NYBRØK

Effekt av vannkvalitet, akkumulerte stoffer og trykkforhold på laks ved tre ulike brønnbåtoperasjoner

Feltrapport AP2.2 og AP3.3

Silje Stensby-Skjærvik[1], Torolf Storsul[1], Sara Calabrese[2], Frida Sol Svendsen[2], Ole-Kristian Hess-Erga[2], Lauris Boissonnot[1], Alf Seljenes Dalum[1]

[1] Aqua Kompetanse AS, 7770 Flatanger, Norge
[2] NIVA AS, Bergen, Norge

Oktober 2024

Forslag til sitering: Stensby-Skjærvik S, Storsul T, Calabrese S, Svendsen FS, Hess-Erga OK, Boissonnot L, Dalum AS (2024). NYBRØK - Effekt av vannkvalitet, akkumulerte stoffer og trykkforhold på laks ved tre ulike brønnbåtoperasjoner. Feltrapport AP2.2 og AP3.3. FHF-prosjektnummer 901788 «Ny brønnbåtkunnskap – biologiske risikofaktorer ved bruk av brønnbåt til transport og behandling av laks (NYBRØK)».

Aqua Kompetanse
Org. nr. 982 226 163
Havbruksparken
Storlavika 7 - 7770 Flatanger
www.aqua-kompetanse.no

Tittel

NYBRØK - Effekt av vannkvalitet, akkumulerte stoffer og trykkforhold på laks ved tre ulike brønnbåtoperasjoner. Feltrapport AP2.2 og AP3.3.
FHF-prosjektnummer 901788.

Forfattere

Silje Stensby-Skjærvik[1], Torolf Storsul[1], Sara Calabrese[2], Frida Sol Svendsen[2], Ole-Kristian Hess-Erga[2], Lauris Boissonnot[1], Alf Seljenes Dalum[1]

[1] Aqua Kompetanse AS, Flatanger, Norge
[2] NIVA, Bergen, Norge

Prosjektleder

Ole-Kristian Hess-Erga (NIVA)

Kontaktperson Aqua Kompetanse AS

Silje Stensby-Skjærvik, silje@aqua-kompetanse.no

Dato

03.10.2024

Rapportnummer Aqua Kompetanse AS

P.1644.03102024

Sammendrag

Det ble utført en feltstudie av 3 ulike typer brønnbåtoperasjoner som dekket både undersøkelser for akkumulerte stoffer, trykk, totalgassmetning og gassboblesyke. Feltstudien hadde som hovedmål å sammenligne funnene under kommersielle forhold med resultatene fra kontrollerte forsøk gjennomført i AP2 og AP3 i NYBRØK (FHF-901788)-prosjektet. Det var også ønskelig å vurdere egnetheten i felt for de diagnostiske metodene etablert i de kontrollerte forsøkene.

Det ble gjennomført to gjentagende laster for tre ulike håndteringsoperasjoner utført av tre ulike brønnbåter (3 typer brønnbåtoperasjoner):

- BRØNNBÅTOPERASJON 1: Ferskvannsbehandling med revers osmose (RO)-vann (lasting via dewater, avlusing i ferskvann, lossing via dewater)
- BRØNNBÅTOPERASJON 2: Ferskvannsbehandling med påfølgende termisk avlusing (lasting via dewater, avlusing i ferskvann, lossing via dewater og termisk avlusingsenhet)
- BRØNNBÅTOPERASJON 3: Slaktetransport (lasting uten dewater, lukket transport første del av turen, semilukket transport siste del av turen, lossing uten dewater)

Sink og akkumulerte stoffer
Vannkvalitet og akkumulerte stoffer under brønnbåtoperasjonene ble vurdert gjennom vannprøver og gjennomgang av data fra sensorer om bord i båtene. Fra alle tre brønnbåtoperasjoner ble to etterfølgende runder (behandlinger eller laster) undersøkt. Fra hver runde ble replikate prøver tatt ut fra merd, brønnvann før lasting, halvveis og ved lossing av operasjonen.

Mange fysiologiske funksjoner hos fisken påvirkes av pH i blodet, som igjen påvirkes av pH i vann. pH kontrollerer en rekke løselighets- og likevektsreaksjoner, som forholdet mellom ammonium (NH^{4+}) og ammoniakk (NH_3). pH virker også inn på giftigheten av hydrogensulfid og totalkonsentrasjoner av løste metaller (aluminium, jern, kobber, kadmium og sink). Derfor er en jevn og stabil pH ønskelig. For laksefisk er det anbefalt en pH mellom 6,2 og 7,8 i ferskvann. Normalt har sjøvann en pH rundt 8, der variasjonen i hovedsak er relatert til ulik salinitet. I oppdrettssammenheng vil CO_2 akkumuleres i vannet og føre til redusert pH, avhengig av utluftingseffektiviteten. Generelt har sjøvann større bufferkapasitet enn ferskvann og derfor en mer stabil pH. Ved alle tre brønnbåtoperasjoner var pH innenfor angitte intervaller, men sank underveis i behandlingen/runden pga. økende konsentrasjon av CO_2, opp til nivået hvor utluftingskapasiteten kompenserte fiskens produksjon av CO_2. Ved overgangen fra ferskvannsbehandling til termisk avlusning med sjøvann ble det målt en brå pH-økning ved start, men denne forskjellen ble mindre etterhvert.

Under ferskvannsavlusing med RO-vann (brønnbåtoperasjon 1) ble den høyeste målingen av totalt ammonium nitrogen (TAN) og den beregnede ammoniakkonsentrasjonen registrert i brønn før lasting av fisk trolig grunnet gjenbruk av vannet. Etter hvert i behandlingen sank pH og dermed også ammoniakkonsentrasjonen. Ved ferskvannsavlusing etterfulgt av termisk behandling (brønnbåtoperasjon 2), steg NH_3-N raskt under den termiske behandlingen i sjøvann og overskred anbefalt grenseverdi for langtidseksponering på 12 µg/l, men var fortsatt under den anbefalte grenseverdien for kortvarig eksponering (4 timer) til NH_3 på 100 µg/l. NH_3-N økte under slaktetransporten (brønnbåtoperasjon 3), men var lav (maks 1,1 µg/l).

I ferskvannsbehandlingen med RO-vann (brønnbåtoperasjon 1) ble det målt relativt høye totalkonsentrasjoner av sink i brønnene ved start, noe som enten indikerer gjenbruk av vann eller akkumulering i forkant. Det var også en økning under den ca. 10 timer lange ferskvannsbehandlingen, og ved lossing last 2 var den gjennomsnittlige totale sinkkonsentrasjonen i brønnen 690 µg/l. Det ble ikke observert vevsskader i gjellene hos fisken. Sammenlignet med tidligere gjennomførte kontrollerte forsøk i samme prosjekt, lå sinkkonsentrasjonene det som ble definert som moderat (400 µg/l) og høy dose (800 µg/l). I kontrollerte forsøk førte slike konsentrasjoner til skadet gjellevev, osmoregulatorisk svikt og dødelighet etter 8 timers simulert behandling. At sink ikke har påvirket fisken i like stor grad under brønnbåtoperasjon 1 med RO-vann kan skyldes at hardhet og særlig kalsiumkonsentrasjonen var 5 ganger høyere enn i de kontrollerte forsøkene. Zn^{2+} og Ca^{2+} konkurrerer om samme opptaksvei via gjellene og derfor vil en økt Ca^{2+}-konsentrasjon i vannet beskytte mot sink-toksisitet. For brønnbåtoperasjon 2 og 3 ble det målt betydelig lavere totalnivå av sink; høyeste nivå (53,5 µg/l) ble målt i termisk behandlingenhet for brønnbåtoperasjon 2.

Trykkendringer, totalgassmetning og gassboblesyke

Ved lasting via dewater og ferskvannsavlusing (brønnbåtoperasjon 1) ble det målt nivåer av totalgassovermetning som potensielt kunne føre til gassboblesyke hos laksen i brønnene. Hos laks som ble undersøkt etter å ha blitt eksponert for slik totalgassovermetning ble det ikke observert gassbobler ved første ultralydundersøkelse, men det ble derimot hos en betydelig andel av de samme individene observert gassbobler i hjertet (atriet) og lever ved den etterfølgende obduksjonen. For å undersøke ultralydmetodikken nærmere ble det gjort undersøkelser med ultralyd på ulike tidspunkter i prøvetakingskjeden. Enkelte individer uten påviste gassbobler ved første ultralyd etter sedasjon, viste forekomst av betydelige mengder gassbobler etter blodprøve- og/eller gjelleuttak både ved ultralyd og makroskopisk vurdering ved obduksjon. Det ble ikke observert bobler i finner. For ferskvannsavlusing etterfulgt av termisk avlusing (brønnbåtoperasjon 2) var det lavere grad av totalgassovermetning enn i brønnbåtoperasjon 1, og ved slaktetransporten (brønnbåtoperasjon 3) var det kun små trykkdifferanser og liten grad av totalgassovermetning. I brønnbåtoperasjon 2 og 3 ble det kun påvist gassbobler hos et fåtall individer ved ultralydundersøkelse, også da først etter blod- eller gjelleprøvetaking. Det ble heller ikke funnet gassbobler i finner. Det ble i begge disse brønnbåtoperasjonene observert flere tilfeller av makroskopisk gass i atriet og lever i forbindelse med obduksjon. Funn av gassbobler makroskopisk ved obduksjon av fisk ved slakteransport, og enkeltfunn med forekomst av gassbobler hos kontrollfisk tyder på at artefakter kan være en del av forklaringen, grunnet relativt lav grad av totalgassovermetning.

Det ser derfor ut til at små mengder gassbobler i hjertet ved obduksjon kan forekomme som et artefakt, men større mengder bobler, og høyest prevalens i brønnbåtoperasjonen med størst totalgassmetning, gjør at gassboblesyke ikke kan utelukkes som en forklaring i flere av tilfellene. I humanmedisinen, for å skille mellom fatal gassboblesyke, iatrogen luftemboli (kunstig tilført gass i blod) og gass dannet fra bakteriell aktivitet etter døden, er det etablert en makroskopisk gass-score for kvantifisering av mengde makroskopisk observerbar gass post mortem, med god diagnostisk verdi. Etablering av en lignende standardisert semi-kvantitativ score av makroskopisk gass hos fisk, kan bidra til å avklare årsaksforhold og mulig klinisk betydning av lignende funn i fremtiden. Slik vurdering av gass-score er hos fisk antakelig nødvendig å utføre før større karstrukturer kuttes. Ultralyd er trolig et egnet verktøy for diagnostisering av gassboblesyke i felt, men det er nødvendig med mer arbeid for å forstå det kliniske bildet og utvikle en mer optimal diagnostikkprotokoll.

Innhold

1 Forord **5**

2 Introduksjon **6**

3 Materiale og metode **8**
3.1 Identifisering av brønnbåtprinsipper og – operasjoner 8
3.2 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer 8
3.2.1 Vannkjemi 9
3.2.2 Vannkortisol 10
3.3 Undersøkelse av fisk 10
3.3.1 Ultralyd 10
3.3.2 Vekt, lengde og boblescore finner 11
3.3.3 Blod 11
3.3.4 Gjelleprøver for metaller 11
3.3.5 Velferdsscoringer 11
3.3.6 Histologi 12

4 Resultater og diskusjon **13**
4.1 Ferskvannsbehandling (brønnbåtoperasjon 1) 13
4.1.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer 13
4.1.2 Effekt på fisk 17
4.2 Ferskvannsbehandling etterfulgt av termisk behandling (brønnbåtoperasjon 2) . 21
4.2.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer 21
4.2.2 Effekt på fisk 25
4.3 Transport av laks til slakteri (brønnbåtoperasjon 3) 29
4.3.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer 29
4.3.2 Effekt på fisk 32
4.4 Sentrale funn fra brønnbåtoperasjonene sett i sammenheng 37
4.4.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte forbindelser . 37
4.4.2 Effekt på fisk 37

5 Konklusjoner **41**

6 Referanser **42**

1 Forord

Denne feltstudien er gjennomført som en del av prosjektet NYBRØK (FHF-901788), finansiert av Fiskeri og Havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF). Oppfølgingen har omfattet både akkumulerte stoffer i vannet (prosjektets arbeidspakke 2, knyttet til delmål 2) og gassmetning i vann (prosjektets arbeidspakke 3, knyttet til delmål 3). For nærmere utdyping av bakgrunnen for prosjektet henvises det til sluttrapporten fra prosjektet NYBRØK (Hess-Erga *mfl.* 2024).

Prosjektets hovedmål var å gjennomføre nye studier for økt forståelse av relevante utilstrekkelig belyste problemstillinger for å utvikle konkrete tiltak for å oppnå vesentlig reduksjon av biologisk risiko ved bruk av brønnbåt til transport eller behandling. Hovedmålet i NYBRØK-prosjektet ble delt opp i følgende delmål:

1. Sammenstille og evaluere de mest relevante dødelighetshendelser under transport og ved behandling av laks i brønnbåt for å illustrere likheter og forskjeller, for dermed kunne designe overvåkingsprogram og målrettede forsøk.

2. Karakterisere effekten av vannkvalitet og akkumulerte stoffer i vannet, på laks under transport og ved behandling i brønnbåt.

3. Karakterisere hvordan gassmetning og trykk før, under og etter transport og behandling i brønnbåt påvirker laksens velferd, helse og prestasjon, også etter den første tiden i sjøen.

4. Integrere resultatene fra delmål 1 – 3 for å kunne illustrere sammenhenger mellom laksens velferd/helse, vannkvalitet og gassmetning, samt foreslå tiltak for å redusere biologisk risiko før, under og etter transport og behandling i brønnbåt.

Denne feltstudien ble gjennomført som et tett samarbeid mellom Aqua Kompetanse (AQK) og Norsk institutt for vannforskning (NIVA), hvor NIVA hadde hovedansvar for undersøkelser av vannkvalitet, akkumulerte stoffer og trykkforhold og AQK hadde hovedansvar for undersøkelser av fisk.

2 Introduksjon

Den norske havbruksnæringen er avhengig av brønnbåter for transport og medikamentell- og ikke medikamentell behandling av laks (Sviland Walde *mfl.* 2021). Den raske ekspansjonen av oppdrettsnæringen, kombinert med en økt bruk av ikke-medikamentelle avlusingsmetoder (Myhre Jensen *mfl.* 2020) har ført til et økende behov for brønnbåter. Antallet brønnbåter i Norge har derfor økt med mer enn 50 % fra 2018 til 2022 (Fiskeridirektoratet 2023). Dette illustrerer den betydelige økningen i antall fisk som håndteres ved brønnbåtoperasjoner.

Både transport og behandling av laks i brønnbåt er knyttet til en viss velferdsrisiko for fisken (Espmark *mfl.* 2016, Noble *mfl.* 2018). Kunnskap om kritiske biologiske risikofaktorer er avgjørende for å sikre god fiskevelferd og overlevelse i enhver brønnbåtoperasjon. Imidlertid er eksisterende informasjon begrenset, spredt og for det meste utilgjengelig på grunn av selskapenes konfidensialitetspolitikk og begrenset erfaringsutveksling. Observasjoner og dokumentasjon fra næringen viser at en rekke forhold kan medføre velferdsutfordringer hos fisken. Blant annet vannkvalitet (pH, temperatur, salinitet, konsentrasjon av CO_2, H_2S, O_2, ioner og ulike metaller som for eks. sink) og totalgassmetning er nevnt til å være avgjørende for fiskevelferd. For eksempel kan H_2S-dannelse og endringer i tilstandsform av metaller være toksisk for fisk. De frie kationene til Zn^{2+} og Cu^{2+} er også kjent for å ha toksisk virkning. Rask pH-stigning kan påvirke tilstandsformen til en rekke stoffer i vannet og da spesielt avfallsproduktet ammonium. Slike forhold kan både medføre akutt dødelighet og påvirke fisken negativt senere i livet (f. eks. Sommerset *mfl.* 2024). Totalgassovermetning relatert til dekompresjon kan føre til dannelse av gassbobler i blodet eller andre kroppsvæsker hos fisken (Pleizier *mfl.* 2020), noe som kan føre til en klinisk sykdom kjent som gassboblesyke (GBS) (Weitkamp *mfl.* 1980). Forståelsen av bobledannelse relatert til dekompresjon hos laks er imidlertid utilstrekkelig. Det er derfor et klart behov for både kontrollerte studier og feltstudier for å bedre forstå effekt av vannkvalitet, akkumulerte stoffer og trykkforhold på laksevelferd ved brønnbåtoperasjoner.

