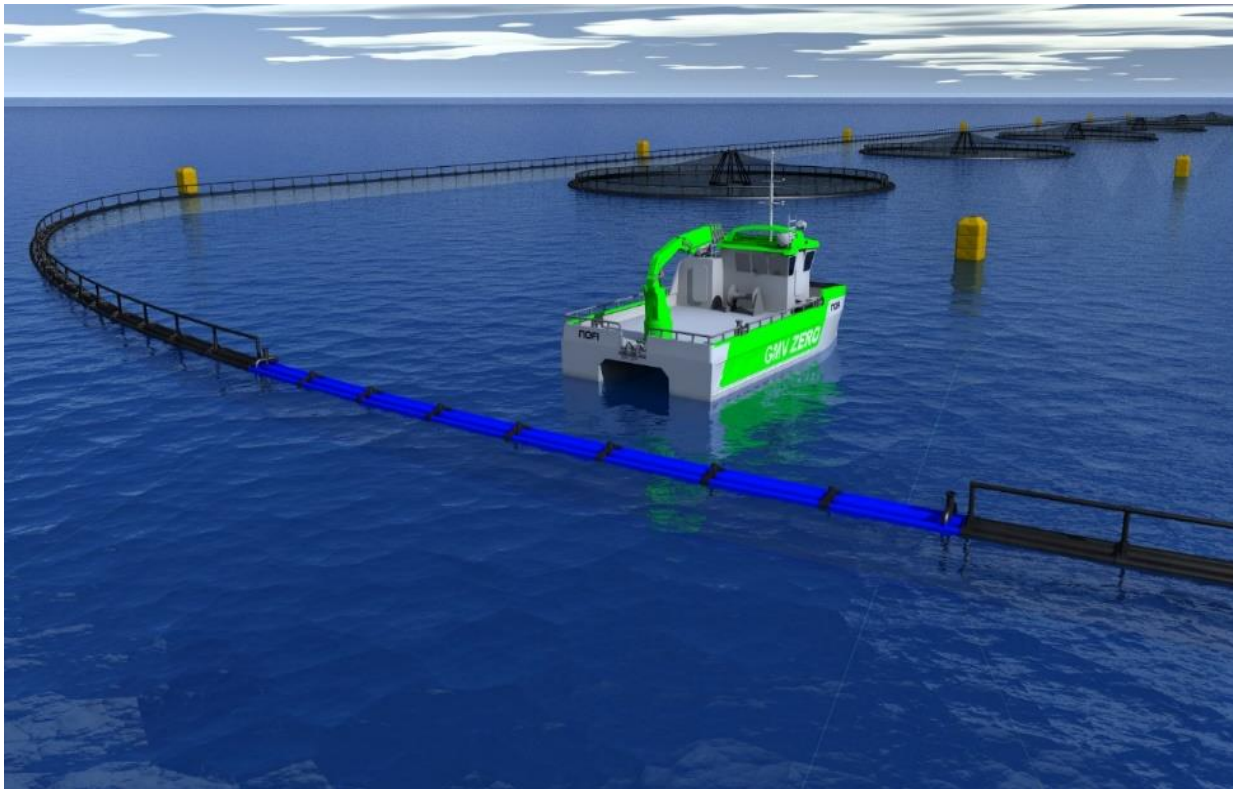


Regulering av salinitet i merd som forebyggende tiltak mot lakselus

- Delrapport: Effekt på fiskevelferd



Akvaplan-niva AS Rapport: 9291 - 1

This page is intentionally left blank

Rapporttittel**Miljøregulering som forebyggende prinsipp mot lakselus****- Delrapport: effekt på fiskevelferd****Forfattere:**

Karin Bloch-Hansen og Thor Jonassen

Akvaplan-niva rapport nr.

9291 - 1

Dato:

19.04.2019

Prosjektgruppe:

Karin Bloch-Hansen, Lars Olav Sparboe, Kristine Hopland Sperre, Margrethe Nilsen, Claudia Halsband, Magnus Drivdal, Øyvind Leikvin, Thor Jonassen

Antall sider:

22

Distribusjon:

Åpen

Oppdragsgiver:

FHF

Oppdragsgivers referanse:

901457

Sammendrag

Forsøket omfattet utprøving av metode for administrasjon av ferskvann og etablering av ferskvannsgradient i overflatelag i merd omgitt av en 2 m dyp lense. Målorganismen i forsøket var frittlevende luselarver, og målsetningen var å prøve ut om metoden og effekten av ferskvann ville redusere påslag av lakselus på fisk. Effekt av metoden på fiskens helse og velferd ble også kartlagt gjennom regelmessig helsemessig oppfølging (fiskehelsetjenesten) og målrettet prøvetaking.

Det ble gjennomført to ikke-medikamentelle avlusinger (thermolicer) i perioden forsøket pågikk. Behandlingene omfattet både forsøks- og referansemerder. Dødelighet og kliniske observasjoner av betydning for fiskens helse og velferd i utprøvningsperioden, kunne i all hovedsak relateres til lusepåslagene (skottelus og lakselus), og dødelighetstoppene sammenfalt med avlusingene. Analyseresultater fra målrettet prøvetaking gav ikke grunnlag for å knytte ferskvannstilførselen til redusert helse og velferd.

Da det på tross av ferskvannstilsetting ble nødvendig å gjennomføre avlusningstiltak i forsøksperioden, har metoden ikke gitt ønsket gevinst på fiskevelferden. Det er imidlertid ikke gjort funn ved prøvetakingen som tilsier at ferskvannsadministrasjonen isolert sett, har påvirket fiskens helse og velferd negativt. Metoden vurderes derfor velferdsmessig forsvarlig og egnet ut fra hensynet til fiskens velferd (jf. dyrevelferdsloven § 8 og akvakulturdriftsforskriften § 20).

Prosjektleder

Karin Bloch-Hansen

**Kvalitetskontroll**

Atle Foss



INNHOLDSFORTEGNELSE

Bakgrunn	5
Innledning	5
Gjennomføring	5
Analysemetoder	6
Generell helsestatus.....	7
Dødelighet.....	7
Gjellehelse.....	9
Epitel og slimcelleanalyser fra hud og gjeller	11
Plasmaioner og osmotisk stress.....	13
Katarakt.....	15
Kjønnsmodning	18
Referanser	21

Bakgrunn

Prosjektet omfattet utprøving av konsept for ferskvannstilsetning i merd omkranset av 2m dype lenser for etablering av en salinitetsgradient som gjør at luselarvene svekkes eller dør. Forventningen var at etablering av et slikt miljø er en kostnadseffektiv metode for å forebygge påslag av lakselus, uten negative effekter på fiskevelferd, HMS og øvrig drift. En mer utfyllende beskrivelse av forsøksoppsett, gjennomføring og dokumentasjon av miljø og forebyggende effekt er beskrevet i Akvaplan-niva rapport 9290-1. Dokumentasjon av effekt på produksjonsbiologi og HMS er gitt i Akvaplan-niva rapport 9292.

Denne delrapporten omhandler dokumentasjon av fiskevelferd fra prosjektet. Målsetningen var å kartlegge om tilførsel av ferskvann ville påvirke fiskens helse og velferd negativt, og dokumentere at metoden var fiskevelferdsmessig forsvarlig i bruk.

Innledning

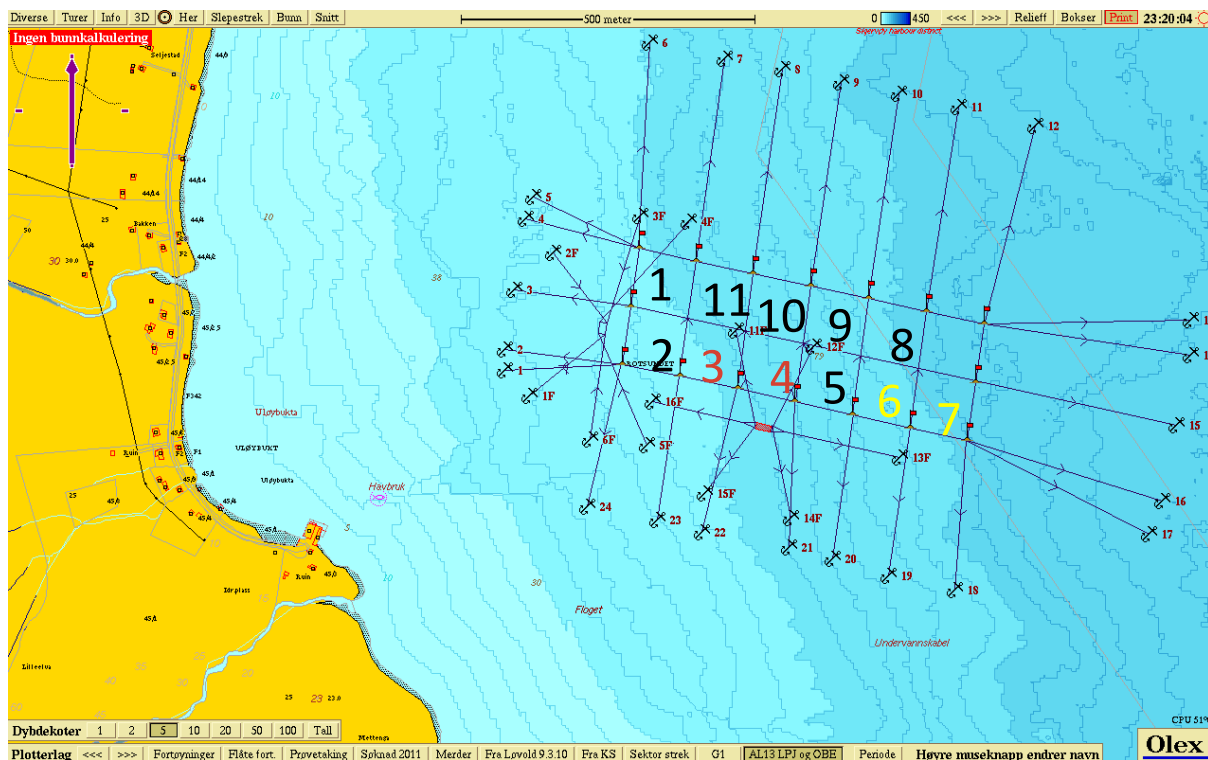
Lakselusen påfører laksen skader ved å ernære seg av den, samtidig som spesielt ikke-medikamentelle behandlinger gir fisken nye helseplager. Fiskehelse rapporten 2016 (Veterinærinstituttet Rapport 4-2017) viste at lakselus identifiseres som det viktigste helseproblemet i norsk oppdrettsnæring. Deretter følger mekaniske skader etter avlusning. Forebygging av høye lusetall er derfor et viktig miljømål for næringen som vil redusere utfordringene lusebehandlingene har på fiskevelferden.

