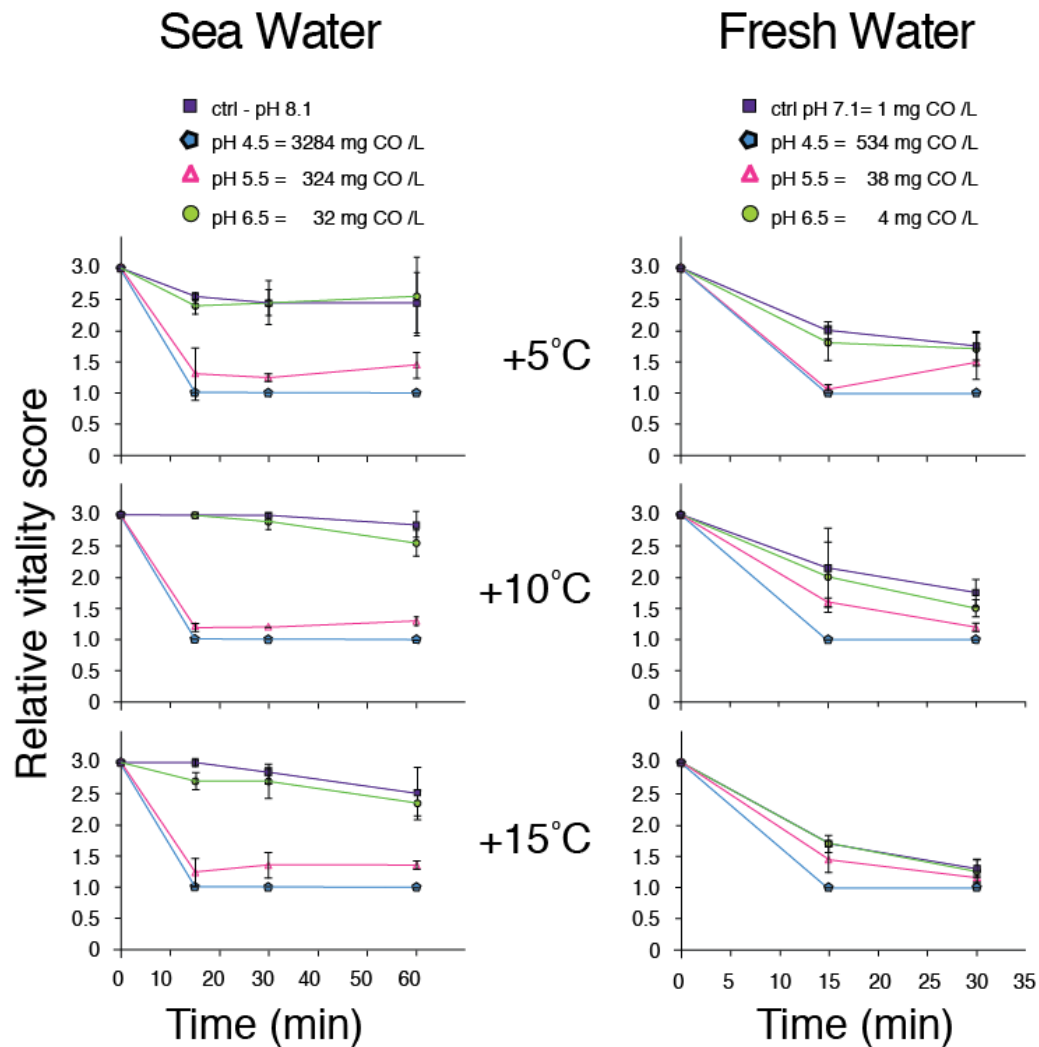
Eksponering av laks med lus på i FW gav 13-44 % effekt etter 4 timar, langt unna 90% etter 2-3 timar i brønnbåt som er rapportert tidlegare (Gifas, 2013). Forsøk vart gjennomført for å undersøke om effekten av FW aukar ved endringar i pH, CO₂ og temperatur. For å unngå forsøk med særleg ugunstige forhold for fiskevelferd vart det utført forsøk med vaksne lus i små inkubatorar. Forsøka vart gjennomført både i FW og SW for å isolere effekten av dei ulike behandlingane frå effekten av FW. Det var ingen signifikant effekt av pH på lakselus i FW eller SW (Figur 4). Effekten av FW er dominerande og kan overskygge ein mindre additiv effekt av pH.