Gjennom kontrollerte forsøk i prosjektet NYBRØK, som simulerte lasting til og lossing fra brønnbåt ved trykk i ytterkant av det som ble kartlagt som praksis i næringen, samt eksponering av fisk for ulike nivåer av sink ved ulike vannkvaliteter, har det blitt etablert bedre forståelse for mulige konsekvenser av ulike scenarier og etablert diagnostikk som er relevant for praktiske operasjoner med brønnbåt. Det har dermed blitt dannet et godt grunnlag for feltstudier, hvor egnetheten til de diagnostiske metodene ytterligere kunne vurderes og funnene fra de kontrollerte forsøkene kunne sammenlignes med funn under kommersielle forhold.

Målet med denne feltstudien var å undersøke biologisk effekt av vannkvalitet og trykkeksponering på fisken under relevante forhold, samt vurdere egnethet av feltrelevant metodikk og diagnostikk, sammenlignet med kontrollerte forsøk i henholdsvis AP2.1 og AP3.2.

Vannkvalitet, trykkforhold og fiskevelferd ble undersøkt ved to gjentagende laster med oppfølginger for tre ulike håndteringsoperasjoner utført av tre ulike brønnbåter (3 typer brønnbåtoperasjoner):

- Brønnbåtoperasjon 1: Ferskvannsbehandling (lasting via dewater, avlusing i ferskvann, lossing via dewater)
- Brønnbåtoperasjon 2: Ferskvannsbehandling med påfølgende termisk avlusing (lasting via dewater, avlusing i ferskvann, lossing via dewater og termisk avlusingsenhet)
- Brønnbåtoperasjon 3: Slaktetransport (lasting uten dewater, lukket transport første del av turen, semilukket transport siste del av turen, lossing uten dewater)

3 Materiale og metode

3.1 Identifisering av brønnbåtprinsipper og – operasjoner

Tre ulike brønnbåtoperasjoner ble fulgt på tre ulike brønnbåter; avlusing ved hjelp av ferskvann (brønnbåtoperasjon 1, tabell 1), avlusing ved hjelp av ferskvann etterfulgt av termisk avlusing (brønnbåtoperasjon 2, tabell 2), og slaktetransport (brønnbåtoperasjon 3, tabell 3). Dette er tre vanlige operasjoner som gjennomføres ved hjelp av brønnbåter.

Brønn	Fra/ til merd	Start last	Slutt last	Last 1				Last 2				Start lossing	Slutt lossing
				Vann (m^3)	Antall fisk	Snitt vekt (kg)	Tetthet (kg/m^3)	Vann (m^3)	Antall fisk	Snitt vekt (kg)	Tetthet (kg/m3)		
3	5 til 6	11:50	12:45	1425	6277	3	15,28					21:28	21:58
4	5 til 6	11:50	12:45	1425	4862	3,7	14					21:28	21:58
1	7 til 5	17:40	18:30					1425	11360	3,2	29,44	02:37	03:46
2	7 til 5	17:40	18:30					1425	9304	4	30,08	02:37	03:46

Tabell 1: Brønnbåtoperasjon 1 bestående av en ferskvannsavlusing med 8 timers holdetid. Behandlingen foregikk i to runder (last 1 og 2) 20.-21.12.2023 og ble gjennomført parallelt i fire brønner med et totalt sirkulasjonsvolum på 5700 m^3.

Last	Fra/ til merd	Start last	Slutt last	Styrbord brønn				Babord brønn				Termisk avlusingsenhet		
				Vann (m^3)	Antall fisk	Vekt (kg)	Tetthet (kg/m^3)	Vann (m^3)	Antall fisk	Vekt (kg)	Tetthet (kg/m^3)	Vann (m^3)	Start lossing	Slutt lossing
1	1 til 5	10:59	12:10	1719	32816	3,32	66,4	1719	32053	3,45	64,3	7	18:10	21:03
2	1 til 5	22:54	00:20	1719	33391	3,25	63,1	1719	35829	3,43	71,5	7	06:20	09:18

Tabell 2: Brønnbåtoperasjon 2 bestående av en ferskvannsavlusing med 6 timers holdetid + termisk avlusing i forbindelse med lossing. Behandlingen foregikk i to runder (last 1 og 2) 10.-11.01.2024 og ble gjennomført i to brønner med et totalt sirkulasjonsvolum på 3744 m^3.

Last	Fra/ til merd	Start last	Slutt last	Styrbord brønn				Babord brønn				Start lossing	Slutt lossing
				Vann (m^3)	fisk	Vekt (kg)	Tetthet (kg/m^3)	Vann (m^3)*	Antall fisk	Vekt (kg)	Tetthet (kg/m^3)		
1	25 til 2 + 3	12:00	13:51	1400	26323	5,9	110,9	1400	26323	5,9	110,9	19:20	20:00
2	25 til 3 + 4	02:35	03:50	1400	21920	5,9	92,4	1400	21920	5,9	92,4	09:20	10:30

Tabell 3: Brønnbåtoperasjon 3 bestående av to slaktetransporter på 5 timer 07.-08.02.2024. Last 1 gikk lukket fra kl. 14:00 til 17:24 og last 2 gikk lukket fra kl. 04:06 til 07:50. Transportene ble gjennomført i to brønner med et totalt sirkulasjonsvolum på 2800 m^3

3.2 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer

For å kunne undersøke vannkvalitet, trykk og totalgassmetning samt akkumulerte stoffer gjennom de tre ulike brønnbåtoperasjonene ble det gjennomført en rekke prøveuttak underveis kombinert med gjennomgang av data fra sensorer om bord i båtene. I alle de tre ulike brønnbåtoperasjonene ble det tatt ut vannprøver fra råvann (RO-anlegg, buffertanker, ferskvannkilde, eller merd), fra brønn før fisk ble lastet, fra brønn halvveis i operasjonen, samt fra brønn rett før avslutning av operasjonen (tabell 4).

Brønnbåtoperasjon	Målepunkt	Analyseres før
Ferskvannsbehandling	Direkte fra RO-anlegg	VK-brønnbåt
	Buffertank	VK-sjø, gjellemetall
	Merd (sjøvann) før lasting - ved trengning	VK-sjø, gjellemetall
	I brønn/lab før fisk	VK-brønnbåt, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I brønn/lab ca. halvveis i behandlingstiden	VK-brønnbåt, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I brønn - Ved avslutning	VK-brønnbåt, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	(rett før lossing/etter lossing - i forbindelse med lossing)	
Ferskvannsbehandling med påfølgende termisk avlusning	Direkte fra FV-lagringstank/råvann, før ferskvannsbehandling	VK-råvann
	Merd (sjøvann) før lasting	VK-sjø
	Fra brønn før lossing (etter ferskvannsbehandling)	Gjellemetall, VK-brønnbåt
	I termisk avlusingsenhet før fisk	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I termisk avlusingsenhet ca. halvveis i utlossing	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I termisk avlusingsenhet ved avslutning	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
Slaktetransport	Merd (sjøvann) før lasting - ved trenging	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I brønn/lab før fisk	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I brønn/lab ca. halvveis i slaktetransporten	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall
	I brønn - ved/rett før lossing til ventemerd (slutt lukket)	VK-sjø, CO_2, H_2S, vannkortisol, gjellemetall

Tabell 4: Målepunkt, vannprøver og analyser fra feltstudiene. Alle prøvene for generell vannkjemi, H_2S, CO_2 og vann-kortisol ble prøvetatt i duplikat ved alle prøvepunkt.

3.2.1 Vannkjemi

Vannkjemi (VK-brønnbåt, VK-sjø, og VK-råvann) ble analysert ved Eurofins laboratorium etter akkrediterte metoder, mens fritt CO_2 konsentrasjon ble analysert av NIVAs laboratorium. Vindta 3C (Marianda, Tyskland) (Versatile Instrument for Determination of Titration Alkalinity) er et mye brukt instrument i oseanografi for målinger av total alkalinitet (TA) og oppløst uorganisk karbon (DIC) i vannprøver. For Vindta-analyse måles mengden DIC i en prøve ved kolometrisk analyse. Kolorimeteret måler mengden elektrisitet under en elektrotitrering, under Faradays lov om induksjon. Den totale ladningen som brukes i titreringen er direkte proporsjonal med mengden CO_2 som finnes i løsningen. Dette danner grunnlag for beregningen av CO_2-konsentrasjon i μmol/kg. I tillegg beregnes mengden CO_2 ut fra alkalitet og båtens egne registreringer presenteres. I tilfeller med større avvik, nevnes dette spesielt.

Det ble også tatt vannprøver for beregning av H_2S-konsentrasjon, men disse ble ikke analysert da risikoen for dannelse av H_2S var lav i alle de undersøkte brønnbåtoperasjonene. Analysepakken VK-råvann inneholdt analyse av parameterene pH, ledningsevne, alkalitet, turbiditet, total nitrogen, nitrat, ammonium, klorid, sulfat, aluminium, aluminium (labilt), aluminium (ikke labilt), kalsium, kobber, jern, sink, natrium, magnesium, kalium, mangan og silisium. VK-brønnbåt inneholdt analyse av parameterene pH, ledningsevne, alkalitet, turbiditet, ammonium, klorid, sulfat, aluminium, aluminium (labilt), aluminium (ikke labilt), kalsium, kobber, jern, sink, natrium, magnesium, kalium, mangan og silisium. Analysepakken VK-sjø inneholdt analyse av parameterene pH, alkalitet, turbiditet, ammonium, klorid, sulfat, aluminium, kalsium (brønnbåtoperasjon 1, last 2 og brønnbåtoperasjon 2), kobber, jern, sink og mangan. Temperatur, pH, oksygen (O_2), salinitet, totalt gasstrykk (TGP) og totalgassmetning (TGP %) ble målt *in situ* gjennom behandlingene og transporten, samt hentet fra båtens logg. *In situ* målingene av pH foretrekkes som oftest fremfor laboratoriemålingene, da vannprøvene kan ha blitt påvirket underveis til laboratoriet og siden pH-målingene måles under omrøring på laboratorium. pH-instrumentene på laboratorier er derimot trolig vedlikeholdt bedre og kalibrert mer regelmessig. I tillegg er det utfordrende å måle pH i ionefattig vann og i vann med lite H^+ ioner. I tilfeller der det ikke ble benyttet *in situ* målinger av pH, nevnes dette spesielt.

3.2.2 Vannkortisol

Vannprøver (1l; duplikate prøver) for analyse av vannkortisol ble tatt ut fra brønn før lasting av fisk, halvveis og før lossing (eller på slutten av lukket fase) fra hver av de tre brønnbåtoperasjonene. Analysemetoden er beskrevet av McWhinney *mfl.*, 2010, og videre modifisert i Höglund *mfl.*, 2022.

3.3 Undersøkelse av fisk

Det ble gjennomført undersøkelser av fisk på 3 ulike punkt i forbindelse med håndteringsoperasjonene: like før lasting/fra merd (4 til 6 fisker), like etter lasting til brønn (12 fisker) og like etter/i forbindelse med lossing til merd (12 fisker).

Fisken ble håvet direkte fra merd i forbindelse med trenging, fra brønn eller fra losseslanger, en og en over i et sedasjonskar. Det ble benyttet trikainmesilat (Tricaine Pharmaq (Pharmaq), 1 000 mg/g) for anestesi i dosen 80-135 mg/l i karet. Fisken ble holdt i sedasjonskaret inntil tilstrekkelig nivå av anestesi for ultralyd-undersøkelsen ble oppnådd. Fisken ble i etterkant av undersøkelse med ultralyd avlivet. Avliving foregikk i et eget kar tilsatt trikainmesilat (Tricaine Pharmaq (Pharmaq), 1 000 mg/g) i konsentrasjoner $>$ 135 mg/l i minimum 10 minutter, etterfulgt av utblødning. Hver fisk ble gitt et individnummer som identifikasjon og alle prøveuttak ble knyttet til denne identiteten.

3.3.1 Ultralyd

Sedert fisk ble plassert ventrodorsalt i spesialtilpasset krybbe. Undersøkelsen ble gjennomført med et bærbart ultralydapparat av merket Vivid iqTM med en 12L-RS Probe (3.4 – 12.6 MHz) (GE Healthcare, Chicago, IL). Ultralydproben ble plassert loddrett i midtlinjen mellom brystfinnene, cranialt mot gjellelokkene for optimal visualisering av hjertet. Optimal dybde og fokuspunkt for aktuell fiskestørrelse ble benyttet for å sikre visualisering av bulbus av atriet, ventrikkel, bulbus arteriosus og ventralaorta. Da optimal visualisering var sikret, ble proben holdt i samme posisjon for lagring av 10 sekunders film. Dette ble gjentatt 3 ganger per fisk. Opptakene ble scoret i sanntid, eller ved behov i etterkant etter en modifisert Eftedal-Brubakk score (tabell 5), der de fire kontraksjonene med høyest boble-load lå til grunn for score. For utfyllende beskrivelse av scoring med modifisert Eftedal-Brubakk score henvises til kommende vitenskapelige publikasjoner fra prosjektet. Gjellene ble overrislet med vann inneholdende halv dose (50 mg/l) trikainmesilat under hele ultralyd-undersøkelsen for å unngå hypoksisk bradykardi.

Score	Bobler
0	Ingen observerte bobler
1	Enkelte bobler
2	Minst en ny boble hver fjerde kontraksjon
3	Minst en boble i hver kontraksjon
4A/B	Mer enn en boble i hver kontraksjon
4C	Nær "whiteout", individuelle bobler kan fortsatt skilles fra hverandre
5	"Whiteout", individuelle bobler kan ikke skilles fra hverandre

Tabell 5: Scoringsmodell for semi-kvantitativ vurdering av gassbobler ved ultralydundersøkelse av hjerte og ventralaorta.

3.3.2 Vekt, lengde og boblescore finner

Fisken ble veid med 10 grams presisjon, før lengde ble målt som gaffellengde og avrundet til nærmeste 0,5 cm. Videre ble forekomst av bobler på venstre brystfinne og gattfinne scoret fra 1 til 3, se tabell 6, etter scoringsmodell beskrevet av Wahl-Ovesen (2024).

Score	Antall bobler
0	0 bobler
1	1-3 bobler
2	4-10 bobler
3	Mer enn 10 bobler

Tabell 6: Scoringsmodell for semi-kvantitativ vurdering av gassbobler i finner.

3.3.3 Blod

Blodprøven ble tatt fra caudale vaskulatur, og det ble benyttet vacutainer med litiumheparin som antikoagulant (BD Vacutainer 4 ml Lith/Hep). Tilhørende kanyle for vacutainer i størrelsen 21G x 1,5¨ ble benyttet. Kanylen ble ført inn med 45° vinkel i den ventrale midtlinjen like bak gattfinnen (brønnbåtoperasjon 1 og 2), eller lateralt på nivå med sidelinjen (brønnbåtoperasjon 3).

Kapillære hematokritrør ble fylt 3/4 fullt og tettet i motsatt ende med kitt. Prøvene ble sentrifugert i 8 minutter ved 10 G (10 000 rpm). Hematokritverdien ble lest av individuelt ved hjelp av måleinstrument i skillet mellom plasma og pakkede røde blodceller. Eventuell forskjell i hematokrit mellom de ulike håndteringstrinnene ble undersøkt ved hjelp av Kruskal-Wallis chi–squared test da datasettene ikke var normalfordelt (base R, R studio). I tilfelle median for hematokrit var ulike på de tre tidspunktene ble forskjellene undersøkt ved hjelp av Dunn's test med Holm p-adjusted (tstatix-pakken i R, R studio) hvor statistisk signifikant forskjell mellom gruppene ble satt ved $p<0,05$.

3.3.4 Gjelleprøver for metaller

Gjelleprøver for metaller ble tatt fra 2. gjellebue på fiskens venstre side. Prøvene ble tørket forsiktig for å fjerne utvendig blod og plassert i beholdere. Prøvene ble holdt på is, før de ble fryst ved -20 °C. Ved NIVA sitt laboratorium i Oslo ble gjellene frysetørket, veid og deretter tilsatt konsentrert salpetersyre av spormetallkvalitet (HNO_3) ved 50 °C. Prøvene ble deretter fortynnet til ca. 10 % HNO_3 og konsentrasjonen av aluminium (Al), kobber (Cu), jern (Fe) og sink (Zn) ble målt som μg/g tørrvekt gjelle (Agilent 7700 Q-ICP-MS).

3.3.5 Velferdsscoringer

Det ble benyttet en forenklet versjon av velferdsscoring basert på Fishwell-standarden publisert av Noble *mfl.*, 2018. Fra denne standarden ble grad av følgende operative velferdsindikatorer vurdert og scoret fra 0-3: gjellelokkforkortelse, skader i brystfinne, skader i halefinne, skader i ryggfinne, deformiteter, exophthalmus, skjelltap, snuteskade, sår og øyeblødninger. For skader på finner ble det ikke vurdert om det var aktive eller avhelede lesjoner. For hver av brønnbåtoperasjonene ble grad av forskjell vurdert mellom kontroll (før lasting), etter lasting, og under/etter lossing, hvor funn fra de to gjentagende rundene for hver brønnbåtoperasjon

ble slått sammen og vurdert under ett. Eventuelle forskjeller i velferdsscoringene ble undersøkt ved hjelp av Kruskal-Wallis chi–squared test da ingen av datasettene var normalfordelt (base R, R studio). I tilfelle median for de ulike velferdsscoringene på de tre tidspunktene for en gitt velferdsindikator, ble forskjellene undersøkt ved hjelp av Dunn's test med Holm p-adjusted (tstatix-pakken i R, R studio) hvor statistisk signifikant forskjell mellom gruppene ble satt ved $p<0,05$. Alle velferdsscoringer ble foretatt av samme person (TS).