Laks er fra naturens side fysiologisk rustet til å håndtere et vannmiljø med variabel saltholdighet i løpet av sin livssyklus. Forskning har vist at nyutsatt smolt har en preferanse for brakkvann uavhengig av temperatur de første to månedene etter utsett (Oppedal, F., m.fl., 2010). Det er videre vist at variasjoner i salinitet ikke er en avgjørende faktor mht. å påvirke fiskens vertikalfordeling i sjø tre måneder etter utsett (Oppedal m.fl. 2010). I laboratoriestudier er det vist at postsmolt håndterer brå endringer i salinitet, fra fullt sjøvann til 5-10 ‰ i 24 timer uten effekt på dødelighet, og med moderat og forbigående effekt på ione-balanse i plasma (Bakke m.fl. 1991). Det er imidlertid observert at en brå endring i salinitet (28 til 5‰) i kombinasjon med brå reduksjon i temperatur (8 til 2 °C) fører til økt dødelighet (Bakke m.fl. 1991). Fiskens toleranse for endringer i salinitet avhenger av evnen til å osmoregulere, som igjen påvirkes av øvrig stressbelastning. Kartlegging av fiskens generelle helsestatus og fysiologiske funksjon er derfor viktig for å dokumentere effekt av ferskvannstilsetning på fiskevelferd, og dokumentere at metoden er velferdsmessig forsvarlig.

Gjennomføring

Totalt var det 11 merder à 140 m omkrets med luseskjørt på lokaliteten (Bilde 1). Fiskegruppene som var omfattet av forsøket var satt ut våren 2017. Luseskjørtene i forsøksmerdene og referansemerdene ble fjernet 31. mai 2018 og de 2 m dype ferskvannslensene ble satt på forsøksmerdene (merd 3 og 4) 10. juni. Forsøksmerdene var derfor eksponert for lusesmitte ved økende temperaturer i 10 dager. Pumpene for ferskvannstilførsel startet 4. juli, noe som resulterte i at forsøksgruppene sto omkranset av 2 m lenser uten tilsetning av ferskvann i ca. 4 uker.

I de to referansemerdene (merd 6 og 7) var det fri vanngjennomstrømning og ingen ferskvannstilførsel. CTD-målinger fra forsøksmerd viste ferskvannspåvirkning i øvre vannlag fra 5. juli, med avgrensning til det øvre vannlag (0,5 – 1,0 m). Det var ingen påvirkning av ferskvann under 2 m dyp.



Bilde 1. Forsøksanlegget ved Arnøy Laks i Uløybukt, Nord-Troms. Forsøksmerder med ferskvannstilførsel (merd 3 og 4) og åpne referansemerder uten ferskvannstilførsel (merd 6 og 7). De øvrige merdene hadde påmontert skjørt.

Det var løpende kontroll og rapportering av fiskegruppenes helse- og velferdsstatus basert på rutinemessig oppfølging fra ordinært helsetilsyn. I tillegg var det registrering av katarakt og gjellehelse, samt analysing av slimceller fra hud og gjeller basert på Quantidoc-metoden for diagnostisk vurdering av helsestatus og robusthet ved start, midtveis og avslutning av forsøket. For å avklare laksens respons på miljøendringene ferskvannstilførselen medførte, ble laksens tilpasning til variasjoner i salinitet også undersøkt gjennom kartlegging av fysiologiske endringer i sentrale plasmaioner. Denne delrapporten omfatter resultater av de undersøkelser som ble gjort.

Analysemetoder

Velferdsindikatorer ble definert med mål om å dokumentere konsekvens av ferskvannstilsetning og etablering av salinitetsgradient på laksens velferd (Tabell 1). Disse omfattet individbaserte indikatorer som kunne relateres til fiskens fysiologiske stressbelastning og osmoreguleringsevne. I tillegg ble fiskegruppenes generelle helsestatus dokumentert gjennom forskriftsfestet helsetilsyn ivarettatt av fiskehelsetjenesten.

Tabell 1. Prøvetaking omfattet følgende indikatorer

Velferdsindikator	Analyse
Generell helsestatus	Fiskehelsetjenestens helsetilsyn
Dødelighet	Dødelighetsutvikling og akkumulert dødelighet
Gjellehelse	Histologi – gjellescore
Epitel- og slimcelleanalyser	Kvantitativ histologi - gjeller og skinn
Osmotisk stress	Plasmaioner
Kataraktutvikling	Kataraktscore
Kjønnsmodning	Gonadosomatisk indeks (GSI) og nedklassingsdata slakteri

Prøvetakingen omfattet tre tidsavgrensede uttak fra tilfeldig utvalgt fisk i begge forsøksmerdene og referansemerdene. Første uttak ble gjennomført ved 05.06.2018, før oppstart av ferskvannstilsetning. Dette uttaket representerte null-punkt og utgjorde en basis for sammenligning av utgangstatus og videre utvikling i de enkelte fiskegruppene. Midtprøveuttak ble gjennomført 6 uker etter oppstart av ferskvannstilførsel (28.08.2018), og sluttprøver etter 14 uker med ferskvannstilførsel (25.10.2018). Fisk for prøvetaking ble tatt ut ved bruk av avkastnot og avlivet med overdose Benzoak. Kataraktvurderingene ble gjennomført på bedøvet fisk etter kort opphold i bedøvelseskar. Analyseresultater presenteres tematisk for den enkelte indikator.

Generell helsestatus

Helsetilsyn på lokaliteten ble ivaretatt av Marin Helse AS. Fiskehelsetjenestens rapporter ble lagt til grunn for dokumentasjon av fiskegruppens helsehistorikk fra utsett, og utvikling i perioden med ferskvannstilsetning. I tillegg ble det gjennomført ekstra tilsyn under avlusingsoperasjonene samt evaluering av behandlingseffekt.

Vårfiskens helsestatus siden fra utsett 2017 ble vurdert som svært god av fiskehelsetjenesten. Det forelå ingen sykdomsdiagnoser, og dødeligheten hadde vært lav og tilnærmet lik i alle enheter. Dødelighet og kliniske observasjoner av betydning for fiskens helse og velferd i perioden forsøket ble gjennomført, kan i all hovedsak relateres til konsekvenser av betydelig forekomst av skottelus på fisk og lusebehandlingene som ble gjennomført mens forsøket pågikk. Av fiskehelsetjenestens rapport 05.09.2018 fremgår at det observeres fisk med mekaniske skader som følge av slag/hoppeskader som knyttes til skotteluspåslag. Tilnærmet 80% av all dødfisk obdusert ved helsetilsyn hadde indre blødninger (eks. blødninger rundt hjerne, sprukken nyre).

Ikke-medikamentelle lusebehandlinger (thermolicer i brønnbåt) ble gjennomført i ukene 37 og 41. Fiskevelferden under behandlingsoperasjonene ble vurdert som akseptabel av fiskehelsetjenesten. Forekomsten av svimere og dødfisk etter operasjonen ble betraktet som lav, men det ble observert innslag av fisk med finneskader, små øyeblikninger, rist-tap og røddebuk. Ved grafisk fremstilling av ukentlig dødelighet i perioden, ser man at avlusingen sammenfaller med påfølgende dødelighetstopper (figur 1). I rapport 26.10.2018 beskriver helsetjenesten at fisk i behandlede merder var preget av håndtering, og skadet fisk med begynnende sårutvikling dominerte merdbildene. Det anmerkes videre at det ble observert flest svimere i merd 4 (forsøksmerd). I denne enheten så man også et høyere innslag av fisk med risttap, røddebuk og finneskader sammenlignet med øvrige enheter. Generelt ble behandlingsdødeligheten vurdert som "akseptabel" av fiskehelsetjenesten, noe som tilsier at fiskegruppens generelle tåleevne og helsestatus har vært god i forkant av behandlingene i både ferskvannstilsatte merder og referansemerder.

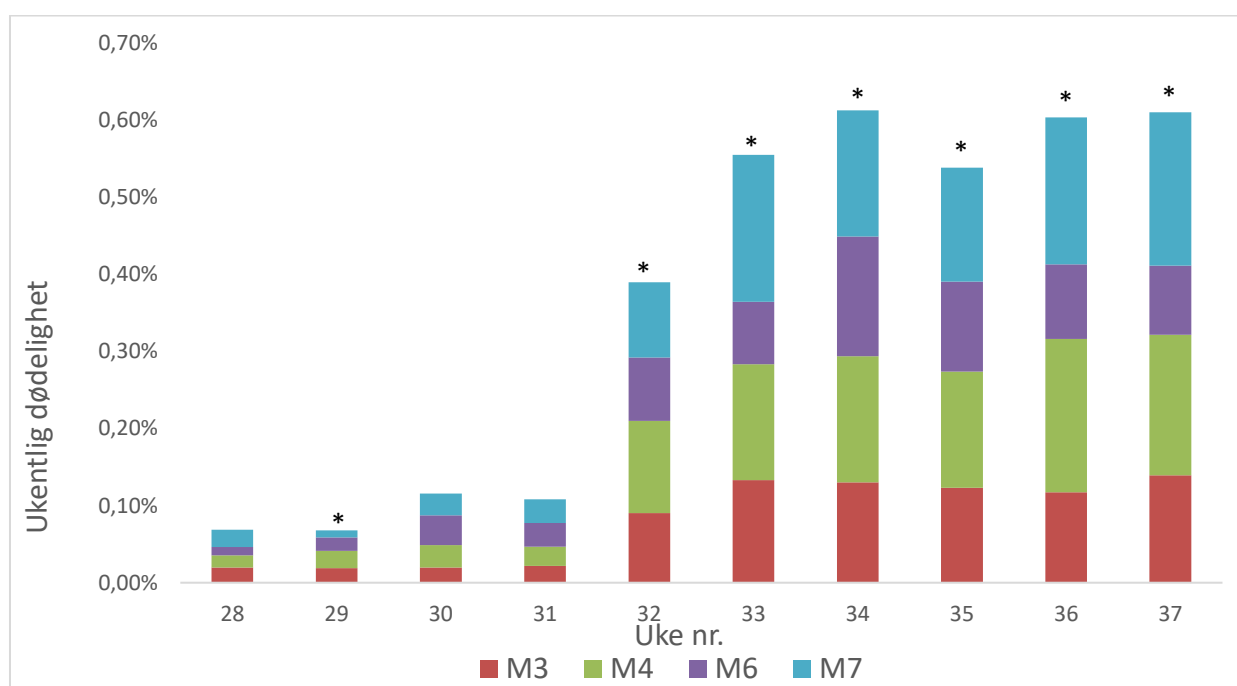
Det anmerkes at det ble påvist kardiomyopativirus (PMCV) i tilknytning prøvetaking ved obduksjonsfunn på en enkeltfisk fra merd 3 (forsøksmerd) i september (ref. fiskehelsetjenestens rapport 26.10.2018). Det ble ikke observert klinikk forenlig med en utbruddssituasjon av CMS i perioden forsøket ble gjennomført. For øvrig foreligger ingen sykdomsdiagnoser på fiskegruppene.