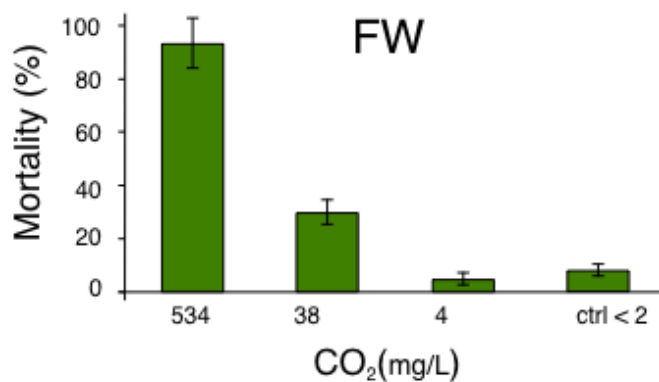
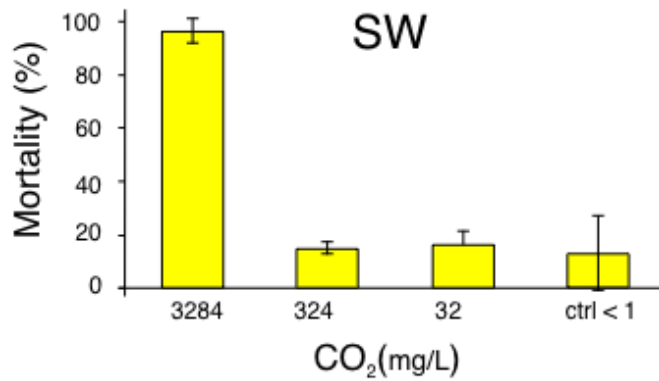
Figur 4. Effekt av pH på mobilitet hos lakselus i inkubatorar i ferskvatn (FW) og sjø (SW). Ein score på 3 er normal aktiv lus. Ein score på 2 er lus som heng fast men som ikkje reagerer normalt på berøring med pinsett. Ein score på 1 er lus som er heilt urørleg på botnen av inkubatoren og som ikkje reagerer på fysisk stimuli.

Effekten av CO₂ vart testa ved 3 ulike temperaturar (5°C, 10°C, 15°C). CO₂ og pH i vatn er tett kopla saman der auka [CO₂] fører til lågare pH. Vidare er det slik at effekten CO₂ har på pH i vatn er bestemt av bufferkapasiteten til vatnet. Sidan SW har betydeleg høgare bufferkapasitet enn FW resulterer dette i høgare [CO₂] i SW enn i FW ved same pH. Både i FW og SW var lågaste [CO₂] halde innanfor grensa som laks kan tåle i kortare tidsrom medan dei høgaste nivåa er langt over dødeleg nivå for laks (Figur 5). Lågaste [CO₂] som hadde effekt på lakselus i SW var 324 mg/L (Figur 5) og ved 3200 mg/L vart alle lus inaktiverte og var daude 4 dagar etter eksponering (Figur 6). Temperaturen hadde ikkje effekt på verknaden av CO₂ i SW. I FW var det ein liten effekt ved 38 mg/L og om lag 20% var daude etter 4 dagar (Figur 6). Ved 534 mg/L vart lusa raskt immobilisert og meir enn 90% var daude etter 4 dagar. Heller ikkje i FW kunne vi konkludere sikkert at at temperatur påverka aktiviteten til

lusa, men det var ein tendens til at lusa som fekk auka behandlingstemperaturen med 5°C til 15°C gjekk litt ned (Figur 5).

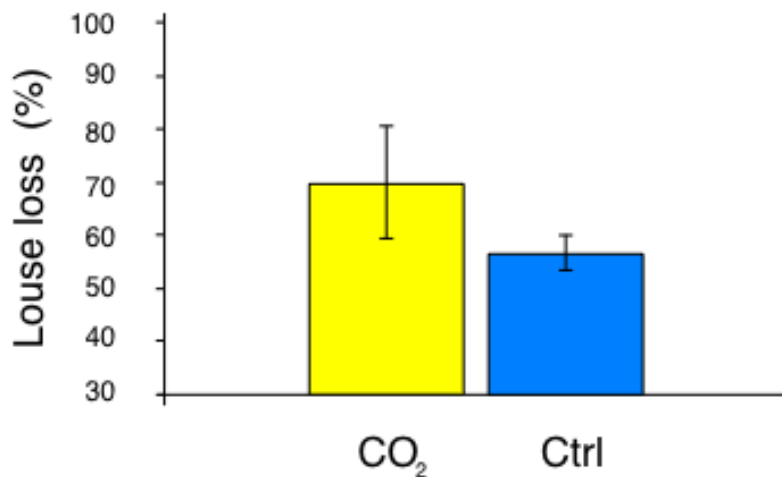


Figur 5. Effekt av pH, temperatur og CO₂ på mobilitet til lakselus. Ein score på 3 er normal aktiv lus. Ein score på 2 er lus som heng fast men som ikkje reagerer normalt på berøring med pinsett. Ein score på 1 er lus som er heilt urørleg på botnen av inkubatoren og som ikkje reagerer på fysisk kontakt. Tala er gitt som gjennomsnitt (+/- SD) frå 2 uavhengige forsøk der 10 individ er evaluert på kvart tidspunkt.