3.3.6 Histologi

Det ble tatt histologiprøve av 3. gjellebue på fiskens venstre side, hjerte, skjelettmuskulatur, pseudobranch, øye og hjerne. Ved observasjon av skader i andre vev ble også disse prøvetatt. Prøvene ble straks etter prøveuttak overført til 10 % nøytral-bufret formalin og oppbevart i romtemperatur frem til analyse. Etter uttak av histologi ble det utført en rask obduksjon, og eventuelle avvik ble notert. Histologiske snitt ble prosessert ved hjelp av standard histologiske metoder, farget med hematoxylin og eosin med saffron, og deretter skannet. Alle snittene ble vurdert fra digitale bilder. Samtlige histologiske snitt ble vurdert for tilstedeværelse av eventuelle sykdomsforandringer, og gjellene ble ytterligere undersøkt ved hjelp av en semi-kvantitativ gjellescore. I gjellescoren inngår vurdering av gjennomsnittlig forekomst av slimceller i respiratorisk epitel langs lamellene, hvor forekomst men med mindre enn to slimceller i snitt per lamell gis score 0,5, mellom to og fire slimceller i snitt per lamell gir score 1, mellom fem og åtte slimceller i snitt per lamell gis score 2, mellom ni til 12 slimceller i snitt per lamell gis score tre, mens mer enn 12 slimceller i snitt per lamell gis score 4. Videre ble følgende vevsforandringer scoret etter utbredelse i vev, hvor utbredelse i mindre enn 12,5 % av gjellen gir score 0,5, utbredelse i 12,5-25 % av gjellen gis score 1, utbredelse i 25-50 % av gjellen gis score 2, utbredelse i 50-75 % av gjelle gis score 3, og utbredelse i mer enn 75 % av gjellen gis score 4:

- Kategori 1: Lamellær klubbing, sub-epitelialt ødem eller blødning, lamellær og intral-amellær epitelial hyperplasi, stuvning i lameller, stuvning og/ eller ødem i filament, bruskdeformiteter, og filament-klubbing (epitelial hyperplasi) eller andre skader inklusive blødninger i distale filament – totalt åtte ulike typer vevsforandringer.
- Kategori 2: Lamellær epitelial hyperplasi uten fusjon, ferske lukkede lamellære blødninger, lukkede lamellære blødninger med ulik grad av organisering, trombosering eller degenerative og nekrotiske forandringer i pillarceller, lamellær fusjon eller adhesjon uten eller med svært sparsom grad av epitelial hyperplasi, fortykkelse av filament grunnet betennelse, fortykkelse av filament grunnet epitelial hyperplasi, betennelse i enkelt-lameller, og degenerasjon og/ eller nekrose i respiratorisk epitel og/ eller flerlaget epitel – totalt ni ulike typer vevsforandringer.

I scoren vektes vevsforandringer i kategori 2 med en faktor på to for å reflektere at kategori 2-forandringer normalt medfører større funksjonell skade og/eller tar lengre tid å avhele enn vevsforandringer i kategori 1. Summen av score for kategori 1-forandringer og vektede kategori 2-forandringer utgjør den endelige gjellescoren. Som for velferdsscoringer ble grad av forskjell i histologisk, semi-kvantitativ gjellescore for hver av brønnbåtene/brønnbåtoperasjonene vurdert mellom kontroll (før lasting), etter lasting, og under/etter lossing, hvor funn fra de to gjentagende rundene for hver brønnbåtoperasjon ble slått sammen. Forskjellene i gjellescorene ble vurdert ved hjelp av Kruskal-Wallis rank sum test da datene ikke var normalfordelt (base R, R studio), hvor statistisk signifikant forskjell mellom gruppene ble satt ved $p<0,05$. Alle snitt ble vurdert av samme person (ASD).

4 Resultater og diskusjon

Hvordan korttidseksponering for ulike vannkvalitetsparameter og variasjon i vannkvalitet påvirker fiskevelferden og -fysiologien i brønnbåtoperasjoner, er lite dokumentert. I tillegg finnes det begrenset med kunnskap om hvordan stress i forkant av operasjonene (trenging og lasting) påvirker fiskens toleranse for enkeltstoffer og kombinasjon av flere stoffer. Derfor sammenlignes enkeltparametere fra feltstudien med grenseverdier eller anbefalinger som finnes i vitenskapelig litteratur og fra andre håndteringsoperasjoner, samt NIVAs database for råvann benyttet til akvakulturformål (VK-databasen, som dekker over 80 % av alle vannkilder som benyttes p.t., se for eksempel Kristensen *mfl.* 2009). Målte totalkonsentrasjoner av sink og kobber diskuteres i lys av resultatene fra de kontrollerte forsøkene.

Trykkreduksjon med påfølgende totalgassovermetning og grunnlag for gassboblesyke er dokumentert i svært liten grad for scenario relevante for brønnbåter. I denne delen sammenlignes derfor funnene fra feltstudien, først og fremst med de kontrollerte forsøkene i NYBRØK, da det er disse som utgjør det mest nærliggende sammenlikningsgrunnlaget.

4.1 Ferskvannsbehandling (brønnbåtoperasjon 1)

Brønnbåtoperasjon 1 bestod av to runder (last 1 og last 2) med ferskvannsavlusning, hvor fisken ble lastet med undertrykk, eksponert for RO-vann i og losset med overtrykk til merd. Lastene overlappet noe i tid, brønn 3 og 4 ble benyttet i last 1 og brønn 1 og 2 i last 2. For begge lastene var vannet helt eller delvis brukt på foregående last på båten. Det var noe høyere fisketetthet i last 2 (tabell 1). Det ble tatt vannprøver fra alle brønnene og direkte fra RO-anlegget.

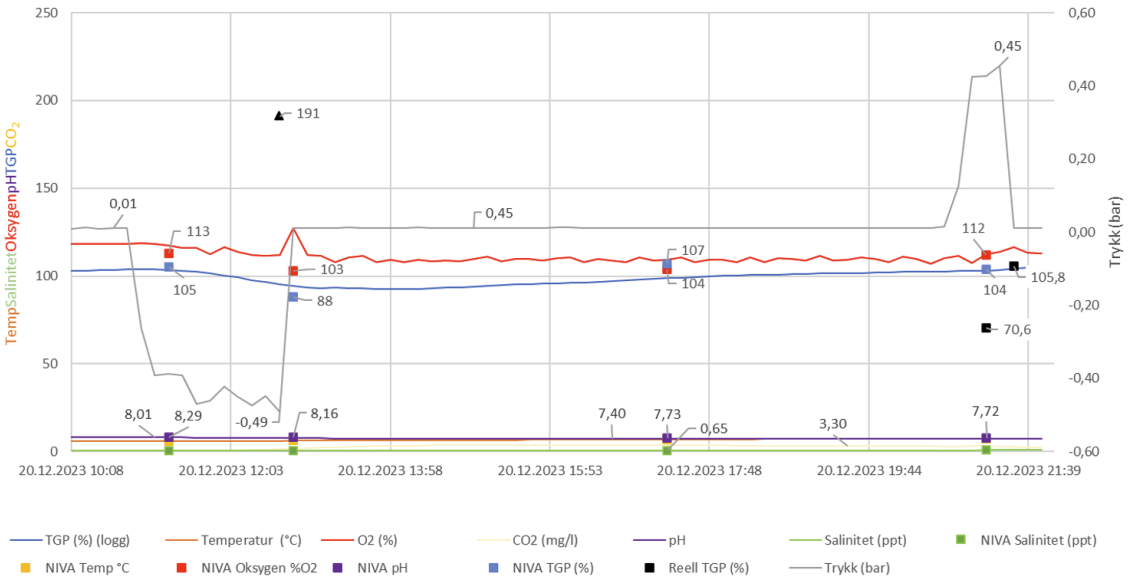
4.1.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer

Resultatene fra begge lastene indikerte at pH, CO_2, salinitet, temperatur og oksygen (figur 1 og 2) var innenfor retningsgivende intervaller og anbefalinger (brønnbåtveilederen.no), foruten noe høy pH i RO-vannet ved start. Den høye pHen var sannsynligvis forårsaket av både silikatlut og buffer-tilsetning. Både målt og beregnet CO_2-konsentrasjon indikerte lave verdier, godt innenfor anbefalte verdier for brønnbåtoperasjoner (brønnbåtveilederen.no) (tabell A.1 og A.2).

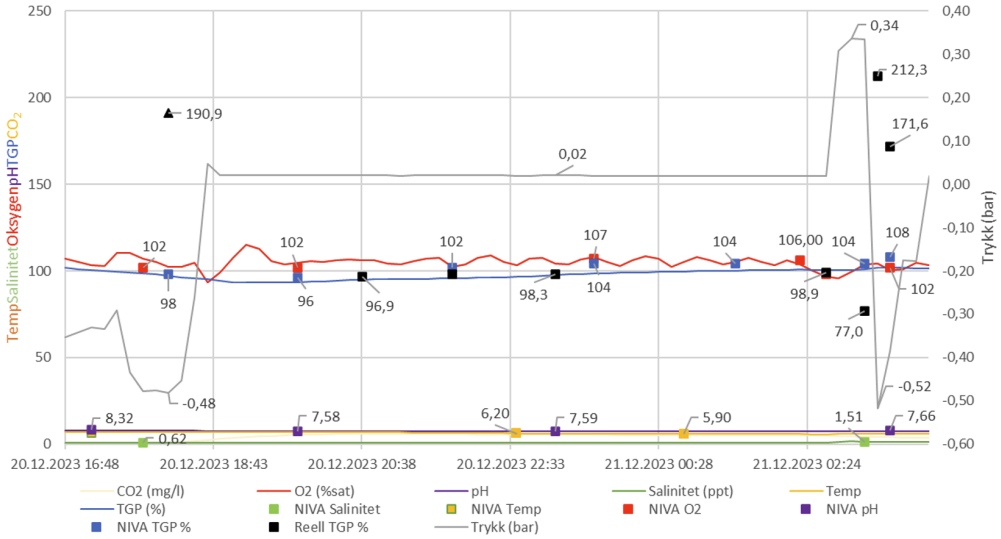
For last 1 viste båtens TGP-logg verdier fra 93 % til 107 %, og fra 93 % til 102 % i last 2 (figur 1 og 2). Disse målingene tar ikke høyde for modifisert trykk i brønnen ved lasting og lossing. Benyttes trykket i brønnen vil undertrykk (lasting) føre til totalgassovermetning og overtrykk (lossing) stort sett føre til totalgassundermetning, når det hhv. lastes og losses. Korrigerte målinger av totalgassmetning indikerer 190 % TGP ved lasting og i overkant av 70 % TGP ved lossing under begge lastene (figur 1) og (figur 2).

Båtens logg viste en salinitet på 0,4 – 0,6 ppt og beregnet salinitet ut fra mengde klorid indikerte en svak økning pga. noe sjøvann som følger med fisken under last 1 og 2 (figur 1, figur 2 og tabell A.1).

Den organiske belastningen var lav i det RO-vannet og verdiene økte med holdetiden i begge lastene (Tabell A.1 og A.2). Det ble observert relativt høye ammoniumkonsentrasjoner fra start,



Figur 1: Sensordata og loggdata fra ferskvannsavlusing (brønnbåtoperasjon 1) med 9 timer og 45 minutters holdetid den 20. desember 2023, last 1, brønn 3. Grå linje viser båtens trykkmåling (bar relativt til standard atmosfærisk trykk ved havnivå), lys gul linje viser båtens CO_2-måling (mg/l), rød linje viser båtens oksygenmåling (% metning), lilla linje viser båtens pH-måling, grønn linje viser båtens salinitet (ppt), gul linje viser båtens temperaturmåling, blå linje viser båtens TGP-måling, grønn firkant viser *in situ* måling av salinitet gjennomført av NIVA, gul firkant viser *in situ* måling av temperatur gjennomført av NIVA, rød firkant viser *in situ* måling av oksygen (% metning) gjennomført av NIVA, lilla firkant viser *in situ* måling av pH gjennomført av NIVA, blå firkant viser *in situ* måling av TGP (%) gjennomført av NIVA og svart firkant viser reell TGP (%) korrigert for reelt trykk i brønn. Svart trekant viser beregnet TGP (%) da trykket ikke ble skrevet ned ved denne målingen.

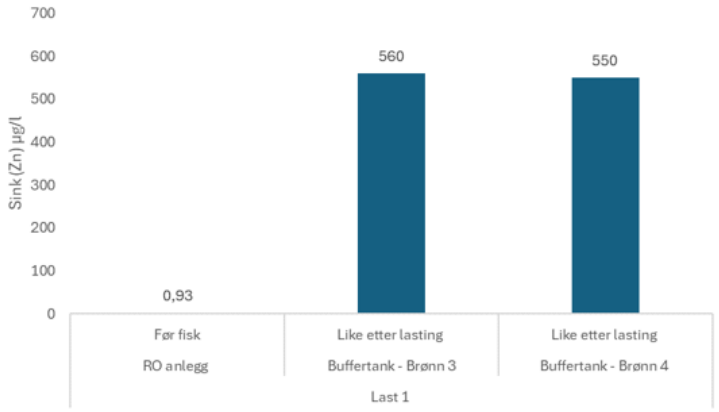


Figur 2: Sensordata og loggdata fra ferskvannsavlusing (brønnbåtoperasjon 1) med 8 timers holdetid, den 20. og 21. desember 2023, last 2, brønn 1. For tegnforklaring se figur 1. Svart trekant viser beregnet TGP (%) ved 751 mmHg (ikke målt *in situ*).

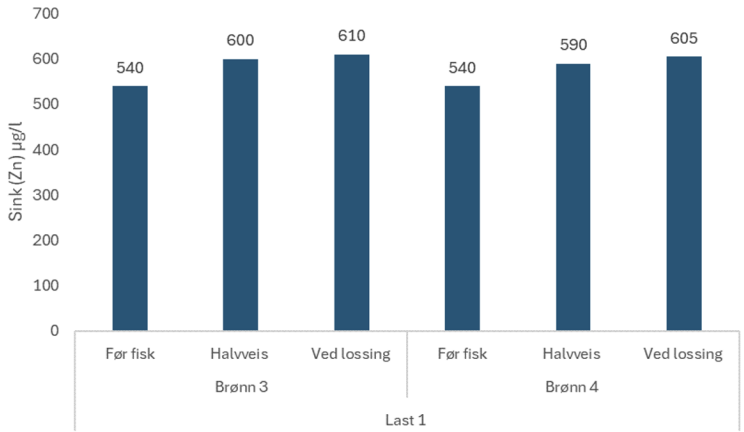
noe som reflekterer gjenbruk av vann. Ammoniumkonsentrasjonene steg naturlig nok i løpet av behandlingene, men ammoniakkonsentrasjonene (NH_3-N) var likvel høyest før lasting av fisk pga. høye pH-verdier (tabell A.1 og A.2). Dette overskred anbefalt grenseverdi for langtidseksponering på 12 µg/l (Fivelstad *mfl.*, 1995), men lå under anbefalt grense for akutteksponering (100 µg/l NH_3) (Wedemeyer, 1996).

Det var lave og uproblematiske verdier av aluminium, kobber og jern, og normale verdier av kalsium (>2,5 mg Ca/l, Rosseland, 1989) i begge lastene (Tabell A.1 og A.2).