Dødelighet

Dødelighet utgjør en grov indikator på fiskens helse- og velferd. Forsøket sto uforstyrret fra uke 28 da lenser og ferskvann ble satt på i merd 3 og 4 frem til første avlusing uke 37. En ki-kvadrat test (χ^2) basert på følgende formel:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

(med E som tall fra kontrollgruppe testet mot det den observerte gruppen O) ble benyttet til å teste forskjeller i dødelighet mellom gruppene. Denne er signifikant om $\chi^2 > 3.84$ (df=1). Dødeligheten i denne perioden varierte mellom merdene (Figur 1), og på gruppebasis med sammenslåtte parallelle merder var det signifikante statistiske forskjeller (basert på signifikansnivå (α) på 0,05) mellom forsøksgruppene uke 29 og fra uke 32 til 37 ($\chi^2 > 3.84$, df=1), hvor dødeligheten i alle tilfellene var høyest for gruppen tilført ferskvann. Det er likevel verdt å merke seg at forskjellen mellom gruppene var svært liten. Vi finner ingen god forklaring på at salinitetsforskjellene mellom gruppene har forårsaket disse forskjellene. På tross av at avlusingsoperasjoner gjennomføres i henhold til en standardisert metodikk, vil det kunne forekomme forskjeller som påvirker håndterings-, trengingsgrad og total påkjenning på fisk i de enkelte fiskegrupper (eks. personell/kompetanse, døgnvariable miljøbetingelser). Dette kan være forklaringsfaktorer for en høyere dødelighet i enkelte fiskegrupper under og etter avlusingsoperasjonen. Det er imidlertid ikke særskilte forhold i fiskehelsetjenestens rapporter som peker på konkrete faktorer under avlusing som kan forklare variansen i dødelighet på merdnivå.

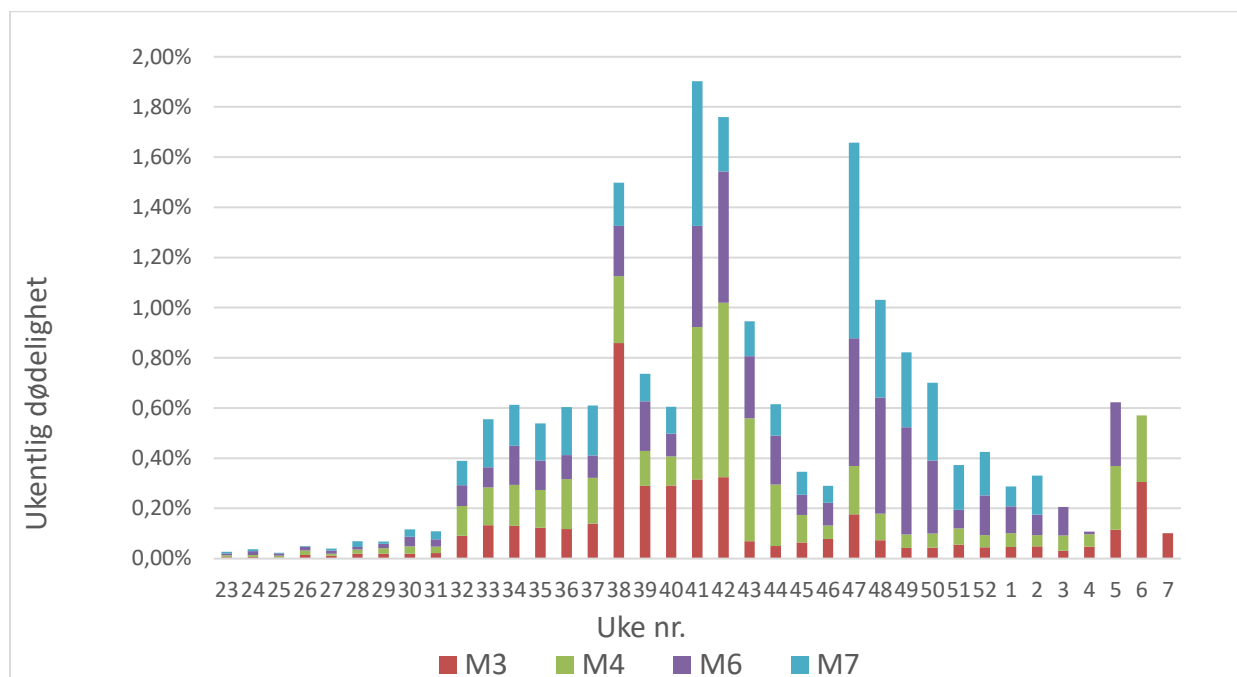


Figur 1. Utvikling i ukentlig dødelighet i perioden fra forsøksstart til første avlusning. Søyler markert med * indikerer signifikante statistiske forskjeller ($\chi^2 > 3.84$, df=1) mellom gruppen med ferskvannstilsetning (M3 og M4) og referansegrupper uten ferskvann (M6 og M7).

Dødelighetsutviklingen gjennom produksjonssesongen fra starten av juni (uke 23) til februar 2019 (uke 7) indikerer økende dødelighet i alle merdene i perioden med stigende temperatur fra august til oktober (Figur 2). Dette er i overensstemmelse med det generelle dødelighetsmønsteret registrert på laks i Norge i perioden 2013-16, hvor dødeligheten for stor fisk (over ca. 1 kg) øker ved temperaturer over ca. 11-12 °C, samt den generelt stigende dødeligheten ved økende fiskestørrelse de siste 5 mnd. før slaktning observert spesielt fra 2013-16 (Grefsrud m.fl. 2018).

Dødelighetstoppene uke 38, 41-42 og 47 kommer like i etterkant av eller i forbindelse med lusebehandlingene (thermolicer) uke 37, 41 og 47 (Figur 2). Variasjonen i dødeligheten er derfor primært knyttet til lusebehandlingene. I den grad ferskvannstilsetning i merd bidrar til å redusere infeksjonspresset fra lakselus kan en forvente en positiv effekt på fiskevelferd (reduisert dødelighet) gjennom reduksjon i antall avlusninger. Akkumulert dødelighet for hele perioden var signifikant høyere ($\chi^2 > 3.84$, df=1) i referansegruppen (4,59 %) sammenlignet med gruppen med ferskvannstilførsel (4,19 %). Dette er omkring nivået til de 20 % beste enkeltmerdene i Norge med lavest akkumulert

normaldødelighet i perioden 2009-16 (4,4 % akkumulert dødelighet over 15 mnd.). Av Havforskningsinstituttets «Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2018» (Grefsrud m.fl. 2018) fremgår: «Akkumulert dødelighet er en retrospektiv velferdsindikator som kan brukes til å vurdere velferd av hele eller lengre deler av produksjonssykluser av dyr. En vurdering av hele produksjonen er nødvendig hvis målet er å vurdere en produksjonsmetode, et produksjonssystem eller et produksjonssted». I rapporten koples akkumulert dødelighet lavere enn 7,2 % til god fiskevelferd, og i Troms (produksjonsområde 11) faller litt over 40 % av de registrerte enkeltmerkene innenfor dette nivået. Basert på dødelighet som velferdsindikator er fiskevelferden i både forsøksmerkene og referansemerkene å betrakte som god.



Figur 2. Utvikling i ukentlig dødelighet fra uke 23 2018 til før slaktning uke 7 2019 for merder med ferskvannstilsetning (M3 og M4) og referansemerder uten ferskvann (M6 og M7).

Gjellehelse

Gjellene spiller en sentral rolle i en rekke fysiologiske prosesser eks. gassutveksling, ione- og osmoregulering. God gjellehelse er derfor av stor betydning for fiskens fysiologiske funksjon, helse, velferd og prestasjon. Effekt av ferskvannstilsetningen på gjellehelse ble kartlagt gjennom uttak av gjellevev for histologisk undersøkelse og kvantifisering av histopatologiske forandringer (gjellescore, Tabell 2). Metoden er utviklet av Pharmaq Analytic. Scoringssystemet baserer seg på at patologiske forandringer som er av mindre fysiologisk betydning og som ansees raskt reverserbare, vektles lavere enn forandringer som betraktes som mer alvorlige og tar lengre tid å lege. Gjellescoren betegnes derfor som gradert. De identifiserte funnene summeres opp og danner grunnlag for en totalscore per gjellesnitt som tallfestes på en skala fra 1-30. Verdier <10 vurderes som milde forandringer, 11-20 som moderate forandringer og 21-30 som alvorlige patologiske forandringer.

Mucous cell metaplasi	Clubbing	Lamellar oedema ("lifting")	Lamellar or interlamellar epithelial hypertrophy	Congestions or coagulation lamellae	Congestion filament	Cartilage deformity	Thickened distal filament (epithelial proliferation)	
Lamellar epithelial hyperplasi	Fresh aneurisms	Bleeding aneurisms	Old aneurisms	Lamellar bleeding	Lamellar fusion	Thickened filament (inflammation)	Thickened filament (proliferation)	Inflammation single lamellae

Tabell 2: Oversikt over histologiske funn som legges til grunn ved fastsetting av gjellescore.

Ved første uttak (juni) ble det tatt prøver av 10 fisk fra én merd per behandling (merd 3 og 7). Midt- og sluttprøveuttak omfattet 10 fisk fra begge forsøksmerder og begge referansemerder. Totalt antall prøver N = 100.