Figur 6. Dødelighet av lakselus 4 dagar etter eksponering med ulike konsentrasjonar CO₂ i saltvatn (SW, øvre) og ferskvatn (FW, nedre). Gjennomsnitt (+/- SD) av 2 ulike forsøk med 10 lus/behandling.

Basert på resultatane ovanfor vart det utført forsøk med ein konsentrasjon på 20 mg/L CO₂ i FW. Denne [CO₂] vart valt fordi denne verdien er rekna for ikkje å ha nokon påverknad på fiskevelferda, og ein treng ikkje sentral godkjenning for gjennomføring av forsøket. Det var ingen signifikant forskjell i lusetap i FW med og utan 20 mg/L CO₂ (Figur 7) etter 4 timar eksponering. Det er noko større standaravvik i gruppa som er eksponert for CO₂ og trenden er at det er litt fleire lus tapt når ein aukar [CO₂] i FW.



Figur 7. Effekt av CO₂ i FW på lusetap etter 4 timer behandling på lakselusinfisert laks (adult lakselus). [CO₂] var på 20 mg/L. Verdien er gjennomsnitt +/- STE frå fem tankforsøk (med to fisk/tank).

Identifisering av vev/celler involvert i osmoregulering hos lakselus

Farging av vaksne hann- og holus med sølvnitrat identifiserte fire kjertlar i framkroppen og to strukturar i bakkroppen som truleg er involvert i osmoregulering hos lakselus. Strukturane i bakkroppen (genietalsegmentet) er hospesifikke medan både hann og ho har fire kjertlar i framkroppen som farga likt. Det pågår stadig litt oppfølgjande arbeid med desse strukturane men dei vil inngå i ein vitenskapleg publikasjon som omhandlar dette studiet.

Vurdering av funna og konklusjon

Lakseluslarver tåler ferskvatn dårleg medan det er vist at pre-adult og adult lus kan overleve lenge i FW når dei sit på fisken. Hahnenkamp og Fyhn (1985) undersøkte dei kvalitative effektane ved eksponering til brakkvatn og FW medan eit viktig mål med dette prosjektet er å kvantifisere effekten og sjå på tapstal av vaksne lakselus når fisken vert eksponert for FW og i tillegg undersøke om pH, CO₂ og temperatur påverkar effekten av FW. Eksponering av vaksne lakselus i FW i 24 timer, der effekten var evaluert 24 timar seinare viste eit lusetap på mellom 70-86 %. Dette er ein god effekt, men det er lite truleg at 24 timars behandling er aktuelt som ein alminneleg avlusningsmetode i oppdrettsnæringa. Effekten etter 4 timar var mellom 13 og 44 % noko som peikar på at FW bad ikkje er effektiv nok åleine mot vaksne lakselus. Det er rapportert om opp til 90% effekt med FW bad etter 2-3 timar behandling (Gifas 2013) og det er foreslått at CO₂, pH, mekanisk handtering eller temperaturdropp kunne føre til auka effekt av FW. Effekten av CO₂ på lakselus i SW er låg (sjå Figur 6). Endring i temperatur hadde ingen tilleggseffekt i SW. I FW var det ein tydelegare effekt og pH 5,5, og [CO₂] på 38 mg/L førte til raskare immobilisering av lakselus enn kontrollgruppa som var inkubert i FW. Dette kan tyde på ein viss additiv effekt av CO₂ i FW. Den praktiske betydninga av dette er meir usikker sidan det er ikkje vil vera tilrådeleg å auke konsentrasjonen av CO₂

noko særleg over 20 mg/L (ein CO₂-konsentrasjon på 20 mg/L påverkar ikkje fiskevelferd til laks). Konsekvensen av for høg konsentrasjon av CO₂ vil vera fiskedød.

Referansar

Hahnenkamp, Lutz, and Hans Jørgen Fyhn. "The osmotic response of salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae), during the transition from sea water to fresh water." *Journal of Comparative Physiology B* 155.3 (1985): 357-365.

Hamre, Lars A, Kevin A Glover, and Frank Nilsen. "Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains." *Parasitology international* 58.4 (2009): 451-460.

Gifas (2013) FHF-project report available at:
<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=901006>

Sutherland, Ben JG et al. (2012) "Transcriptomics of coping strategies in free-swimming *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda) larvae responding to abiotic stress." *Molecular ecology* 21.24 (2012): 6000-6014.