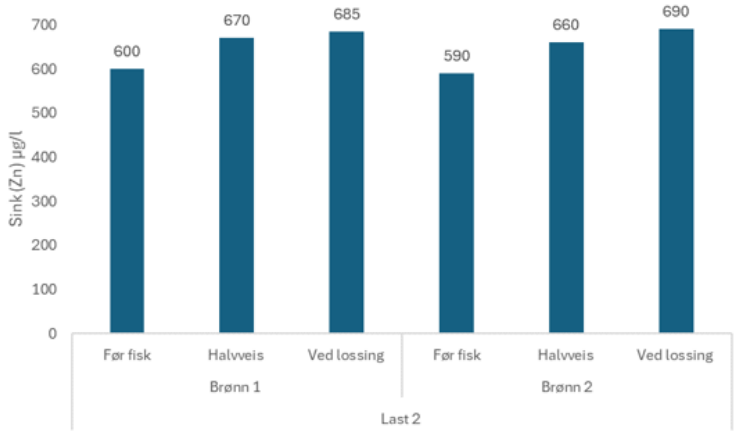
Konsentrasjonen av totalt sink var svært lav i RO-vannet (0,93 µg/l), men det ble observert forhøyet konsentrasjon av sink i buffertankene og en akkumulering i brønnene, gjennom begge lastene (figur 3). I buffertankene til brønn 4 og brønn 3 var konsentrasjonen hhv. 550 og 560 µg Zn/l (figur 3). Gjennom den første lasten av ferskvannsbehandlingen med 9 timer og 45 min holdetid, økte sinkverdiene i brønn 4 fra 540 til 605 µg/l, og fra 540 til 610 µg/l i brønn 3 (tabell A.1). Under ferskvannsbehandling last 2 ble de to resterende brønnene (brønn 1 og 2) tatt i bruk. Her økte sinkverdiene i brønn 1 fra 600 til 685 µg/l og fra 590 til 690 µg/l i brønn 2 (tabell A.2). Disse resultatene indikerer at det meste av sinken allerede var tilstede ved starten av ferskvannsbehandlingene og at buffertankene inneholdt mye vann som tilsynelatende hadde vært brukt til ferskvannsbehandling tidligere (bl.a. forhøy NH_3-N, TOC, Zn). Sammenliknet med de kontrollerte sink-forsøkene, var vannkvaliteten forskjellig, slik at både pH, saltholdighet og Ca-nivåene beskytter fisken i større grad i disse brønnbåtoperasjonene.



Figur 3: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før ferskvannsbehandling, og konsentrasjon av sink (µg/l) i buffertanker etter ferskvannsbehandling (brønnbåtoperasjon 1).



Figur 4: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før og under ferskvannsbehandling last 1 (brønnbåtoperasjon 1).



Figur 5: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før og under ferskvannsbehandling last 2 (brønnbåtoperasjon 1).

Vannkortisol

Under brønnbåtoperasjon 1 var det høy kortisolkonsentrasjon allerede fra start i begge lastene (tabell 7). Dette skyldes trolig gjenbruk av vannet og at kortisolen da stammet fra fisk i den forrige behandlingen. Kortisolkonsentrasjonen økte i alle brønnene i den første halvdel av ferskvannsbehandlingene. At kortisolnivåene var lavere i andre halvdelen av behandlingen i begge lastene, skyldes sannsynligvis økt vannutskifting i brønnene som også er indikert av andre vannkvalitetsparametere. Det er også sannsynlig at utskillelsen av kortisol er høyest i begynnelse av en ferskvannsbehandling, da fisken er stresset pga. trenging, lasting og brå endringer i salinitet. På grunn av at det er stor usikkerhet knyttet til biomasse og vannutskiftningen per brønn under behandlingen, var det ikke mulig å beregne hvor mye kortisol fisken (per biomasse) har skilt ut under behandling. Det var heller ikke mulig å sammenligne stressbelastning med de kontrollerte forsøkene eller de få publikasjonene som har undersøkt vannkortisol i forbindelse med håndteringsoperasjoner.

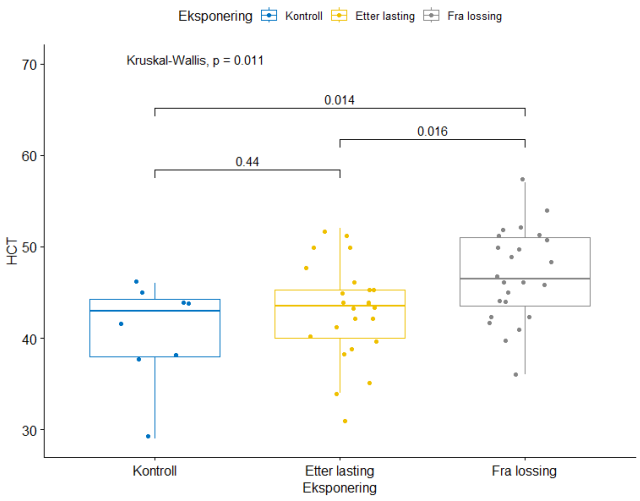
	Last 1		Last 2	
	Brønn 3	Brønn 4	Brønn 1	Brønn 2
Kortisol kons. (ng/l) før behandling	151	154	175	166
Kortisol kons. (ng/l) midtveis i behandling	167	166	188	na
Kortisol kons. (ng/l) ved avsluttet behandling	164	160	176	183

Tabell 7: Vannkortisolkonsentrasjoner (ng/l) under ferskvannsbehandling.

4.1.2 Effekt på fisk

Gjellemetall
Prøvene av gjelle-aluminium, gjelle-jern og gjelle-kobber viste verdier innenfor anbefalt nivå både før og etter ferskvannsbehandlingen, under begge lastene (<10 µg/g Al, <3,5 µg/g Cu og <500 µg/g Fe) (tabell A.3). Det er svært få studier og lite erfaring når det kommer til gjelle-sink, og det er per i dag ikke etablert noen grense for hva som betraktes som skadelig nivå av gjelle-Zn. Den toksiske virkningen av sink er annerledes enn for kobber, jern og aluminium, som er gjellereaktive og feller ut på gjellene. I NYBRØK AP2.1 (kontrollerte forsøk) var det ingen signifikante forskjeller i konsentrasjonen av gjellesink mellom fisk fra kontrollgruppe og fisk som ble eksponert for konsentrasjonene, 100, 400 og 800µg/l, under simulert ferskvannsbehandlinger med ubehandlet og behandlet vann. Disse resultatene støttes av en tidligere studie som viser at akkumulering av sink på gjellene ikke er en god indikator på mengden sink i vannet (Alsop *mfl.*, 1999).

Hematokrit
Det ble observert signifikant høyere hematokrit hos fisk fra lossing sammenlignet med kontroll (før lasting under trenging i merd) og etter lasting (figur 6). Ved stress, hypoksi og trenging er det kjent at fisk frigjør røde blodceller fra milten, samtidig som de røde blodcellene sveller (Farrell *mfl.* 2011). Dette medfører en rask økning i hematokrit og en midlertidig økt oksygentransport. Denne mekanismen kan forklare økningen i hematokrit gjennom behandlingsperioden. Fisk som flyttes fra saltvann til ferskvann, som ved denne behandlingen, vil normalt oppleve en signifikant hemodilusjon (redusert hematokrit) på grunn av influks av væske til plasma. Fiskens stressrespons og påfølgende økte blodtrykk vil ha motsatt effekt og fremme transsudasjon av væske til interstitielt vev grunnet økt hydrostatisk trykk (hemokonsentrasjon) (Gallaughet & Farrell 1998). Trolig har den sistnevnte effekten vært dominerende i dette tilfellet.



Figur 6: Hematokrit (HCT) for kontroll (før lasting), etter lasting og fra lossing under ferskvannsbehandling (brønnbåtoperasjon 1). Det var signifikant høyere HCT for fisk etter lossing sammenlignet med kontroll ($p=0,014$) og etter lasting ($p=0,016$), mens det var ingen signifikant forskjell mellom kontroll og etter lasting ($p=0,44$) (Kruskal-Wallis test).

Ultralyd, boblescore finner og makroskopiske funn

Ved lasting via dewater (avsilingskammer hvor vannet som følger med fisken siles av) og påfølgende ferskvannsavlusing var det ut fra målt nivå av trykk og totalgass en betydelig totalgassovermetning, og således risiko for gassboblesyke hos laksen i brønnen. Ultralydundersøkelse av hjertet like etter sedasjon ga ingen funn av gassbobler. Det ble derimot i begge lastene, like etter fullført lasteoperasjon, observert gassbobler forenlig med gassboblesyke i hjertet (tabell 8 og figur 7) og lever hos noen individer ved obduksjon. Dette bildet sto i kontrast til de kontrollerte forsøkene, hvor ultralyd detekterte gassbobler hos individer med gassboblesyke, men det var få eller ingen funn av bobler synlig ved obduksjon av de samme individene. Det ble ikke observert gassbobler på finner ved undersøkelse av fisken.

		Antall fisk undersøkt	Funn ultralyd innledende undersøkelse	Funn ultralyd påfølgende undersøkelse etter blodprøve	Makroskopiske observasjon av bobler i hjerte og hjertenære strukturer	Hyperemisk atrium uten påvisning av bobler
Last 1	Kontroll, fra merd under trenging/lasting	4	0	na	0	0
	Fra trunk etter lasting	12	0	na	3	0
	Fra lossing	12	0	na	3 (3)	1
Last 2	Kontroll, fra merd under trenging/lasting	4	0	na	0	0
	Fra trunk etter lasting	12	0	na	3	0
	Fra lossing	12	0	5/5*	6	0

Tabell 8: Oversikt over funn fra ultralydundersøkelse og makroskopisk undersøkelse av fisk ved obduksjon (brønnbåtoperasjon 1). Tall i parentes angir antall individer med usikkerhet rundt påvisning. na: ikke undersøkt. *: kun de fem siste fiskene ble undersøkt, og samtlige fem fisk fikk påvist gassbobler på ultralyd.

Figur 7: Til venstre: dilatert atrium, gassbobler synlig gjennom atrieveggen, funn ved obduksjon av fisk tatt ut fra brønn like etter fullført lasting. Til høyre: dilatert atrium, gassbobler synlig gjennom atrieveggen, funn ved obduksjon av fisk tatt ut etter lossing. Stillbilde fra film hvor hjertet fortsatt hadde regelmessige hjerteslag.

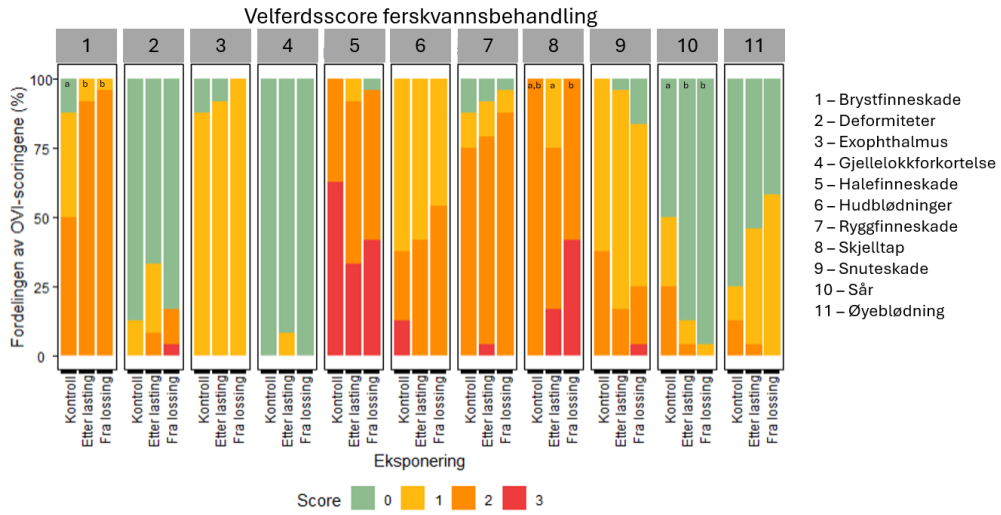
For å undersøke ultralydmetodikken videre ble det derfor gjort ultralydundersøkelser på ulike tidspunkt i prøvetakingskjeden på enkelte individer (tabell 8). Det ble da klart at det var individer hvor det ikke ble funnet gassbobler ved første ultralydundersøkelse etter sedasjon, hvor ultralydundersøkelse etter blodprøveuttak og/eller uttak av gjeller detekterte betydelige mengder med gassbobler (tabell 8). I slike tilfeller ble det også sett gassbobler ved påfølgende obduksjon.

I de kontrollerte forsøkene var gassbobler i gattfinne og brystfinne de mest sensitive diagnostiske undersøkelsene av den diagnostikken som ble utført like etter avsluttet eksponering for lavt trykk (simulert lasting via dewater). Ved ferskvannsavlusingen ble det ikke funnet gassbobler i finner hos noen fisker, heller ikke i de individene hvor det ble funnet gassbobler ved obduksjon. Årsaken til denne manglende sammenhengen er også uklar. En mulig faktor kan være tykkelsen på hud (epidermis) hos fisk fra det kontrollerte forsøket kontra fisk i kommersiell oppdrettssammenheng. En annen faktor kan være at forekomsten av eventuelle gassbobler i feltstudien var mindre uttalte enn i de kontrollerte forsøkene. I det kontrollerte forsøket var fisken mindre

og huden over finnene tydelig tynnere i en slik grad at de var nærmest gjennomsiktige. Det mistenkes at det også hos større oppdrettsfisk kan dannes bobler i finner, men at disse vil være krevende å se under den tykkere, pigmenterte huden hos større fisk. Som det vil fremgå av velferdsvurderingene var det også betydelig forekomst av finneskader hos flere fisk, et forhold som også er med på å øke tykkelsen til hudens epidermis (epitelial hyperplasi).

Velferdsscore

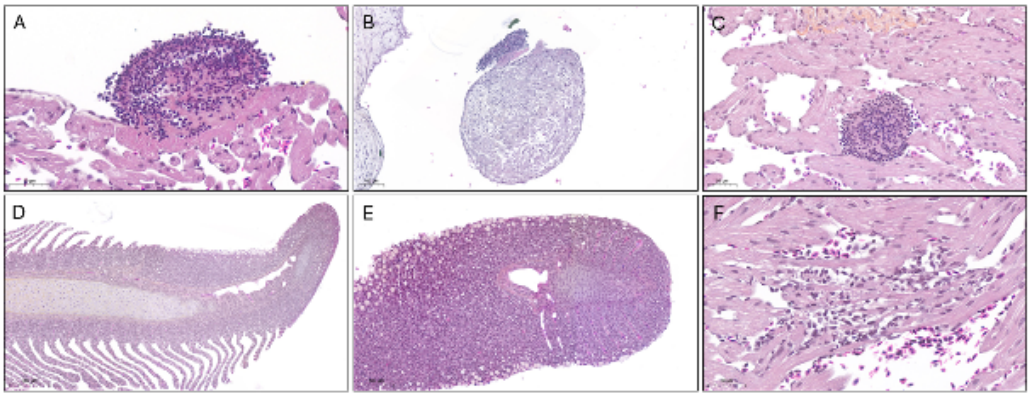
Det ble observert avvik på alle kategorier unntatt gjellelokkforkortelse hos kontrollfisk og fra lossingen. Det var jevnt over moderat forekomst av hudblødninger, skjelltap, snuteskader og skader i brystfinne. Skader på halefinnen var den indikatoren som hyppigst ble vurdert med høyeste score. Fra statistiske undersøkelser ble det funnet høyere forekomst av skader i brystfinner etter lasting og fra lossing sammenlignet med kontroll (Kruskal-Wallis chi-squared = 12.364, df = 2, p-value = 0.002066), forskjell i skjelltap mellom etter lasting og fra lossing (Kruskal-Wallis chi-squared = 9.0951, df = 2, p-value = 0.01059),) og signifikant høyere forekomst av sår fra kontrollfisk (Kruskal-Wallis chi-squared = 10.665, df = 2, p-value = 0.004832) (figur 8). Det statistiske grunnlaget er imidlertid begrenset, med kun 8 fisk i kontrollgruppen. Utover dette var det overordnede inntrykket at det forelå kun små forskjeller mellom gruppene.



Figur 8: Oversikt over fordeling av velferdsscore fordelt på kontroll (før lasting fra merd), etter lasting og fra lossing (brønnbåtoperasjon 1). Ulike bokstaver indikerer statistisk signifikant forskjell av score mellom de ulike tidspunktene i behandlingen.