Resultater

Det ble ikke funnet signifikant forskjell (basert på signifikansnivå (α) på 0,05) i gjellescore (forekomst av patologiske forandringer) mellom fisk i forsøksmerder og referansemerder (en-veis ANOVA, $p > 0,05$) ved de enkelte prøveuttak, men en generell tendens til bedre gjellescore i begge fiskegrupper fra start til forsøksslutt. Videre sees en trend med noe lavere gjennomsnittlig gjellescoreverdi i referansemerder enn i forsøksmerder ved alle uttak. Scoreverdier fra fisk i alle merder var i intervallet 2-14, og det var jevn forekomst av enkeltfisk med score i kategorien moderate forandringer i alle enhetene. Gjennomsnittlig scoreverdi ved de tre prøveuttakene fra både forsøks- og referansemerder var i intervallet milde forandringer. De histologiske funnene som ble identifisert tolkes som lavgradige, ikke-spesifikke funn ved irritasjon av gjellevev eks. fortykning av lameller og økt forekomst av slimceller.

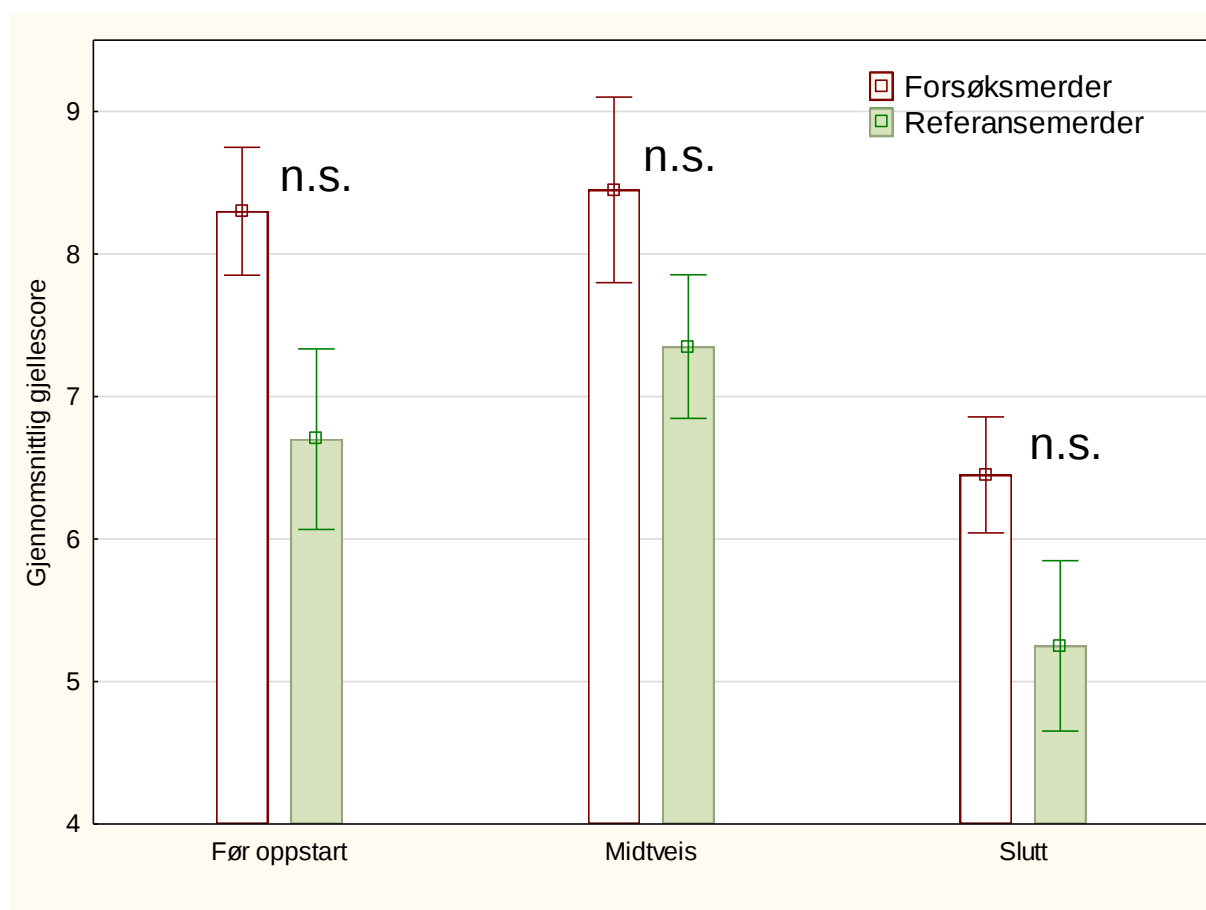


Fig 3: Gjennomsnittlig gjellescore (gradert beregning) på fisk fra hhv. forsøksmerder og referansemerder registrert før forsøksstart (0-prøver fra merd 3 og 6, $n=10$ per gruppe), midtveis i forsøket (alle merder, $n=20$ per gruppe) og ved avslutning av forsøket (alle merder, $n=20$ per gruppe). Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene på de enkelte måletidspunktene (en-veil ANOVA, $p > 0,05$). n.s. angir ikke signifikant effekt.

Histopatologiske undersøkelser og gjellescore tilsier at gjellehelsen generelt har vært god hos fisk i både ferskvannstilsatte merder og referansemerder i hele forsøksperioden. Det er ikke gjort funn i undersøkt vevsmateriale som tilsier at tilførsel av ferskvann har påvirket gjellehelsen hos fisk i forsøksmerkene negativt. Det er ikke identifisert faktorer ved miljø- eller helsehistorikk som kan forklare bedringen i gjellehelse fra første til siste prøveuttak i begge fiskegrupper. Men det faktum at

fiskegruppens gjellescoreverdier er synkende fra første til siste prøveuttak, trekkes frem som positivt tatt i betraktning at sluttprøveuttaket ble gjennomført kun to uker etter siste thermolicer behandling.

Epitel og slimcelleanalyser fra hud og gjeller

Slimlaget på gjeller og skinn utgjør fiskens barriere mot ytre miljø, førstelinjeforsvaret mot infeksjoner, og responderer på endringer i miljøet. Kvantitative analyser av areal (μm^2) og tetthet av slimceller, samt barrierestyrken på overflatene som en funksjon av areal og tetthet, er brukt som mål på skinn- og gjellehelse (analysert av QuantiDoc™). Metoden er dokumentert å være et relevant mål på fiskevelferd og helse hos laks (Pittman m.fl., 2013), hvor tetthet og barrierestyrke er positivt korrelert med økende velferd- og helsestatus og et mål for fiskens robusthet ovenfor ytre miljø.

Prøvemateriale for slimcelleanalyser omfattet formalinfiksert gjellevev (andre gjellebue venstre side) og et rektangulært hudsnitt fra område under ryggfinne. Ved første prøveuttak i juni ble det analysert vev fra 5 fisk fra én merd per behandling (merd 3 og 7). Midtprøve- og sluttprøveuttak omfattet 5 fisk fra begge forsøksmerder (merd 3+4) og begge referansemerder (merd 6+7). Totalt antall prøver fra hele perioden var N = 50.



Bilde 3: Uttak av skinnprøver og slimcelleanalyser.

Resultater

Analyseresultater fra fisk i både forsøks- og referansemerder viste en gjennomgående god barrierestatus på gjelle- og skinnprøver ved alle prøveuttak. Forsøksmerdene hadde en noe bedre barrierestatus ved oppstart enn referansemerdene, mens det ved de to siste uttakene var ingen/liten forskjell mellom gruppene. Trendbildet viser en økning i slimcelleareal, slimcelletetthet (% dekning av overflate) og barrierestatus i vev fra både gjeller og skinn fra første uttak i juni til siste uttak i oktober. Dette sammenfaller med resultatene på gjellescore (Pharmaq Analytic). Tross økende barrierestatus fra start til slutt, er resultatene på epitel- og slimcelleanalysene ved samtlige uttak i begge fiskegrupper i intervallet som betraktes som normalområde for angitt fiskestørrelsen.

	Areal (μm^2)	Tetthet	Barrierestatus
Skinn	76,2-450,08	0,01-0,64	0,09-2,21
Gjellefilament	51,5-145,1	0,022-0,261	0,33-1,87
Gjellelameller	26,8-144,7	0,011-0,189	0,3-2,27

Tabell 3: Referanseverdier (min-maks intervall) slimcelleanalyser Quantidoc™ laks i sjøfase 1000-5000 gram.

Resultater av de enkelte vevsanalyser fremgår av figur 4-6.

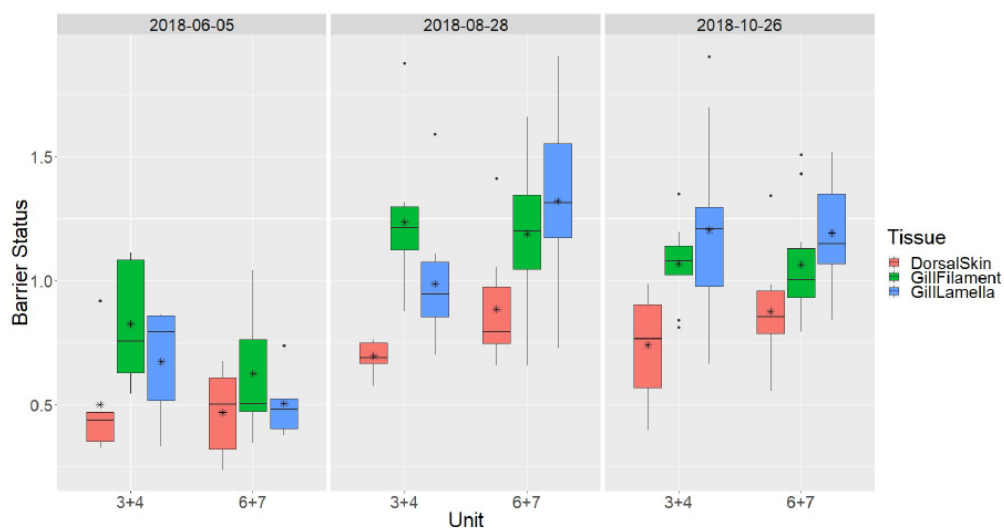


Fig 4: Gjennomsnittlig barrierestatus (modell R) skinn, gjellefilament og gjellelameller fra fisk i forsøksmerder (3+4) og referansemerder (6+7) ved de enkelte prøveuttak. Stjerne i boks-plottet viser gjennomsnittsverdi. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). N=50 fisk i 3 ulike vev, som tilsvarer 150 prøver.