Histologi

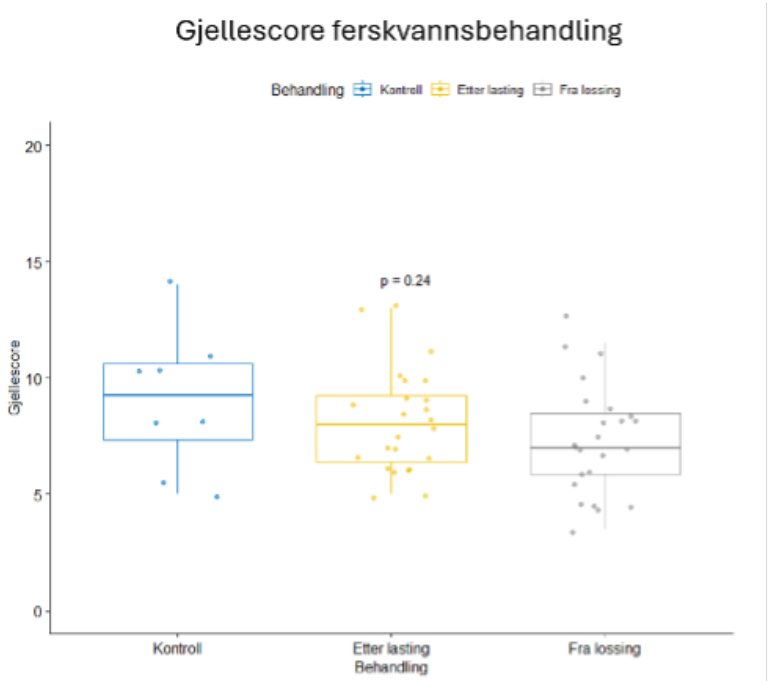
Samlet ble det observert svært sparsomme til moderate vevsforandringer hos 49 av 60 undersøkte fisk. Av funn som mistenkes å kunne relateres til gassboblesyke ble det funnet ferske trombedannelser i endokard i ventrikkel hos fem fisk (to fisk etter lossing og tre fisk fra lossing), samt kaverner uten omgivende vevsresponser til filamentarterier i ytre/distale del av filament hos to fisk fra lossing (figur 9 A-E). Ingen tilsvarende forandringer ble observert hos kontrollfisken. Av øvrige funn kan det nevnes funn som mistenkes å være relatert til agens, og det ble påvist forandringer forenelige med hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (figur 9 F) hos 33 fisk i varierende grad, fra svært sparsom (15 fisk), sparsom (17 fisk) til moderat (en fisk). For sikker diagnose anbefales verifisering av etiologisk agens ved hjelp av PCR-undersøkelse. Dette ble ikke utført på disse individene. Videre ble det hos en fisk påvist dermatitt med betennelse og vevstap som strakte seg ned i hypodermis, med vevsforandringer som minner om det som ses ved bakterielle infeksjoner for eksempel med *Moritella viscosa*.



Figur 9: Eksempel på histologiske forandringer observert fra fisk fra ferskvannsbehandling. A) Trombe i endokard i ventrikkel (FL). B) Trombe på ventrikulobulbær hjerteklaff (EL). C) Trombe i endokard i atrium (FL). D og E) Kaverne i ytre/ distale del av filament som gir mistanke om gassboble (FL). F) Betennelse i indre hjertehinne (endokarditt) i atrium, en vevsforandring som sammen med betennelse i skjelettmuskulatur inngikk i diagnose hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (FL). FL – fisk fra lossing, EL – fisk fra etter lasting.

Av funn som ikke ga mistanke om noe spesifikt årsaksforhold ble det påvist svært sparsom betennelse i skjelettmuskulatur (myositt) hos fire fisk, og svært sparsom betennelse i hjerte (endokarditt i atrium og spongiøst lag i ventrikkel); det utelukkes ikke at disse forandringene kan ha sammenheng med HSMB, men grad av vevsforandringer var for sparsomme for å anslå etiologi. Videre ble det påvist kronisk keratitt med synechia hos en fisk, og kronisk nefrokalsinose med uttalt dilatasjon av ekskretorisk vev hos en fisk.

Semi-kvantiatativ gjellescore viste forandringer i øvre sjikt av hva som betraktes som milde forandringer. Det var en trend med høyest snitt for kontrollfisk, men forskjellen var ikke statistisk signifikant (figur 10). Det ble ikke observert noen skader i gjellene tilsvarende det som ble observert i kontrollerte forsøk ved eksponering for skadelige doser av kobber og sink.



Figur 10: Oversikt over fordeling av semi-kvantitativ gjellescore fordelt på kontroll (før lasting fra merd), etter lasting og fra lossing (brønnbåtoperasjon 1). Det ble ikke funnet noen statistisk forskjell mellom de ulike gruppene (Kruskal-Wallis chi-squared = 2.8468, df = 2, p-value = 0.2409).

4.2 Ferskvannsbehandling etterfulgt av termisk behandling (brønnbåtoperasjon 2)

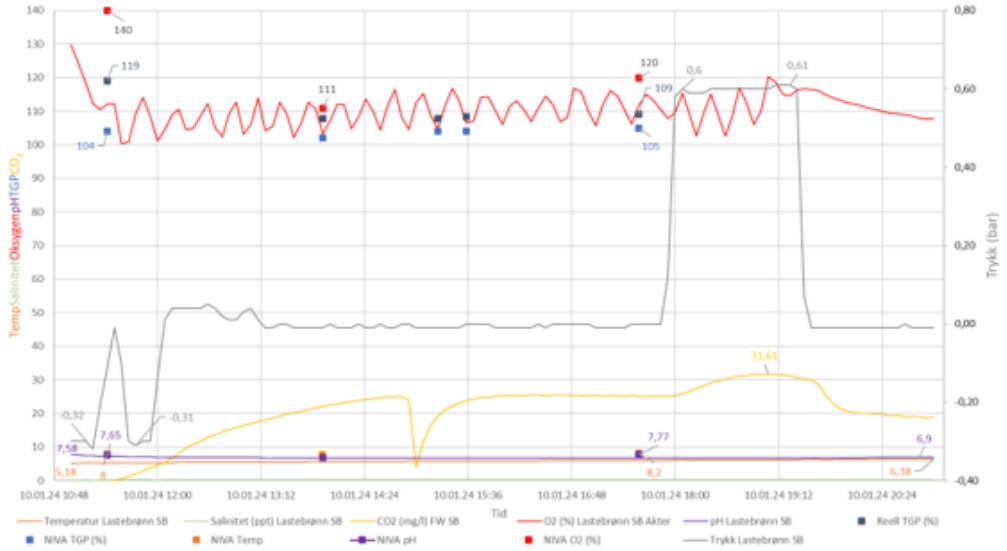
Brønnbåtoperasjon 2 bestod av to runder (last 1 og last 2) med ferskvannsavlusning og termisk avlusning på vei ut. Fisken ble lastet med undertrykk, eksponert for ferskvann fra et settefiskanlegg (råvann) i 6 timer og losset med overtrykk via en termisk avlusningsenhet til merd. Begge brønnene ble benyttet i hver last og fisketettheten i begge lastene var like (tabell 2). På grunn av fokuset på den termiske avlusningen, ble det kun tatt vannprøver av styrbord brønn i løpet av begge lastingene og ved slutten av begge ferskvannsbehandlingene (tabell 4). Sensormålingene stammer også fra denne brønnen. Fra den termiske avlusningsenheten ble det tatt vannprøver før, midtveis og ved slutten av utpumpingen, for begge lastene.

4.2.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer

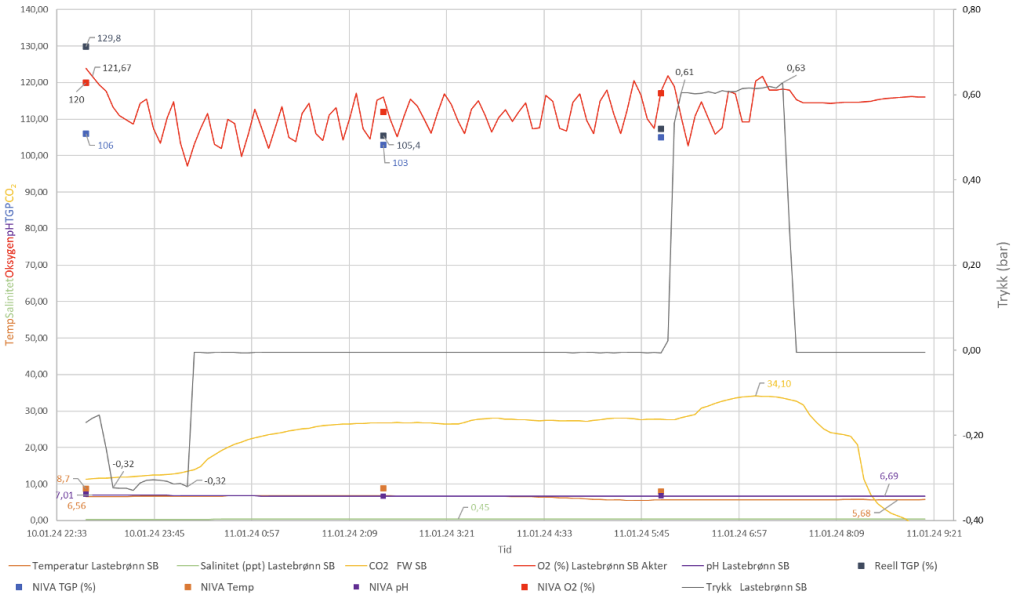
Resultatene fra begge lastene indikerte at pH, CO_2, salinitet, temperatur og oksygen (figur 11 og 12) var innenfor retningsgivende intervaller og anbefalinger (brønnbåtveilederen.no) under ferskvannsbehandlingene. Last 1 hadde et noe større pH-dropp enn last 2, på tross av ellers like forhold. En mulig forklaring kan være at last 2 var andregangs bruk av vannet og hadde noe høyere bufferkapasitet eller at utluftingseffektiviteten var høyere. Båtens CO_2 målinger viste at ved begge ferskvannsbehandlingene var CO_2 konsentrasjoner innenfor anbefalte verdier for brønnbåtoperasjoner (brønnbåtveilederen.no) stort sett hele holdetiden, bortsett fra mot slutten av lossingen. Beregnet CO_2 fra vannprøvene som ble tatt før lossingen begynte, viste noe lavere konsentrasjon enn sensormålingene. Den kolorimetriske metoden for CO_2 indikerte betydelig lavere konsentrasjon, sannsynligvis pga. suboptimal prøveoppbevaring.

Totalgassmålingene viste 104 % TGP under lastingen av last 1 og 106 % TGP under lasting

av last 2 (figur 11 og 12). Korrigerte målinger av totalgassmetning under lasting av last 1 ble beregnet til 119 % og under lasting av last 2 til 129,8 % (figur 11 og 12) Dette er en del lavere enn for brønnbåtoperasjon 1, som hadde større løftehøyde. Øvrige sensordata (figur 11 og 12) viste stort sett verdier innenfor anbefalte grenseverdier (brønnbåtveilederen.no), men noe høy oksygenmetning.



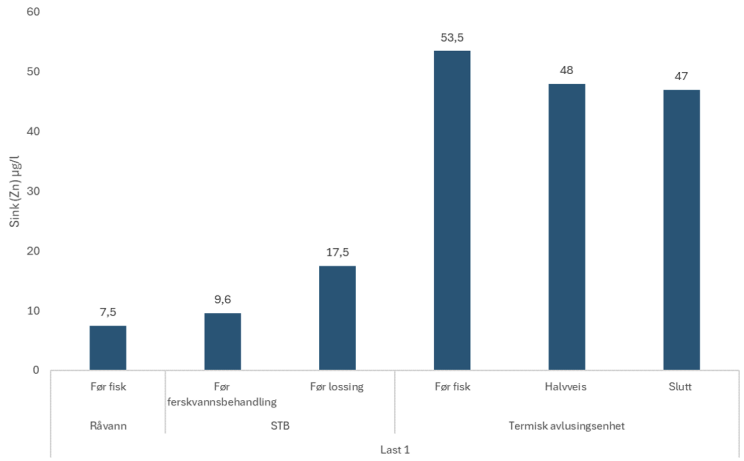
Figur 11: Sensordata og loggdata fra kombinasjonsbehandling med ferskvann og termisk avlusing, 10. januar 2024, last 1 (brønnbåtoperasjon 2). For tegnforklaring se fig. 1



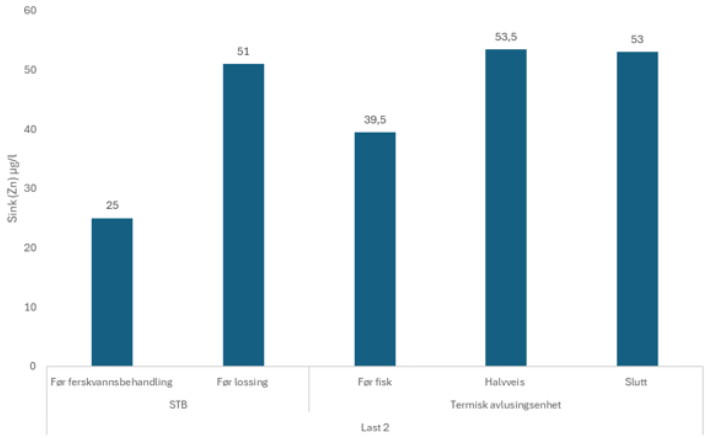
Figur 12: Sensordata og loggdata fra kombinasjonsbehandling med ferskvann og termisk avlusing, 10. til 11. januar 2024, last 2 (brønnbåtoperasjon 2). For tegnforklaring se fig. 1

Det var lav organisk belastning i råvannet og noe akkumulering av totalt organisk karbon (TOC) og total ammonium nitrogen (TAN) gjennom ferskvannsbehandlingene med tegn til gjenbruk av vann i last 2 (tabell A.4 og A.5). Vannprøvene fra den termiske avlusingsenheten indikerte naturlig nok en betydelig akkumulering av TOC, TAN og ammoniakk (NH_3-N). TOC i avlusningsenheten økte fra 8,0 til 60,4 mg C/l under last nr. 1 og fra 8,0 til 76,6 mg C/l under last nr. 2. TAN økte fra 1,4 mg/l til 11,1 mg/l NH_4-N i last nr. 1 og fra 1,8 til 11,8 mg/l NH_4-N i last nr. 2, med tilsvarende høye ammoniakkverdier (A.5). De beregnede verdiene av ammoniakk overskred dermed retningsgivende intervaller og anbefalinger (Brønnbåtveilederen) og anbefalt grenseverdi for langtidseksponering på 12 µg/l (Fivelstad *mfl.*, 1995), men ligger under anbefalt grense for akutteksponering (100 µg/l NH_4) (Wedemeyer, 1996). Effekten av slik korttidseksponering for høye konsentrasjoner av ammoniakk i kombinasjon med høye temperaturer og gassovermetning, er i liten grad dokumentert.

Sammenlignet med brønnbåtoperasjon 1 var sinkverdiene fra brønnbåtoperasjon 2 lave (figur 13 og 14). I brønnbåtoperasjon 2 økte verdiene i ferskvannsbehandlingen fra 7,5 µg/l til 17,5 µg/l i last nr. 1 og fra 25 til 51 µg/l i last nr. 2 (tabell A.4 og A.5, figur 13 og 14). Gjenbruk av vannet har ført til denne økningen, men akkumuleringen er betydelig mindre enn ved de andre brønnbåtoperasjonene. En mulig forklaring kan være at det ble benyttet betydelig mindre sinkholdig korrosjonsbeskyttelse i denne båten. Konsentrasjonen av totalt sink i den termisk avlusingsenhet var rundt 50 µg/l i begge lastene, med tilsynelatende liten eller ingen akkumulering i løpet av den termiske behandlingen.



Figur 13: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før og under 6 timer ferskvannsavlusning + termisk avlusing, last 1 (brønnbåtoperasjon 2).



Figur 14: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før og under 6 timer ferskvannsavlusning + termisk avlusing, last 2 (brønnbåtoperasjon 2).

Aluminiumsverdiene var over gjennomsnittet for norske råvann (64 µg/l, VK-databasen) i begge lastene, men det er ingen fastsatte grenseverdier for total aluminium (Al), da blant annet tilstandsformen vil ha betydning for giftigheten for fisk. Det var også lave verdier av labilt aluminium (LAl).Det kan se ut som jern akkumulerte under ferskvannsbehandlingene, men det finnes ikke grenseverdier for total-jern, fordi giftigheten av jern avhenger av form og mengden partikler i vannet, dvs. om det er organisk bundet eller fritt og biotilgjengelig. Kalsiumverdiene var normale i begge lastene (>2,5 mg Ca/l, Rosseland, 1989). I den termiske avlusningsenheten kan det se ut som det var noe forhøyede kobberverdier, men ingen akkumulering. Det kan tenkes at dette stammer fra varmeenheten som ofte består av kobberrør (tabell A.4 og A.5).

Vannkortisol

Av de tre brønnbåtoperasjonene ble den høyeste kortisolkonsentrasjonen i vannet målt ved avslutning av termisk behandling (tabell 9). Totalkonsentrasjonen av kortisol i vannet som ble brukt i 2,5-3 timer i den termiske avlusingsenheten ved slutt var relativt lik mellom last 1 (258 ng/l) og last 2 (253 ng/l). Den termiske behandlingen skilte seg betydelig fra de andre operasjonene ved at en høy biomasse gikk igjennom en begrenset vannmengde på relativt kort tid, og enkelte fisk var kun kort tid i sløyfen. Det var derfor ikke mulig å sammenligne akkumulering av kortisol med operasjoner der hele biomassen var i et lukket vannvolum over lengre tid.