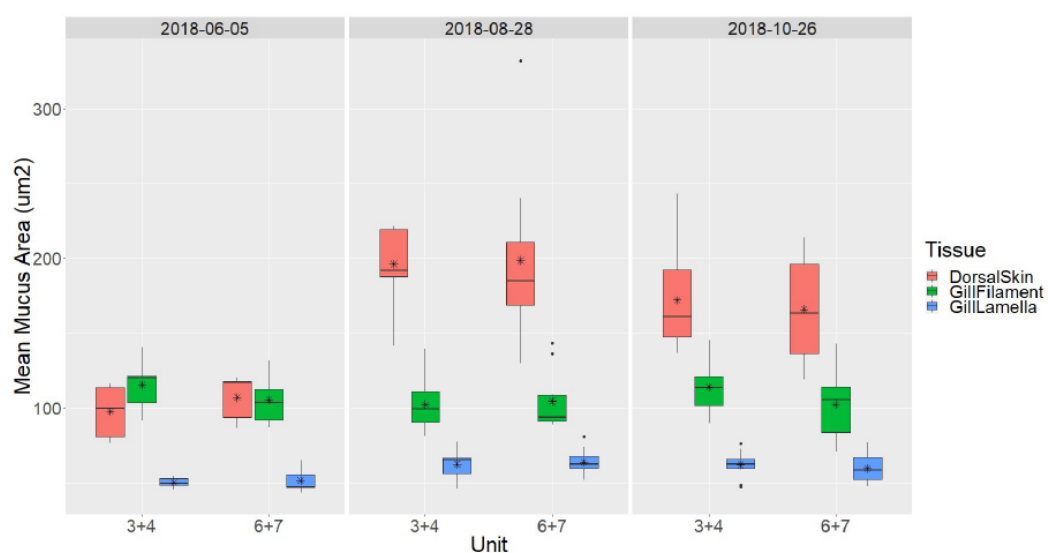


Fig 5: Gjennomsnittlig areal av slimceller i skinn, gjellefilament og gjellelameller fra fisk i forsøksmerder (3+4) og referansemerder (6+7) ved de enkelte prøveuttak. Stjerne i boks-plottet viser gjennomsnittsverdi. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). N=50 fisk i 3 ulike vev, som tilsvarer 150 prøver.

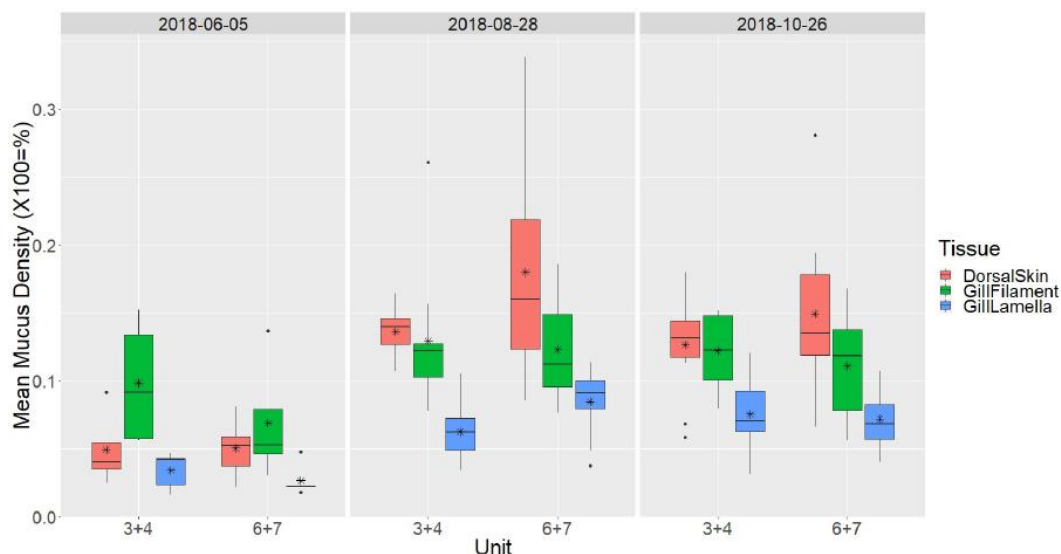


Fig 6: Gjennomsnittlig tetthet av slimceller i gjeller og hud fra fisk i forsøksmerder (3+4) og referansemerder (6+7) ved de enkelte prøveuttak. Stjerne i boks-plottet viser gjennomsnittsverdi. Vertikale linjer på søylene indikerer standard feil (SEM). N=50 fisk i 3 ulike vev, som tilsvarer 150 prøver.

Gjennomsnittlig areal av slimceller i gjeller fra fisk i både referanse- og forsøksmerder var tilnærmet likt (50-10µm) ved alle uttak. Tettheten av slimceller i gjelleprøvene er imidlertid litt lavere i juni vs midt- og sluttprøver i begge grupper. Dette er bakgrunnen for at barrierestatus for gjeller øker gjennom forsøksperioden. Forskjellene er imidlertid svært små og samtlige analyseresultatene faller innenfor normalområdet for gitt størrelse fisk. Tilsvarende trend sees på skinnprøver. Dette *kan* ha sammenheng med økt fiskestørrelse og tilvekst i løpet av prøvetakingsperioden. Stresspåvirkning som følge av lusepåslag og avlusinger utgjør også en mulig forklaringsfaktor.

Med bakgrunn i epitel og slimcelleanalysene anses fiskens skinn og gjellehelse for generelt god og lite påvirket av ytre faktorer. Det faktum at barrierestatus er gjennomgående god ved samtlige uttak, og det at utviklingstrenden er lik for alle vev gjennom forsøksperioden, tilsier at ferskvannstilsetning i forsøksmerkene ikke har påvirket fiskens slimlag og barrierestatus negativt.

Plasmaioner og osmotisk stress

Variasjoner i salinitet vil kunne oppleves som osmotisk stress og påvirke reguleringen av fiskens saltbalanse. Konsentrasjoner av plasma-ioner ble derfor valgt som indikator på osmotisk stressrespons for å undersøke hvordan ferskvannstilsetningen, i kombinasjon med mulig temperaturendring i øvre vannlag, påvirket blodkjemien. Målinger av konsentrasjoner av plasma-ioner (Cl^- , Na^+ , K^+ , Mg^{2+}) hos postsmolt laks på kystlokaliteter med fullt sjøvann er funnet å være sammenlignbare med målinger fra fjordlokaliteter med brakkvann (15-30 ‰) i øvre vannlag (Bergheim m.fl. 1990). Laks kan detektere salinitetsgradienter og justere adferd i henhold til disse (Stich m.fl. 2016), men studier av laksens adferd ved fjordlokaliteter tyder ikke på at salinitet påvirker laksens posisjon i merden > 3 mnd etter utsett (Johannson m.fl. 2007).

Statistisk behandling

Ved analyse av resultater ble uteliggere definert som $\pm 3\text{SD}$ fra gjennomsnitt av alle målinger per parameter, og ekskludert fra datasettet før statistiske tester. Ved første uttak (juni) ble det tatt prøver av 20 fisk fra én merd per behandling. Enveis ANOVA ble brukt til å undersøke effekt av behandling på plasmaparametere. Ved uttak i august og oktober ble det tatt prøver fra 20 fisk i to merder per behandling. Nøstet ANOVA, med replikat (randomisert) nøstet i behandling, ble brukt for å undersøke

effekt av behandling på plasmaparametere ved disse to uttakene. Signifikansnivå (α) på 0,05 er brukt i alle analyser.

Resultater

Før oppstart av ferskvannsbehandling i juni var det ingen forskjeller i ione-konsentrasjoner eller pH-verdier mellom fiskegruppene (Fig. 7 a- e). Resultatene fra det første uttaket skilte seg imidlertid fra midtprøvene, med lavere kaliumkonsentrasjoner, høyere pH og høyere klorid- (Cl^-) og natrium (Na^+)-verdier.

Etter oppstart av ferskvanntilsetning var det generelt sett liten forskjell i plasmaverdier mellom fisk fra forsøks- eller referansemerder. Det ble imidlertid observert en signifikant økning i plasma natrium- og kalsium (Ca^{2+})- konsentrasjoner hos fisk i enheter med ferskvannsinnblanding i august, og en signifikant økning i plasma Na^+ ved siste uttak i oktober. Det var ikke signifikante effekter av behandling på plasma pH, plasma K^+ og Cl^- -konsentrasjoner ved uttakene i august og oktober.

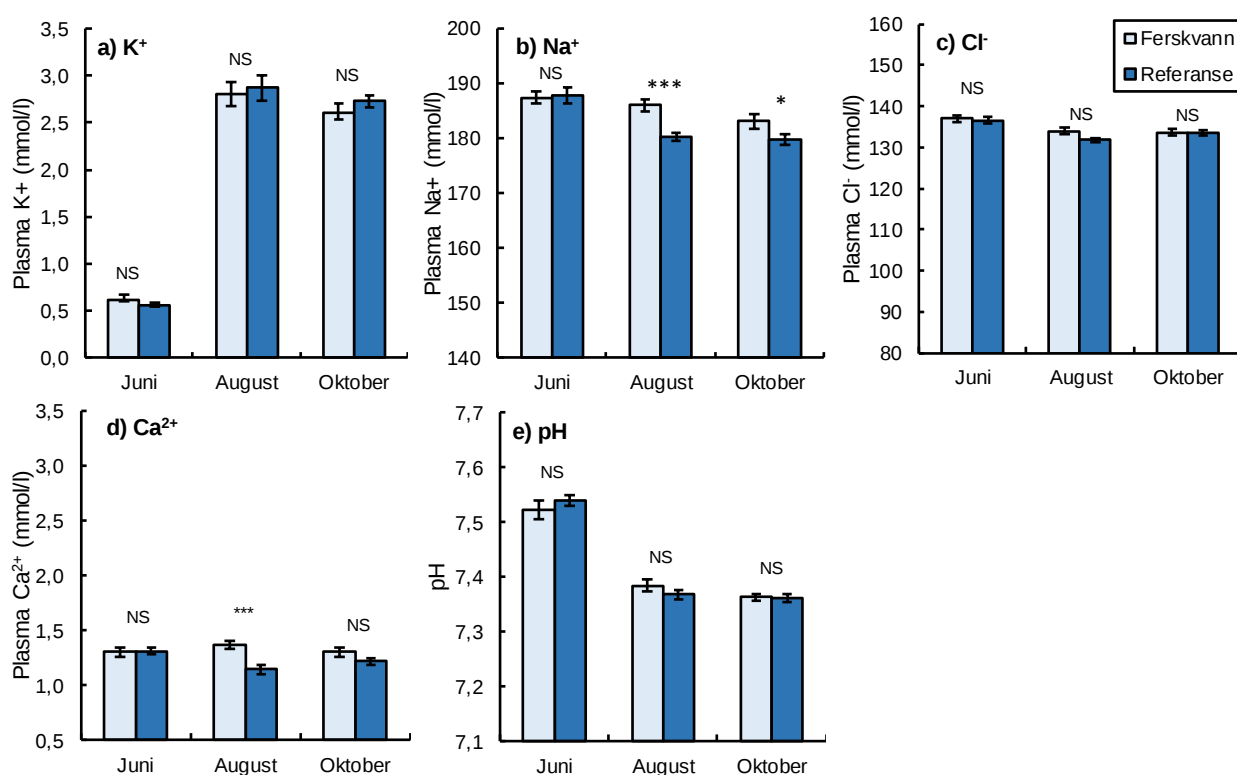


Fig. 7a-e. Gjennomsnittlig ($\pm$ SE) konsentrasjon av plasma-ioner (a-d) og plasma pH (e) hos laks fra merder med (Ferskvann) og uten (Referanse) innblanding av ferskvann i det øvre vannlaget. Statistisk signifikante forskjeller mellom gruppene på et gitt tidspunkt er markert med * ($p < 0,05$) eller *** ($p < 0,001$). NS står for ikke signifikant effekt. $N = 18-20$ (juni) eller $37-40$ (august, oktober).

Eksisterende kunnskap tilsier at temperatur- og salinitetsprofilen i merdene med ferskvannsinnblanding ikke skal medføre osmoreguleringsutfordringer for postsmolt og voksen laks (Bakke m.fl. 2000, Bergheim m.fl. 1990, Johansson m.fl. 2007). CTD-sondetrekk og CTD-profiler fra forsøksmerd 3 viser at saltholdigheten i øvre vannlag periodevis var påvirket av ferskvannstilførselen, men også at påvirkningen varierte mye og til tider var veldig grunn (ref. prosjektets delrapport 9290-1). Generelt var temperatur- og salinitetsendringene i øvre vannlag moderate i løpet av forsøksperioden, og fisken hadde mulighet til å oppsøke dypere vannlag med temperatur- og salinitetsnivå som den var akklimatisert til. Dette tilsvarer en situasjon som ikke er uvanlig ved norske fjordlokaliteter (Oppedal m.fl. 2011). Resultatene fra forsøket var i tråd med dette. Det var få observerte forskjeller i ione-konsentrasjoner hos fisk hentet fra merder med eller uten ferskvannsinnblanding, og de målte verdiene var i hovedsak i tråd med referanseverdier for postsmolt

og voksen laks (Bakke m.fl. 1991, Bergheim m.fl. 1990, Braceland m.fl. 2017, Fraser m.fl. 2015, Noble m.fl. 2017, Solstorm m.fl. 2015, Wade m.fl. 2019).

Unntakene var kalsium- og natriumverdier, som ved henholdsvis ett og to uttak (anmerket med * i Fig.7 b) og d)) var signifikant høyere hos fisk fra forsøksmerkene. Det vurderes som lite sannsynlig at redusert salinitet i øvre vannlag har resultert i de observerte økningene i plasmanatriumnivå i denne gruppa. Hos fisk som har blitt utsatt for redusert salinitet i kontrollerte laboratorieforsøk, har man observert motsatt effekt på plasmanatriumnivå (Bakke m.fl. 1991). Natriumkonsentrasjonene var også generelt sett høye i begge grupper, sett i forhold til tidligere observasjoner hos postsmolt og voksen laks. Det har imidlertid tidligere blitt påvist store variasjoner i konsentrasjoner av plasma-natrium hos laks i sjøfasen (Bergheim m.fl. 1990), og det har blitt vist at en fysiologisk stressrespons kan føre til økt konsentrasjon (Fraser m.fl. 2015). Det ble i dette tilfellet brukt avkastnot for innhenting av fisk, og det var ikke mulig å oppnå identiske miljø-, drifts og prøvetakingsbetingelser i de ulike merkene. Faktorer som sjøtemperatur, prøvetakingsmetode og -tidsforløp kan ha påvirket fysiologiske stressparametere, inkludert plasma-ioner (McDonald and Millian 1997, Sambraus m.fl. 2017, Madaro m.fl. 2018). Det vurderes derfor som mer sannsynlig at de observerte forskjellene mellom hhv forsøks- og referansemerker kan knyttes til slike variabler enn at forskjellene kan tilskrives salinitetsforskjeller i øvre vannlag.

Når det gjelder kalsium (Ca^{2+}), så har det blitt observert høyere nivå av divalente ioner (Mg^{2+}) hos fisk utsatt for en brå reduksjon i salinitet (Bakke et al. 1991). Av samme grunner som over, regnes det som lite sannsynlig at forskjellen i salinitet i øvre vannlag har forårsaket denne økningen. De observerte nivåene av plasma-kalsium (1,1-1,4 mmol/l) var lavere enn det som tidligere er observert hos postsmolt- og voksen laks (2,3-4,7 mmol/l) i fisk fra merder både med og uten ferskvannsinnblanding (Bergheim m.fl. 1990, Braceland m.fl. 2017, Noble m.fl. 2017, Wade m.fl. 2019). Hva dette skyldes er usikkert, men det kan ikke utelukkes at prøvetakingsbetingelsene har spilt en rolle.

Katarakt

Katarakt beskriver forekomst av uklarhet i øyets linse eller linsekapsel. En rekke faktorer har vært koplet til utvikling av katarakt eks. ernæringsmessige mangler, rask vekst, osmotisk ubalanse, infeksjonstilstander, genetiske faktorer, og raske endringer i salinitet og økt temperatur (Bjerkås m.fl., 2004, Bjerkås m.fl. 2006). Det er kjent at nyutsatt laks kan utvikle katarakt i tilknytning i sjøvannseksposering. Slike osmotiske katarakter er vanligvis reversible, og kan knyttes til en midlertidig tilstand hvor linsens osmoreguleringsevne tilpasses saliniteten i sjøvann (Iwata, M. m.fl., 1987). Kataraktutvikling ble kartlagt for å dokumentere om laksens opphold og passering over ferskvannsgradienten som var forventet å oppstå, ville påvirke linsens osmotiske kapasitet og resultere i kataraktutvikling.

Forekomst og omfang av katarakt ble undersøkt visuelt ved bruk av spaltelampe og lupe. Størrelsen på kataraktforandringene ble angitt med en scoreverdi fra 0 til 4 med referanse til dekningsgrad på hvert øye (Wall og Bjerkås 1999). Scoreverdi ble deretter summert per individ for begge øyne og angitt med en totalscore i intervallet 0-8. Snittscoreverdier og gjennomsnittlig prevalens av katarakt på merdnivå ble beregnet. Prøveuttakene omfattet 20 fisk fra én merd per behandling i juni, mens midt- og sluttprøver inkluderte 20 fisk fra begge merder i hver behandlingsgruppe. Totalt antall individer analysert var N=200.

Scoreverdi	Omfang katarakt
0	Ingen katarakt
1	< 10% av linsen
2	10-50% av linsen
3	50-75 % av linsen
4	> 75 % av linsen

Tabell 4: Scoreverdier for katarakt ble angitt 0-4 per øye basert på dekningsgrad av linse.

Resultater

Gjennomsnittlig prevalens av katarakt varierte på merdnivå fra 30-61 % ved de enkelte prøveuttakene (Figur 8). Ved juni-uttaket, som representerte før-tilstand og basis for sammenligning og utvikling av katarakt i fiskegruppene, var prevalensen hhv 60 og 50%. Generelt sees en tilnærmet uforandret prevalens på merdnivå fra juni til oktober i begge grupper. Unntaket er midtprøvene (august) fra merder med ferskvannstilsetning (3 og 4), hvor prevalensen er betydelig lavere enn ved øvrige uttak. For begge referansemerkene var prevalensen tilnærmet lik ved alle prøvetakingstidspunkt. Generelt vurderes prevalensen av katarakt som høy ved samtlige uttak i begge grupper.

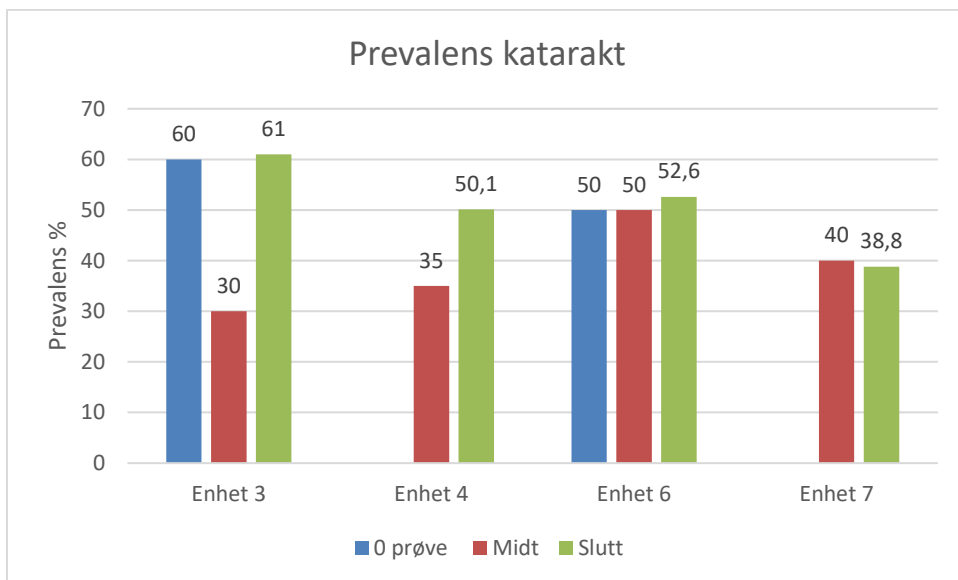


Fig 8: Prevalens av katarakt (%) angitt per prøveuttak for forsøksmerder (3+4) og referansemerder (6+7). Fremstillingen omfatter observasjon av både ensidige og tosidig kataraktforandringer.