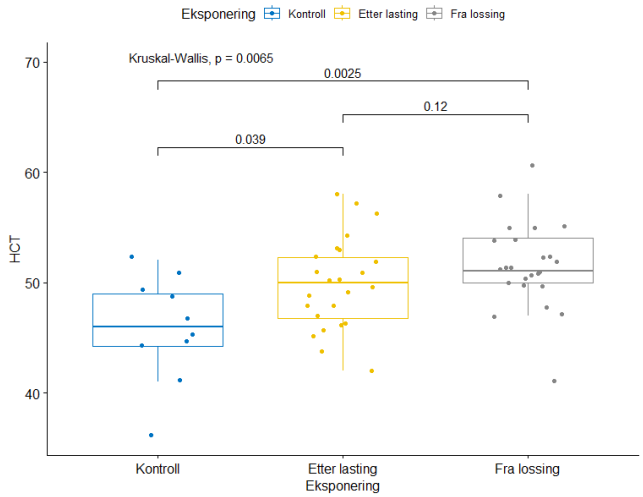
	Last 1	Last 2
Kortisol kons. (ng/l) før termisk behandling	13	23
Kortisol kons. (ng/l) ved avslutning termisk behandling	258	253

Tabell 9: Vannkortisol konsentrasjoner (ng/l) under termisk avlusing etter ferskvannsbehandling.

4.2.2 Effekt på fisk

Gjellemetall
Prøvene av gjelle-aluminium, gjelle-jern og gjelle-kobber viste verdier innenfor anbefalt nivå både før og etter ferskvannsbehandlingen og lossing via den termiske avlusingsenheten fra last 2 (<10 µg/g Al, <3,5 µg/g Cu og <500 µg/g Fe) (tabell A.6). Gjellemetall fra last 1 ble ikke analysert. For vurderinger omkring skadegrense for gjelle-Zn se avsnitt under-underseksjon 4.1.1.

Hematokrit
Det ble observert signifikant lavere hematokrit hos fisk fra kontroll (før lasting under trenging i merd) sammenlignet med etter lasting og etter lossing. Mellom de to sistnevnte var det ingen signifikant forskjell (figur 15), men en tendens til stigende hematokrit mot slutten. Her gjelder samme vurdering som for hematokrit målt under brønnbåtoperasjon 1 (4.1.2).



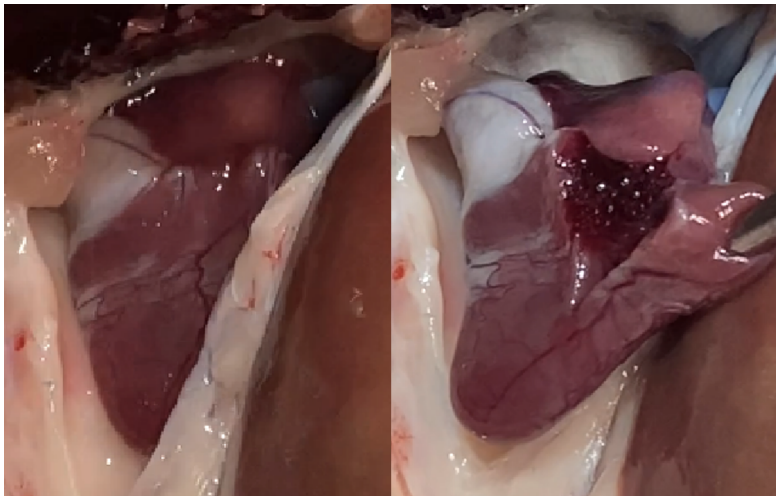
Figur 15: Hematokrit (HCT) for kontroll (før lasting), etter lasting og fra lossing under ferskvannsbehandling etterfulgt av termisk behandling (brønnbåtoperasjon 2). Det var signifikant lavere HCT for kontrollfisk sammenlignet med etter lasting ($p=0,039$) og etter lossing ($p=0,0025$), mens det var ingen signifikant forskjell mellom etter lasting og etter lossing ($p=0,12$) (Kruskal-Wallis test).

Ultralyd, boblescore finner og makroskopiske funn
Det var ingen funn på ultralyd like etter sedasjon av fisken, og heller ingen bobledannelse i finner. I etterkant av at blodprøvetaking var det i denne brønnbåtoperasjonen fire fisk med påvisninger av gassbobler ved ultralyd (tabell 10). Tre av disse påvisningene var hos kontrollfisk i merd. For omtale vedrørende mulige årsakssammenhenger, se avsnitt 4.4.2.

Like etter fullført lasteoperasjon ble det observert gassbobler i hjertet hos et individ ved obduksjon (tabell 10). Kvantiteten var ikke i noen tilfeller så stor at atriet ble dilatert, og det var heller ikke mulig å se boblene gjennom atrieveggen. Det var nødvendig å åpne inn til hjertets hulrom for å påvise bobler makroskopisk (figur 16).

		Antall fisk undersøkt	Funn ultralyd innledende undersøkelse	Funn ultralyd påfølgende undersøkelse etter blodprøve	Makroskopiske observasjon av bobler i hjerte og hjertenære strukturer	Hyperemisk atrium uten påvisning av bobler
Last 1	Kontroll, fra merd under trenging/lasting	4	0	1	0	0
	Fra trunk etter lasting	12	0	1	1	1
	Fra lossing	12	0	0	4	1
Last 2	Kontroll, fra merd under trenging/lasting	6	0	2	0	0
	Fra trunk etter lasting	12	0	0	0	0
	Fra lossing	12	0	0	1	0

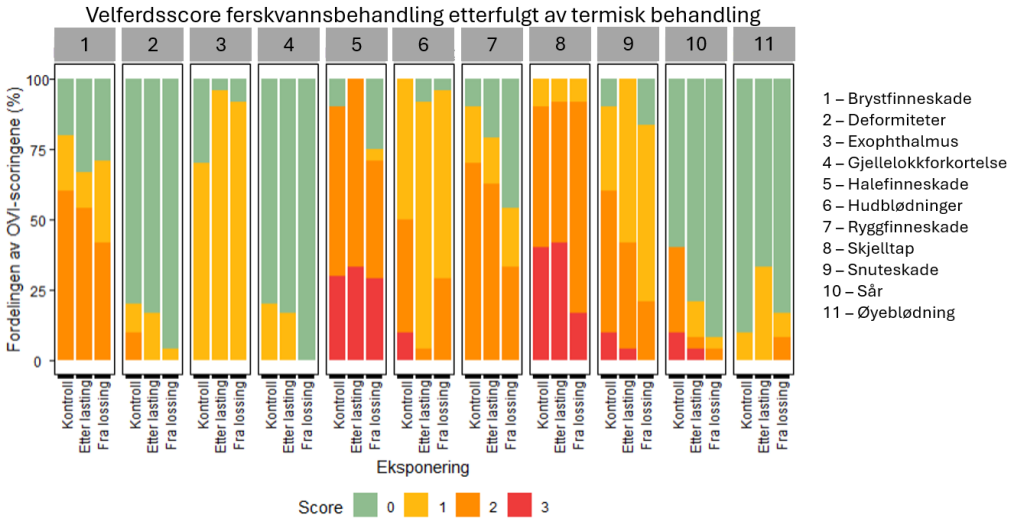
Tabell 10: Oversikt over funn fra ultralydundersøkelse og makroskopisk undersøkelse av fisk ved obduksjon fra ferskvannsbehandling etterfulgt av termisk behandling (brønnbåtoperasjon 2). Tall i parentes angir antall individer med usikkerhet rundt påvisning.



Figur 16: Til venstre: Ikke dilatert atrium, gassbobler ikke synlig gjennom atrieveggen, bilde fra obduksjon av fisk tatt ut fra brønn like etter fullført lasting. Til høyre: Samme individ som til venstre, bobler avdekket etter å ha åpnet inn til hjertets hulrom.

Velferdsscore

Ved operasjonen ble det observert avvik på alle kategorier med unntak av gjellelokkforkortelse etter lossing. Mens det jevnt over var moderat forekomst av hudblødninger og snuteskader, ble høyeste frekvens av alvorligste score observert for skader i halefinne, samt for skjelltap. Det ble ikke påvist statistisk signifikant forskjell i velferdsscore mellom de ulike trinnene i behandlingene (figur 17).

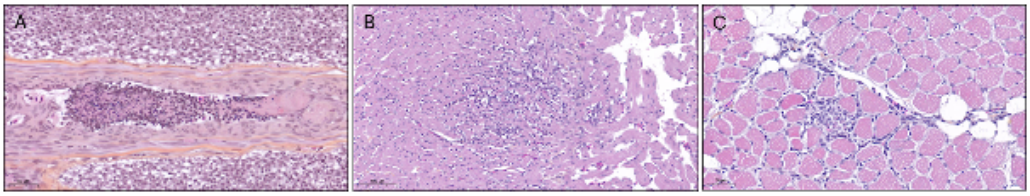


Figur 17: Oversikt over fordeling av velferdsscore fordelt på kontroll (før lasting fra merd), etter lasting og fra lossing (brønnbåtoperasjon 2). Det ble ikke funnet statistisk signifikant forskjell i score mellom de ulike trinnene i behandlingene.

Histologi

Samlet sett ble det observert svært sparsomme til moderate vevsforandringer hos 59 av 60 undersøkte fisk. Det ble observert trombedannelser i ytre/distale del av gjellefilamentet (figur 18 A) hos ni fisk, varierende i grad fra svært sparsom (8 fisk) til moderat (1 fisk). Forandringene ble påvist hos to kontrollfisk, fem fisk etter lasting og to fisk etter lossing. Det mistenkes at slike forandringer kan oppstå som et resultat av gassboblesyke, men funn hos kontrollfisk indikerer også andre mekanismer bak utviklingen av slike forandringer, eventuelt tidligere gjennomgått gassboblesyke. Det påpekes også at ytre/distale del av gjellefilamentet ikke alltid er med i snittflaten og forekomst kan derfor være underestimert.

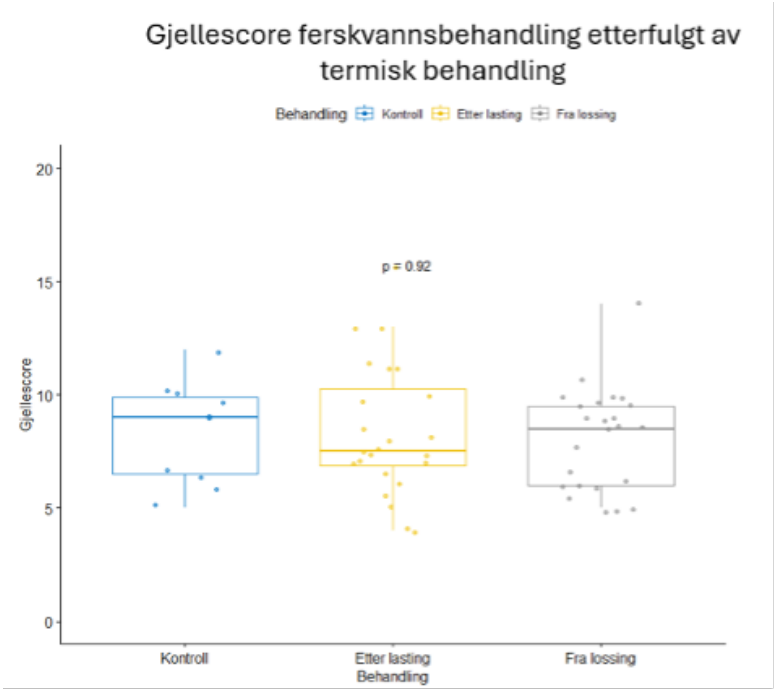
Av funn som mulig kunne relateres til et spesifikt agens, ble det påvist forandringer som anses som forenelige med HSMB (figur 18 B og C) hos 48 fisk varierende i grad fra svært sparsom (1 fisk), sparsom (28 fisk), moderat (18 fisk) til rikelig (1 fisk). For sikker diagnose anbefales verifisering av etiologisk agens ved hjelp av PCR-undersøkelse; dette ble ikke utført hos disse individene. Hos 18 fisk ble det påvist epiteliocyster i gjellene varierende i grad fra svært sparsom (12 fisk), sparsom (5 fisk) til moderat (1 fisk), men det ble ikke påvist vevsreaksjoner som typisk ses ved sykdom forårsaket av epiteliocyste-dannende bakterier, og funn kvalifiserer derfor ikke for diagnose epiteliocystis. Videre ble det hos en fisk påvist dermatitt med betennelse og vevstap som strakte seg ned i hypodermis og med vevsforandringer som minner om det som ses ved bakterielle infeksjoner for eksempel med *Moritella viscosa*.



Figur 18: Eksempel på histologiske forandringer observert fra fisk fra ferskvannsbehandling etterfulgt av termisk behandling. A) Trombe i ytre/ distale del av filament (FL); slike forandringer ble også observert hos kontrollfisk før lasting. B) Betennelse i kompakt lag av ventrikkel (myokarditt) (K), samt C) betennelse i rød (aerob) skjelettmuskulatur (FL), funn som inngikk i diagnose hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (FL). FL – fisk fra lossing, K – kontroll; fisk før lasting.

Av funn som ikke ga mistanke om noe spesifikt årsaksforhold ble det påvist svært sparsom betennelse i skjelettmuskulatur (myositt) (1 fisk), og svært sparsom (1 fisk), sparsom (5 fisk) til moderat (1 fisk) betennelse i hjerte (endokarditt i atrium og spongiøst lag i ventrikkel, og myokarditt i kompakt lag av ventrikkel). Det utelukkes ikke at disse forandringene kan ha sammenheng med HSMB, men grad av vevsforandringer var for sparsomme for å anslå etiologisk årsak. Videre ble det hos to fisk påvist kronisk dermatitt av ukjent årsaksforhold, samt hos en fisk ble det påvist samtidig uttalt betennelse i ytre hjertehinne (perikarditt) med sammenvoksinger mellom viscerale og parietale lag av epikard, samt degenerasjon av pseudobranch.

Semi-kvantitativ gjellescore viste forandringer i øvre sjikt av hva som betraktes som milde forandringer, med relativt lik score mellom de ulike trinnene i behandlingene (se figur 19). Det ble ikke observert noen skader i gjellene tilsvarende det som ble observert i kontrollerte forsøk ved eksponering av skadelige doser kobber og/eller sink.



Figur 19: Oversikt over fordeling av semi-kvantitativ gjellescore fordelt på kontroll (før lasting fra merd), etter lasting og fra lossing (brønnbåtoperasjon 2). Det ble ikke funnet noen statistisk forskjell mellom de ulike gruppene (Kruskal-Wallis chi-squared = 0.16768, df = 2, p-value = 0.9196).

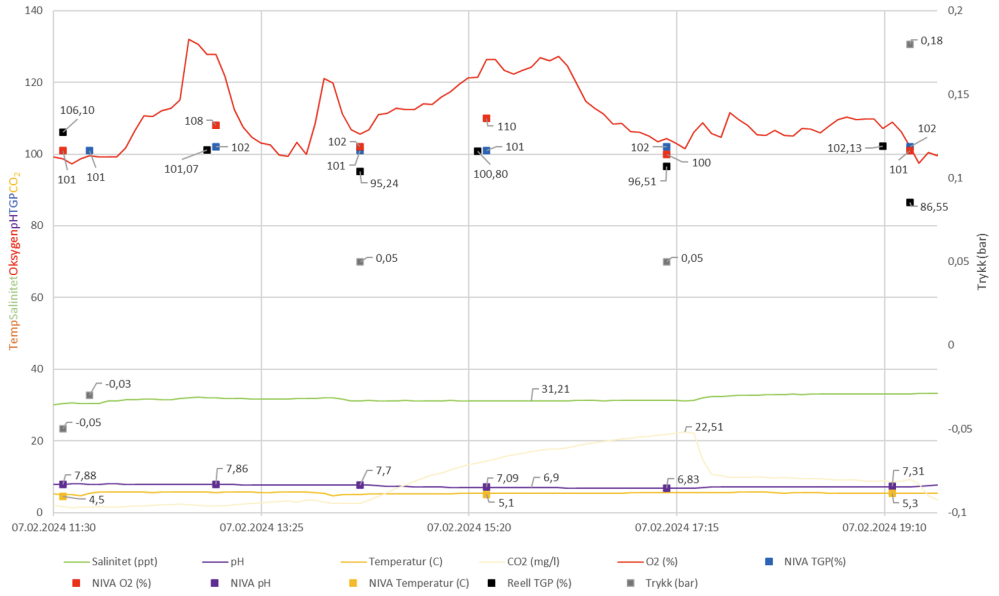
4.3 Transport av laks til slakteri (brønnbåtoperasjon 3)

Brønnbåtoperasjon 3 bestod av to påfølgende slaktetransporter (last 1 og last 2) hvor brønnene ble holdt lukket i ca. 3,5 timer og total tid var i overkant av 5 timer. Fisketettheten var noe høyere i last 1 (110 kg/m^3) enn i last 2 (92 kg/m^3). Det ble tatt vannprøver fra babord brønn i begge lastene. I last 1 representerer den midterste prøven (tatt 17:05) slutten av den lukkede perioden og i last 2 representerer den siste prøven (07:35) slutten av den lukkede perioden (Tabell 7 og 8).

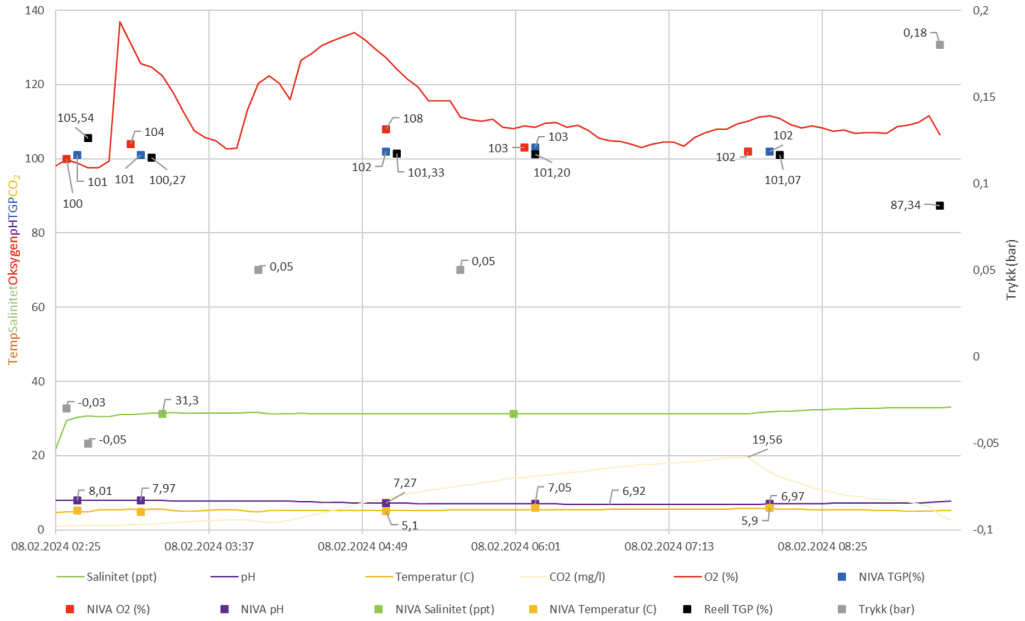
4.3.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte stoffer

Sjøvann har vanligvis en pH på rundt 8, hvor variasjoner hovedsakelig er knyttet til ulikheter i salinitet. Ved høy tetthet av fisk akkumuleres CO_2 i vannet, noe som fører til en gradvis reduksjon i pH. Hvor mye pH synker avhenger i stor grad av effektiviteten til utluftingssystemet som benyttes for å fjerne overskudd av CO_2. Sjøvann har imidlertid en høyere bufferkapasitet enn ferskvann, noe som gjør at pH i sjøvann er mer stabil. I den lukkede perioden sank pH-verdiene med ca. 1 pH-enhet (tabell A. 7 og A. 8). Beregnet CO_2 og sensormålingene indikerte like verdier som var innenfor anbefalte verdier for brønnbåtoperasjoner. Den kolorimetriske målingen av CO_2 indikerte lavere konsentrasjon og må nok ha blitt påvirket av prøvetransporten eller prøvelagringen.

I denne brønnbåtoperasjonen var det benyttet en betydelig minimal trykkendring ved lasting og lossing, slik at totalgassmetningen ikke ble påvirket i like stor grad som i de andre brønnbåtoperasjonene. Reell totalgassmetning ved lasting var 106 % TGP i last 1 og 105 % TGP i last 2 mot *in situ* målingen på hhv. 101 % TGP i begge lastene (figur 20 og 21). Det ble ikke foretatt flere målinger av *in situ* TGP etter at lastene gikk fra lukket til åpen og det er dermed ikke mulig å sammenligne *in situ* TGP % med reell TGP % under lossing (figur 20 og 21). Øvrige sensormålinger var innenfor retningsgivende intervaller og anbefalinger, men oksygenmålingene overskred dette noe (brønnbåtveilederen.no) (figur 20 og 21).

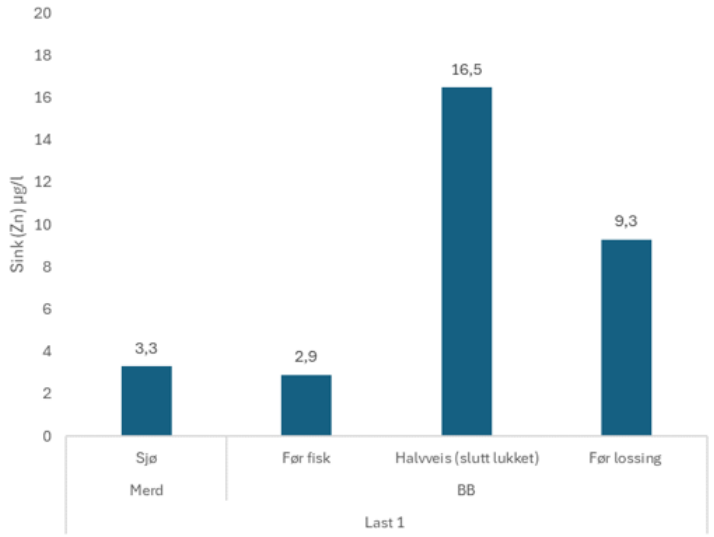


Figur 20: Sensordata og loggdata fra brønnbåtoperasjon 3. Slaktetransport på 5 timer. Last 1. Transporten gikk lukket fra kl. 14:00 til 17:24. For tegnforklaring se fig. 1

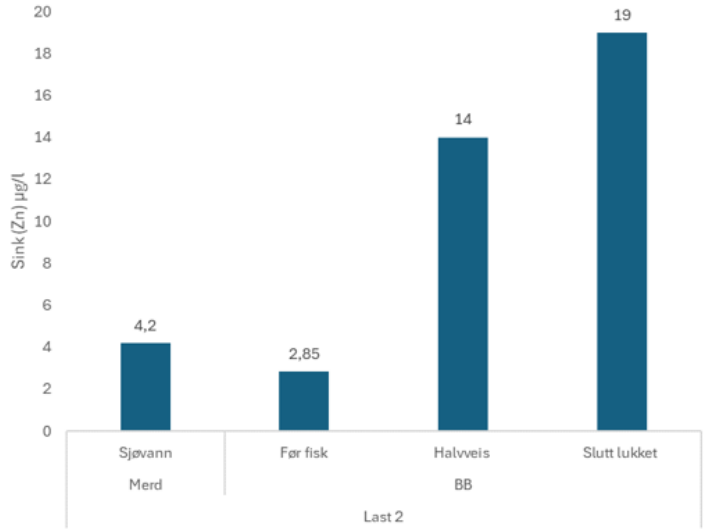


Figur 21: Sensordata og loggdata fra brønnbåtoperasjon 3. Slaktetransport på 5 timer. Last 2. Transporten gikk lukket fra kl. 04:06 til 07:50. For tegnforklaring se fig. 1

Konsentrasjonen av ammonium steg under den lukkede perioden, men verdiene var godt under anbefalte grenseverdier (brønnbåtveilederen) (Tabell 13 og 14). Det var lite akkumulering av organisk materiale i begge lastene, noe som gjenspeiler den lave belastningen (tabell A.7 og A.8). De totale mengdene av aluminium, kobber og jern var lave og uproblematiske. Ved begge lastene var det lite akkumulering av sink i den lukkede perioden og dermed konsentrasjoner som ikke påvirket fisken (figur 22 og 23).



Figur 22: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før og under slaktetransport last 1 (brønnbåtoperasjon 3).



Figur 23: Konsentrasjon av sink (µg/l) i vannet før og under slaktetransport last 2 (brønnbåtoperasjon 3).

Vannkortisol

Under brønnbåtoperasjon 3 ble det tatt vannprøver for analyse av vannkortisol da transporten gikk lukket. Fra lasting til prøvetaking (slutt lukket) gikk det ca. 3,5 timer for begge lastene. Total konsentrasjon kortisol (ng/l) var høyest ved slutten av den lukkede perioden under last 1 (82 ng/l) sammenliknet med last 2 (54 ng/l) (tabell 11). Den høyere konsentrasjonen skyldes antakelig i hovedsak høyere biomasse under last 1. I de kontrollerte forsøkene der lukket sjøvannstransport i 8 timer ble simulert, var kortisolkonsentrasjonen ved avsluttet forsøk 77±10 ng/l (kontrollgrupper som ikke var utsatt for forhøyet Zn).

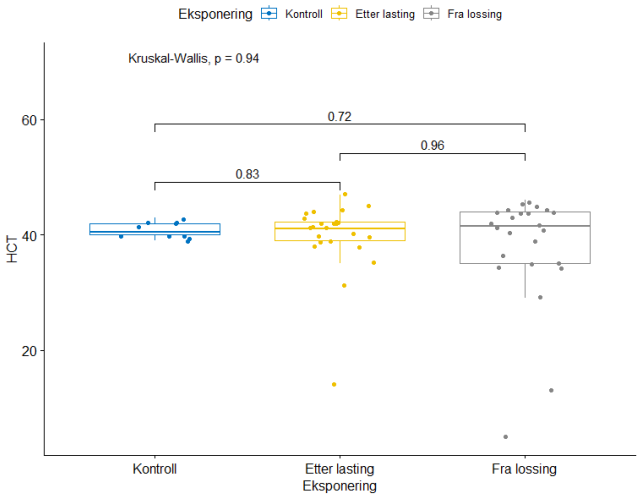
	Last 1	Last 2
Kortisol kons. (ng/l) før lasting	<0,5	<0,5
Kortisol kons. (ng/l) midtveis (220 min)	na	43
Kortisol kons. (ng/l) slutt lukket transport (ca. 300 min)	82	54

Tabell 11: Vannkortisol konsentrasjoner (ng/l) under slakttransportens lukkede faser. na - ikke undersøkt.

4.3.2 Effekt på fisk

Gjellemetall
Prøvene av gjelle-aluminium, gjelle-jern og gjelle-kobber viste verdier innenfor anbefalt nivå både før og etter last 2 fra slaktetransporten (<10 µg/g Al, <3,5 µg/g Cu og <500 µg/g Fe) (tabell A.9). Gjellemetall fra last 1 ble ikke analysert. For vurderinger omkring skadegrense for gjelle-Zn se avsnitt 4.1.1.

Hematokrit
Det ble ikke observert signifikant forskjell i hematokrit mellom de ulike tidspunktene (figur 24). Det var en trend med økende spredning i hematokrit med behandlingstrinn, men det bemerkes at det var lavere antall individer i kontroll-uttaket.



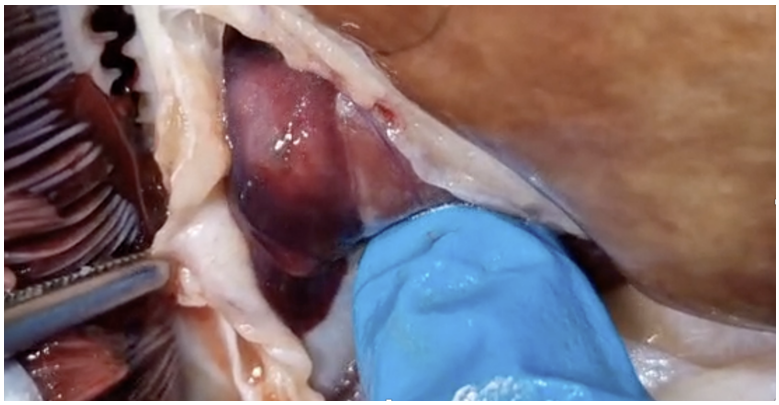
Figur 24: Hematokrit (HCT) for kontroll (før lasting), etter lasting og fra lossing under slaktetransport (brønnbåtoperasjon 3). Det ble ikke observert signifikant forskjell i hematokrit mellom de ulike eksponeringene (Kruskal-Wallis test).

Ultralyd, boblescore finner og makroskopiske funn
Ved oppfølging av slaktetransporter ble det heller ikke påvist gassbobler ved ultralyd like etter sedasjon, og heller ikke her ble det sett gassbobler i finner. Imidlertid ble det sett bobler på ultralyd etter obduksjon hos en fisk etter lasting (last 1) og en fisk etter lossing (last 2), samt gassbobler i hjerte og/eller lever i 4 av de undersøkte individene ved obduksjon (tabell 12). I disse tilfellene var det anmerket gass i sinus venosus, og det var ingen tilfeller av dilatert atrium eller synlige gassbobler gjennom en ikke-manipulert intakt atrievegg. Dette var henholdsvis fisk som var tatt ut fra merd under lasting (figur 25), etter lasting og ved lossing. Dette tilsier at artefakt antakelig er den mest sannsynlige forklaringen på funn av gassbobler ved denne obduksjonen, da det i denne brønnbåtoperasjonen var ingen eller marginal eksponering av fisk for trykkdifferanse fra atmosfærisk trykk/totalgassovermetning. For mer detaljerte vurderinger

om mulige årsakssammenhenger, se avsnitt 4.4.2.

		Antall fisk undersøkt	Funn ultralyd innledende undersøkelse	Funn ultralyd påfølgende undersøkelse etter blodprøve	Makroskopiske observasjon av bobler i hjerte og hjertenære strukturer	Hyperemisk atrium uten påvisning av bobler
Last 1	Kontroll, fra merd under trenging/lasting	6	0	0	1	0
	Fra trunk etter lasting	12	0	1	2	0
	Fra lossing	12	0	0	1	0
Last 2	Kontroll, fra merd under trenging/lasting	4	0	0	0	0
	Fra trunk etter lasting	12	0	0	0	0
	Fra lossing	12	0	1	0	0

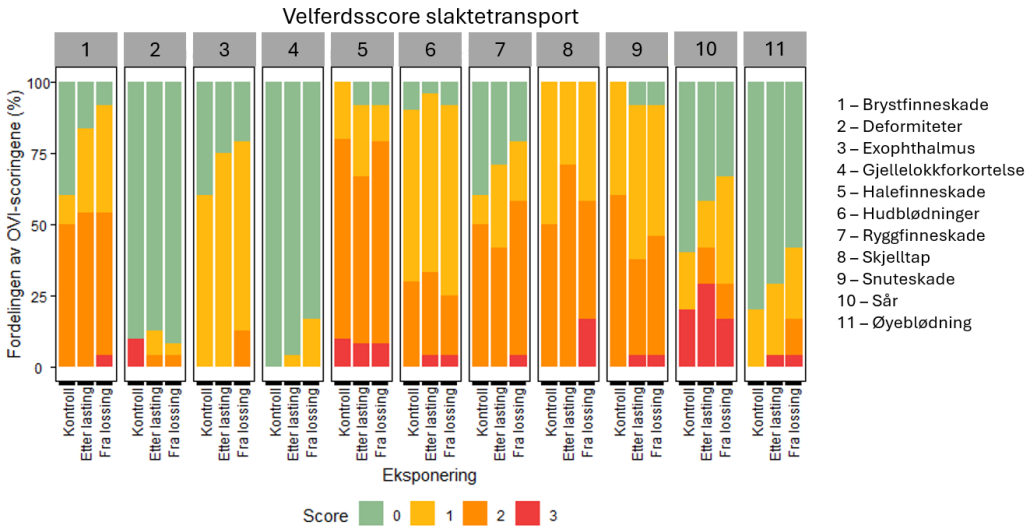
Tabell 12: Oversikt over funn fra ultralydundersøkelse og makroskopisk undersøkelse av fisk ved obduksjon fra slaktetransport (brønnbåtoperasjon 3).



Figur 25: Gassbobler synlig gjennom intakt atrievegg etter manipulasjon/trykk på ventrikkelen, fisk tatt ut fra merd under lasting.

Velferdsscore

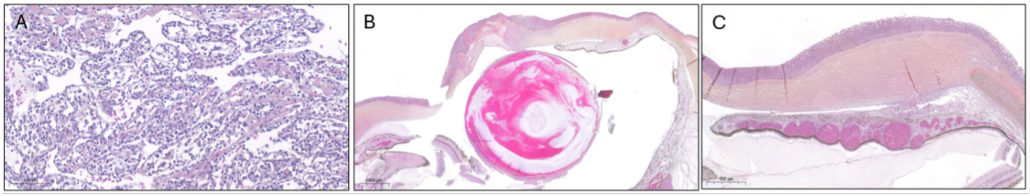
Fra operasjonen ble det observert avvik på alle kategorier unntatt gjellelokkforkortelse hos kontrollfiskene. Mens det jevnt over var moderat forekomst av hudblødninger, skjelltap, snuteskader og skader i halefinne, ble høyest frekvens av høyeste score observert for sår. Det ble ikke påvist statistisk signifikant forskjell i velferdsscore mellom de ulike trinnene i transporten, og det overordnede inntrykket var små forskjeller mellom gruppene (figur 26).



Figur 26: Oversikt over fordeling av velferdsscore fordelt på kontroll (før lasting fra merd), etter lasting og fra lossing (brønnbåtoperasjon 3). Det ble ikke funnet statistisk signifikant forskjell i score mellom de ulike trinnene i transporten.