Gjennomsnittlig scoreverdi var lav i begge fiskegrupper (gj.snittsverdi < 1.44, intervall 0,45-1,44) ved alle prøveuttak. Kataraktforandringene som ble observert var altså svært milde og i mange tilfeller kun ensidige. Det var også liten variasjon i gjennomsnittlig scoreverdi ved de enkelte prøveuttak i hhv ferskvannstilsatte merder og forsøksmerder fra oppstart til slutt, med unntak av midtprøven fra merder med ferskvann hvor snittscore var tilnærmet halvert (se Fig.9).

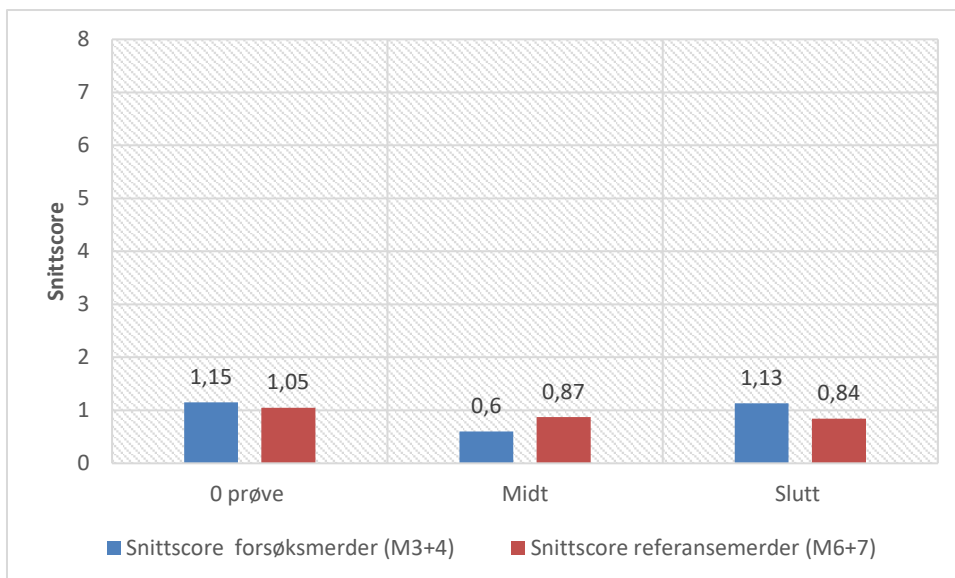


Fig 9) Gjennomsnittlig scoreverdi av katarakt i forsøksmerder (3+4) og referansemerder (6+7) ved de enkelte prøveuttak.

Vi har ikke identifisert noen forklaringsfaktor for lavere prevalens og gjennomsnittlig størrelsen på katarakt i midtprøveuttaket i gruppen med ferskvannstilførsel. Osmotisk stresspåvirkning på øyelinsa som en følge av variasjon i salinitet i øvre vannlag tiliser en forventning om utvikling av osmotisk katarakt, dvs. en økning i prevalens og scoreverdi i denne fiskegruppen. Det vurderes derfor som lite sannsynlig at den etablerte ferskvannsgradienten kan knyttes til dette funnet.

Det kan imidlertid ikke utelukkes at et begrenset utvalg individer for prøvetaking (N20) i den enkelte merd kan ha påvirket resultatene. Det faktum at analyseresultatene for øvrig viser en stabil prevalens og scoreverdi av katarakt i ferskvannsgruppen fra start til slutt, tiliser at salinitetsgradienten man oppnådde ikke har påvirket øyelinse og resultert i utvikling av osmotisk katarakt i forsøksperioden.

Det anmerkes ellers at det ved prøveuttakene i samtlige merder ble observert enkeltindivider med både katarakt og øyebldninger (Bilde 4). Det var kjent at høstfisker (0-åring 2017G) på lokaliteten hadde fått påvist parvicapsulose (*parvicapsula pseudobranchicola*). Denne fiskegruppen var ikke en del av forsøket, men sto i nabomerder på samme lokalitet. Påvisning av parasitten var forbundet med kliniske symptomer og obduksjonsfunn, økt dødelighet og sårutvikling på 0-åringene første vinter i sjø. Øyebldninger og katarakt er en del av det kliniske bilde hos infisert fisk (ref Hjeltne og Bornø Fiskehelserapporten Veterinærinstituttet 2017). Det kan ikke utelukkes at også fiskegruppen med vårfisk (som utgjorde fisk i referanse- og forsøksmerder) ble eksponert for smitte høsten 2017. Det anmerkes imidlertid at parvicapsulose ikke var påvist på denne fiskegruppen. Helsehistorikken beskriver heller ikke kliniske funn forenlig med smitte.



Bilde 4: Fisk med øyebldning og katarakt

Videre anmerkes at det ved prøvetaking i august og oktober også ble observert innslag av fisk med traumeskader på hornhinne. Funnet knyttes til hoppeskader som en følge av lusepåslag (skottelus) og håndteringsskader i tilknytning til avlusingsoperasjonene.

Kjønnsmodning

Kjønnsmodningen hos laksefisk blir sett på som en syklisk prosess som begynner ved befruktning, og som kontinuerlig undertrykkes inntil inhibitorene fjernes. Dette gjør at kjønnsmodningen ikke skjer ved en spesifikk alder eller størrelse, men ved første mulighet der fisken utviklingsmessig er klar, og de hemmende signalene opphører (Polansky 1983, Thorpe 2007). Kjønnsmodningen kontrolleres og synkroniseres av en rekke faktorer. Sesongmessige endringer i daglengde blir sett på som den viktigste tidgiveren, men både vanntemperatur, ernæringsstatus, salinitet og andre faktorer virker i samspill med daglengde for å kontrollere og synkronisere prosessen (Taranger et al. 2010, Good and Davidsson 2016). Under kjønnsmodningen gjennomgår laksen fysiologiske tilpasninger til et hypo-osmotisk (ferskvann) miljø. Det er derfor sannsynlig at oppdrettslaks som kjønnsmodner i sjø vil få osmoregulatoriske problemer. Endring i hormonell aktivitet (kjønns hormoner, kortisol og veksthormon), kan påvirke fiskens immunologiske kapasitet og resultere i økt mottakelighet for sykdom og redusert velferd (Taranger m.fl. 2010).

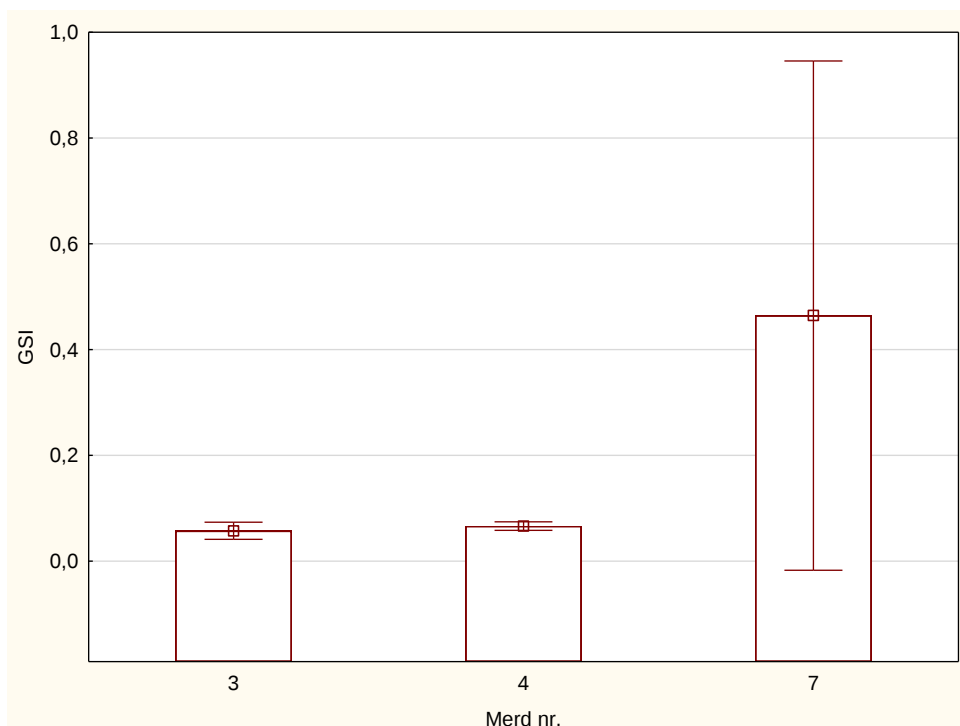
For å kartlegge om ferskvannstilsetning ville ha innvirkning på kjønnsmodningsprosessen, ble modningsstatus undersøkt hos 20 tilfeldig hann-fisk fra forsøks- og referansemøder i tilknytning til utslakting. Hann-gonader ble dissekert ut, veid, og gonadosomatisk indeks (GSI) beregnet (gonadevekt i forhold til kroppsvekt) som et mål for modningsstatus. Dessverre gikk tallmateriale på GSI fra merd 6 tapt under prøvetaking, og kun materiale fra merd 7 representerer referansemateriale for sammenligning av modningsstatus.

Informasjon fra kvalitetskontroll av slaktefisk ble også innhentet for kartlegging av antall laks som ble nedklassert på grunn av kjønnsmodning. Dataene omfattet tilfeldig utvalgte klassifiseringsdata fra 100 fisk i hhv. forsøks- og referansemøder ved utslakting (N=400). Identifikasjon av kjønnsmodning ved kvalitetskontroll var basert på visuell vurdering av slaktefisk og observasjon av fisk med tydelig kjønnsdrakt.

Resultater

I rapporter fra utvalgte kvalitetskontroller ble det kun funnet 1/400 fisk med nedklassingsårsak: morfologiske kjønnsmodningskarakteristika. Funnet ble gjort i en av referansemøderne (merd 7). Observasjon av én fisk med gytedrakt i tilknytning til kvalitetssortering ved slakteriet ansees som et tilfeldig funn.

GSI hos hann-fisk i forsøksmøder og referansemørd (enhet 7) fremgår av Fig 10. Det ble ikke funnet modne hanner i møder med ferskvannstilsetning. Den høyeste observerte GSI-verdien (gonadevekt angitt som % av kroppsvekt) var 0,11%, som tilsier at fisken er umoden (Fjelldal m.fl. 2011). GSI var signifikant høyere for referansemørd (0,46 ($\pm 0,87$)) sammenlignet med merd 3 (0,057 ($\pm 0,03$)) og merd 4 (0,066 ($\pm 0,02$)) med ferskvannstilførsel (SNK-test, $p < 0,05$).



Figur 10. Resultater GSI (gonadevekt gramx100/kroppsvekt) basert på analyser av 20 fisk fra merder med ferskvannstilførsel (3+4) og referanse (merd 7).

Forskjellen skyldtes at 3 av 20 fisk i referansemerden hadde tydelig modne gonader med GSI på hhv. 1,28, 2,73 og 2,92. Dette utgjorde 15% kjønnsmodningsandel for denne merden sammenlignet med 0 i merden med ferskvannstilsetning. Det finnes ingen god forklaringsmodell for denne forskjellen. Ved ekskludering av disse kjønnsmodne individene var det imidlertid ingen forskjell i GSI mellom gruppene ($p=0,37$). Fravær av kjønnsmodne hanner og generelt lav GSI tilsier at ferskvannsadministrasjon ikke har påvirket kjønnsmodning.

Sammendrag og konklusjon

Forsøket som ble gjennomført omfattet utprøving av metode for administrasjon av ferskvann og etablering av ferskvannsgradient i overflatelag i merd omgitt av en 2 m dyp lense. Målorganismen i forsøket var frittlevende luselarver, og målsetningen var å prøve ut om metoden og effekten av ferskvann ville redusere påslag av lakselus på fisk. Kartlegging og dokumentasjon av effekt av ferskvannstilsetning på fiskens helse og velferd inngikk også i utprøvingen.

Fiskens helse og velferd ble kartlagt gjennom regelmessig helsemessig oppfølging (fiskehelsetjenesten) og målrettet prøvetaking. Prøvetaking omfattet gjellehelse, barrierestatus (skinn og gjeller), kataraktutvikling, kjønnsmodning og analyser av plasmaioner (osmotisk stress). Analyseresultater fra vevs-spesifikk prøvetaking av gjeller og skinn tilsa at gjellehelse og barrierestatus var god gjennom hele utprøvningsfasen i begge merder med ferskvannstilførsel. Det ble ikke funnet statistisk signifikant forskjell i gjellescore mellom ferskvannstilsatte merder og referansemerder, men en generell tendens til bedre gjellescore i begge fiskegrupper fra start til slutt av utprøvningsperioden. Det var få observerte forskjeller i konsentrasjoner av plasmaioner fra fisk i merder med eller uten ferskvannsinnblanding, og de målte verdiene var i hovedsak i tråd med referanseverdier. Det ble ikke gjort funn som tilsa at salinitetsgradienten man oppnådde hadde påvirket øyelinse og resultert i utvikling av osmotisk katarakt. Kataraktforandringene som ble observert var svært milde (lav scoreverdi) i samtlige grupper, og varierte lite fra oppstart til slutt. Gjennomsnittlig prevalens av katarakt var imidlertid høy i begge fiskegrupper ved alle prøveuttak. Parvicapsulose er trukket frem som en mulig forklaringsfaktor for funnene. Det ble ikke identifisert kjønnsmodne hanner eller høyere GSI i merder med ferskvannstilsetning.

Dødelighet og kliniske observasjoner av betydning for fiskens helse og velferd i utprøvningsperioden, kunne i alle hovedsak relateres til betydelig forekomst av skottelus på fisk og lusebehandlingene som ble gjennomført mens forsøket pågikk. Dødelighetsutvikling gjennom hele forsøksperioden viste økende dødelighet i alle merder med stigende sjøtemperatur. Generelt anses dødeligheten imidlertid som lav i alle merder fra forsøksstart til utslakting.

Overordnet målsetning med metoden som ble utprøvd var å oppnå en velferdsgevinst for fisk gjennom redusert lusepåslag og påkrevde behandlingstiltak. Mens forsøket pågikk ble det likevel nødvendig å gjennomføre to ikke-medikamentelle behandlinger (thermolicer) som følge av høye lusetall. Behandlingene omfattet både forsøks- og referansemerder, og resulterte i forøket dødelighet, observasjon av mekaniske skader på fisk. Analyseresultater fra målrettet prøvetaking for å kartlegge effekten av ferskvannadministrasjon på fiskevelferd, gav ikke grunnlag for å knytte ferskvannstilførselen til redusert helse og velferd.

Nasjonalt er avlusing en betydelig årsak til direkte og indirekte dødelighet, og velferdsutfordringene for oppdrettsfisk er særlig knyttet til økende bruk av ikke-medikamentelle avlusingsmetoder (Fiskehelserapporten, Veterinærinstituttet 2018). Da det på tross av ferskvannstilsetting ble nødvendig å gjennomføre avlusingstiltak i forsøksperioden, har metoden ikke gitt ønsket gevinst på fiskevelferden. Det er imidlertid ikke gjort funn ved prøvetakingen som tilsier at ferskvannsadministrasjonen isolert sett, har påvirket fiskens helse og velferd negativt. Metoden vurderes derfor velferdsmessig forsvarlig og egnet ut fra hensynet til fiskens velferd (jf. dyrevelferdsloven § 8 og akvakulturdriftsforskriften § 20).

Referanser

- Bakke, H., Bjerknes, V., & Øvreeide, A. (1991). Effects of rapid changes in salinity on the osmoregulation of postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 96(3-4), 375-382.
- Bergheim, A., Kroglund, F., Vatne, D. F., & Rosseland, B. O. (1990). Blood plasma parameters in farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) transferred to sea cages at age eight to ten months. *Aquaculture*, 84, 159-165.
- Bjerkås E, Holst J.Chr, Bjerkås Inge. (2004) Cataracts in farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Review. *Animal Eye Res.* 23, 3-13, 2004.
- Bjerkås E, Breck O, Waagbø R. (2006) The role of nutrition in cataract formation in farmed fish. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 2006; 1
- Bjerkås, E., Sveier, H. (2004) The influence of nutritional and environmental factors on osmoregulation and cataracts in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 235, 101–122
- Braceland, M., Houston, K., Ashby, A., Matthews, C., Haining, H., Rodger, H., & Eckersall, P. D. (2017). Technical pre-analytical effects on the clinical biochemistry of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of fish diseases*, 40(1), 29-40.
- Fjelldal, P. G., Hansen, T., Huang, T. S. (2011). Continuous light and elevated temperature can trigger maturation both during and immediately after smoltification in male Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 321(1), 93-100.
- Fraser, T. W., Fjelldal, P. G., Hansen, T. J., Oppedal, F., Olsen, R. E., Vågseth, T., & Remen, M. (2014). Aplasia of the septum transversum has no effect on plasma biochemistry following an acute hypoxic event in Atlantic salmon. *Diseases of aquatic organisms*, 111(1), 87-92.
- Good, C., Davison, J. 2016. A review of factors influencing maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with focus on water recirculation aquaculture system environments. *J. World Aquac. Soc.* 47, 605-632.
- Grefsrud, E.S., Glover, K., Grøsvik, B.E., Husa, V., Karlsen Ø., Kristiansen T., Kvamme B.O., Mortensen S., Samuelsen, O.B., Stien, L.H., Svåsand, T. (2018). Risikoreport norsk fiskeoppdrett 2018. Fisken og havet, særnr. 1-2018.
- Hjeltnes, B., Bang-Jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A., Walde, C. S. (2018) Fiskehelserapporten 2017, Veterinærinstituttet.
- Iwata, M., Komatsu, S., Collie, N.L., Nishioka, R.S., Bern, H.A. (1987): Ocular cataract and seawater adaptation in Salmonids. *Aquaculture*, 66: 315-327.
- Johansson, D., Juell, J. E., Oppedal, F., Stiansen, J. E., & Ruohonen, K. (2007). The influence of the pycnocline and cage resistance on current flow, oxygen flux and swimming behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in production cages. *Aquaculture*, 265(1-4), 271-287.
- Madaro, A., Folkedal, O., Maiolo, S., Albanopoulou, M., & Olsen, R. E. (2018). Effects of acclimation temperature on cortisol and oxygen consumption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolt exposed to acute stress. *Aquaculture*, 497, 331-335.
- McDonald and Milligan (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Stress and Health in aquaculture. Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P, Schreck, C.B (eds.). Cambridge: Cambridge University Press 119-145.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J. & Gismervik, K. (2018). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. Kapittel 3, Dyrebaserte indikatorer, s- 27-82 (328pp). ISBN 978-82-8296-531-6.
- Oppedal, F., et al., (2010) Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: A review, *Aquaculture*, doi:[10.1016/j.aquaculture.2010.11.020](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.020)
- Oppedal, F., Dempster, T., & Stien, L. H. (2011). Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: a review. *Aquaculture*, 311(1-4), 1-18. Smith, L.S., 1982. Introduction to Fish Physiology. T.F.H Publications, Hong Kong, UK. (352 pp).
- WallPittman et al (2013) Body Site matters: an evaluation and application of a novel histological methodology on the quantification of mucous cells in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 36, 115-1.

- Samraus, F., Olsen, R. E., Remen, M., Hansen, T. J., Torgersen, T., & Fjelldal, P. G. (2017). Water temperature and oxygen: The effect of triploidy on performance and metabolism in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture*, 473, 1-12.
- Solstorm, F., Solstorm, D., Oppedal, F., Fernö, A., Fraser, T. W. K., & Olsen, R. E. (2015). Fast water currents reduce production performance of post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Environment Interactions*, 7(2), 125-134.
- Stich, D. S., Zydlewski, G. B., & Zydlewski, J. D. (2016). Physiological preparedness and performance of Atlantic salmon *Salmo salar* smolts in relation to behavioural salinity preferences and thresholds. *Journal of fish biology*, 88(2), 595-617.
- Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E. and Hansen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* 165 483-515.
- Wade, N. M., Clark, T. D., Maynard, B. T., Atherton, S., Wilkinson, R. J., Smullen, R. P., & Taylor, R. S. (2019). Effects of an unprecedented summer heatwave on the growth performance, flesh colour and plasma biochemistry of marine cage-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Thermal Biology*, 80, 64-74.
- Wall, T., Bjerkås, E., (1999). A simplified method of scoring cataracts in fish. *Bull. Eur- Ass. Fish. Pathol.* 19 (4), 162.