Histologi
Samlet sett ble det observert svært sparsomme til uttalte vevsforandringer hos samtlige undersøkte fisk. Det var ingen funn som ga mistanke om gassboblesyke i det undersøkte materialet.

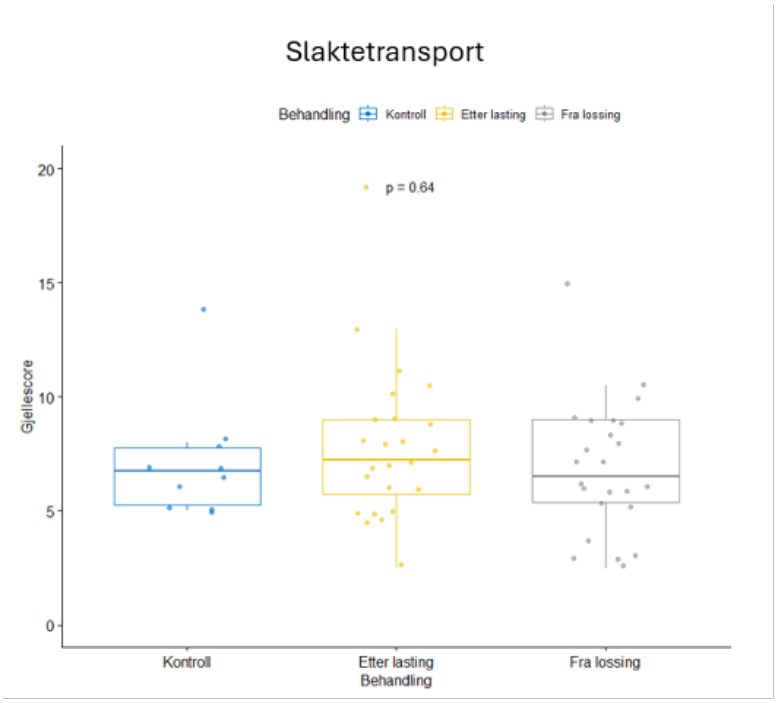
Av funn som kunne mistenkes å relateres til en spesifikk årsak/ spesifikt agens, ble det påvist forandringer som anses som forenlige med HSMB hos 21 fisk varierende i grad av svært sparsom (1 fisk), sparsom (15 fisk), moderat (4 fisk) til rikelig (1 fisk). Det ble påvist betennelse i hjerte typisk for kardiomyopatisyndrom (CMS) (figur 27 A) hos syv fisk, varierende i grad av sparsom (1 fisk), moderat (2 fisk), rikelig (3 fisk) til uttalt (1 fisk). For sikker diagnose anbefales verifisering av etiologisk agens ved hjelp av PCR-undersøkelse, dette ble ikke utført for disse individene. Hos 19 fisk ble det påvist epiteliocyster i gjellene varierende i grad av svært sparsom (17 fisk) til sparsom (2 fisk), men det ble ikke påvist vevsreaksjoner som typisk ses ved sykdom forårsaket av epiteliocyste-dannende bakterier, og funn kvalifiserer derfor ikke for diagnose epiteliocystis.



Figur 27: Eksempel på histologiske forandringer observert fra fisk fra slaktetransport (brønnbåtoperasjon 3). A) Nekrotisk endomyokarditt i atrium, forandringer som gir mistanke om CMS (FL). B) Uttalt kronisk keratitt med hyperplasi av epitel, fibrose og infiltrasjon av betennelsesceller med fibrin, og uttalt katarakt (EL). C) Skader i øye med stuvning og blødninger i iris, betennelse i irido-cornealvinkel og begynnende synechiae (EL). FL – fisk fra lossing, EL – fisk fra etter lasting.

Av funn som ikke ga mistanke om noe spesifikt årsaksforhold ble det påvist svært sparsom (17 fisk), sparsom (syv fisk) til moderat (fem fisk) betennelse i hjerte (endokarditt i atrium og spongiøst lag i ventrikkel, og myokarditt i kompakt lag av ventrikkel); det utelukkes ikke at disse forandringene kan ha sammenheng med HSMB og/ eller CMS, men grad av vevsforandringer var for sparsomme for å anslå etiologisk årsak. Videre ble det hos to fisk påvist kronisk dermatitt av ukjent årsaksforhold. Det ble observert kroniske skader i øye (katarakt, keratitt, konjunktivitt eller panoftalmitt) (figur 27 B og C) hos seks fisk, noe som tyder på nedsatt øyehelse. Hos en fisk ble det påvist uttalt histocytær interstitiell nefritt, og samtidige multifokale skader i gjellene gir mistenke om bakterielt årsaksforhold.

Semi-kvantitativ gjellescore viste forandringer i øvre sjikt av hva som betraktes som milde forandringer, med relativt lik score mellom de ulike trinnene i transporten (figur 28). Det ble ikke observert noen skader i gjellene tilsvarende det som ble observert i kontrollerte forsøk ved eksponering av skadelige doser kobber og/ eller sink.



Figur 28: Oversikt over fordeling av semi-kvantitativ gjellescore fordelt på kontroll (før lasting fra merd), etter lasting og fra lossing fra brønnbåtoperasjon 3. Det ble ikke funnet noen statistisk forskjell mellom de ulike gruppene (Kruskal-Wallis chi-squared = 0.87916, df = 2, p-value = 0.6443).

4.4 Sentrale funn fra brønnbåtoperasjonene sett i sammenheng

4.4.1 Vannkvalitet, trykk og totalgassmetning, samt akkumulerte forbindelser

Ferskvannsavlusingen i brønnbåtoperasjon 1 hadde høyest løftehøyde og høyest totalgassmetning. Det var tilsynelatende 2. gangs bruk av ferskvannet i begge lastene, da mye av sinken, samt andre akkumulerende stoffer, allerede var tilstede ved starten av ferskvannsbehandlingene. Buffertankene inneholdt for øvrig vann som tilsynelatende hadde vært brukt til ferskvannsbehandling tidligere (bl.a. forhøyet NH_3-N, TOC, Zn). Sammenliknet med de kontrollerte sinkforsøkene, var vannkvaliteten forskjellig, slik at både pH, saltholdighet og Ca-nivåene beskyttet fisken i større grad under denne brønnbåtoperasjonen. Analysene av gjellemetall indikerte lave verdier og at gjelle-sink ikke er en god indikator på mengden sink i vannet.

Ferskvannsavlusingen i brønnbåtoperasjon 2 var tilsynelatende mer skånsom pga. lavere løftehøyde og dermed lavere totalgassmetning og lavere konsentrasjon av totalsink, samt andre akkumulerende stoffer. Vannkvaliteten i den termiske avlusningsenheten ble betydelig redusert underveis, men effekten av slik kortidseksponering er i liten grad dokumentert.

Transport av slaktefisk i brønnbåtoperasjon 3, var tilsynelatende mest skånsom for fisken med lavere løftehøyde og generelt bedre og mer stabil vannkvalitet enn under avlusningsoperasjonene.

Det finnes en del felles feilkilder og usikkerhetsmomenter for de ulike brønnbåtoperasjonene. Hvorvidt det er sikret representative prøver, om sensorene er riktig kalibrert og vedlikeholdt og om de oppgitte mengdene er riktige er det knyttet noe usikkerhet til. Funnene må derfor tolkes og håndteres med dette i bakhodet.

4.4.2 Effekt på fisk

Ultralydundersøkelse av hjertet viste ingen gassbobler ved første undersøkelse av fisken etter sedasjon. Dette var tilfellet ved alle de tre brønnbåtoperasjonene.

Imidlertid ble det gjort ultralydfunn og/eller makroskopiske funn av gass i hjertet eller hjertenære strukturer ved obduksjon, *senere* i prøveuttakskjeden, i alle de tre brønnbåtoperasjonene. Blant disse funnene forelå det en trend hvor prevalensen av slike funn og kvantiteten av gass var høyest der totalgassmetningen var høyest:

- Brønnbåtoperasjon med størst trykkreduksjon/ totalgassovermetning (ferskvannsbehandling, brønnbåtoperasjon 1): Observert til dels betydelige mengder gass i hjertet, hvor atriet i noen tilfeller var dilatert av gassbobler og boblene kunne ses gjennom den intakte atrieveggen. Bobler ble funnet i 15 av 48 undersøkte individer etter lasting eller lossing, og i 0 av de 8 kontrollfiskene fra merd.
- Brønnbåtoperasjon med moderat trykkreduksjon/ totalgassovermetning (ferskvann og termisk avlusing, brønnbåtoperasjon 2): Forekomst av gassbobler, men disse forårsaket ingen dilatasjon av atriet og kunne heller ikke observeres gjennom den intakte atrievegggen. Bobler ble funnet i 7 av 48 individer etter lasting eller lossing, og i 3 av de 10 kontrollfiskene fra merd.

- Brønnbåtoperasjon med lite trykkreduksjon/ totalgassovermetning (slaktetransport): Forekomst av gassbobler, men ingen funn av dilatert atrium eller synlige gassbobler gjennom intakt atrievegg (unntatt ved manipulasjon av ventrikkelen). Bobler ble funnet i 6 av 48 individer etter lasting eller lossing, og i 1 av de 10 kontrollfiskene fra merd.

Gassdannelse post mortem (etter døden) er en viktig prosess i kroppens nedbrytning, kjent som putrefaksjon. Dette er en del av den naturlige forråtnelse, hvor bakteriell aktivitet bryter ned organisk materiale og gass dannes som en følge av dette. Putrefaksjon hos landdyr starter normalt innen en time etter døden, med maksimal aktivitet etter ca. 24 timer (Shedge *mfl.*, 2023). Hastigheten på denne forråtnelsesprosessen er blant annet avhengig av omgivelsestemperatur, miljøforhold og fettinnholdet av kadaveret. For fisk er det grunn til å anta at putrefaksjon vil inntre tidligere og raskere; død hos landlevende likevarme dyr medfører ofte en reduksjon av temperatur, mens for fisk som tas opp av vannet vil det motsatte ofte være tilfelle. Men det understrekes at fisken som ble undersøkt i feltstudien ble obdusert og undersøkt kort tid etter avliving.

Både eksperimentelle modeller og studier av mennesker, har vist til at tilstedeværelse eller fravær av post-mortem gass har liten verdi for å diagnostisere dødsfall knyttet til dykking humant (Varlet *mfl.*, 2015; Cole *mfl.*, 2006; Laurent *mfl.*, 2011, 2014; Wheen og Williams, 2009). For å kunne skille mellom fatal gassboblesyke, iatrogen luftemboli (kunstig tilført gass i blod) og gass dannet ved bakteriell aktivitet post mortem, ved obduksjon, har kjemiske analyser blitt gjennomført. Quirós *mfl.*, (2016) undersøkte imidlertid hvorvidt en kvantifisering av mengde gass post mortem ga mulighet til å skille mellom fatal gassboblesyke, iatrogen luftemboli og gasser dannet ved bakteriell aktivitet, og etablerte i den forbindelse en makroskopisk gass-score for humant bruk. Denne modellen ga god diagnostisk verdi for å skille mellom de tre årsakene til gass post mortem. Studien viste at det hos individene som døde av fatal gassboblesyke ble observert gassbobler i de perifere venene, samt i fettvevet, umiddelbart etter døden, til forskjell fra individene som enten døde grunnet iatrogen luftemboli eller ble avlivet med pentobarbital. Dyrene som døde på grunn av gassboblesyke viste gass-score nær maksimalt nivå av den etablerte skalaen i hele tidsforløpet.

Ved gassboblesyke antas det at boblene vokser fra allerede eksisterende gasskjerner festet til endotellaget i den vaskulære periferien (Harvey, 1945). Boblene fra den vaskulære periferien vil etter hvert løsne fra karveggene og skylles ut i de sentrale venene, hvor de vil samles og øke i størrelse. Det antas at blodets evne til å holde på løst gass er høyere under sirkulasjon enn i en statisk tilstand. Dermed vil noe av gassen frigjøres fra løsningen etter at blodsirkulasjonen har stoppet. Mulige forklaringer for de makroskopiske observasjonene av gass ved obduksjon av fisken kan derfor være en tilstedeværelse av mikroskopiske bobler i sirkulasjonen som ikke ble observert på ultralyd, men som etter døden og bortfall av blodtrykk, smeltet sammen og dannet større makroskopiske gassbobler. Videre kan bobler dannet i perifert vev ha samlet seg i hjertet etter fiskens død. En annen hypotese er det faktum at bobledannelse krever energi og nukleeringskjerner for å dannes. Det er fullt mulig at blodet kan være overmettet uten at det dannes gassbobler. Videre kan det tenkes at blodprøvetaking fra caudale kar kan ha resultert i dannelse av nukleeringskjerner og dermed ha utløst potensiale for gassbobledannelse i blodet. En tredje hypotese for observasjon av makroskopisk gass etter uttak av gjeller kan være at pacemakeraktiviteten i hjertet i etterkant av avliving/eutanasi er tilstrekkelig til for å trekke luft inn i fiskens sirkulasjonssystem, noe som kan medføre at observasjon av gass er et artefakt. En fjerde hypotese kan være at fisken i forbindelse med prøvetaking tas ut av et relativt kaldt vann og legges i romtemperatur etter avliving. En temperaturøkning i fisken, hvor løseligheten av gasser

avtar med økende temperatur, vil også kunne medføre makroskopisk synlig gass ved obduksjon. Disse hypotesene bør undersøkes videre for å oppnå pålitelig diagnostikk av gassboblesyke i felt.

Selv om gassbobler i hjertet ved obduksjon kan forekomme som et artefakt, gjør forskjellene i mengde av bobler og høyest prevalens i brønnbåtoperasjon med størst totalgassmetning, at gassboblesyke ikke kan utelukkes som en forklaring i en del av tilfellene. Særlig gjelder dette ved observasjon av store mengder gassbobler i atriet, noe som kun ble observert i brønnbåtoperasjon 1, hvor det også ble observert høyest totalgassovermetning.

Videre har feltstudien klare forskjeller fra de kontrollerte forsøkene:

- Ved håndteringsoperasjoner i felt vil det være et stort antall fisk i hver brønn. Et uttak av 56-58 fisker representerer derfor et svært begrenset utvalg av det totale antallet fisk.
- Individenes eksponeringstid for det reduserte trykket og totalgassovermetningen er usikker. En har ingen mulighet til å vurdere hvorvidt fiskene som ble undersøkt var blant de første som ble lastet om bord, og dermed eksponert for det reduserte trykket over lengre tid, eller om de var blant de siste fiskene som ble pumpet om bord. Med utgangspunkt i kunnskap om at klinisk gassboblesyke er sterkt avhengig av *graden av totalgassovermetning* og *tid* er dette avgjørende.
- I de kontrollerte forsøkene i NYBRØK-prosjektet søkte fisk eksponert for redusert trykk og totalgassovermetning ned i vannsøylen, og individer med alvorlig klinisk gassboblesyke ble liggende i sideleie på notbunnen. Av rent praktiske hensyn var det i feltstudien kun mulig å prøveta fisk fra den øvre delen av vannsøylen etter lasting.
- For punktet over kan argumentasjonsrekken også snus rundt ved å si at fisk på bunnen av brønnen har lavere risiko for å utvikle gassboblesyke enn fisken som står høyt i vannsøylen, på grunn av et større hydrostatisk trykk.
- I de kontrollerte forsøkene ble henholdsvis eksponering mot undertrykk (simulert lasting) og overtrykk (simulert lossing) kjørt hver for seg, og under simulert lossing ble det ikke tilsatt gass i perioden hvor systemet ble satt på overtrykk. Dette skiller seg fra praktiske brønnbåtoperasjoner, hvor fisk utsettes for undertrykk (lasting) og overtrykk (lossing med samtidig oksygenering av vann) i sekvens. I lys av dette vil de kontrollerte trykkforsøkene og feltobservasjoner ikke være direkte sammenlignbare.

Ser man til humanmedisinske protokoller for diagnostisering av trykkfallsyke, innebærer disse ultralyd av pasienten innen 15 minutter etter eksponeringen, deretter hvert 20. minutt i minimum 120 minutter (Møllerløkken *mfl.*, 2016). Til sammenligning kan protokollen som ble benyttet i forbindelse med feltstudien kun vurderes som øyeblikksbilder. Et annet aspekt ved oppfølgingen humant er at denne innebærer undersøkelse både etter hvile og like etter aktivitet, da det er vist at aktivitet kan fremprovosere et betydelig større antall bobler (Møllerløkken *mfl.*, 2016). Dette samsvarer med observasjoner i de kontrollerte forsøkene der plutselige gjellelokkbevegelser medførte et påfølgende større antall detekterbare bobler på ultralyd.

Diagnostikk av bobler i felt var altså mer utfordrende enn i de kontrollerte forsøkene. Mulige årsaker til feil resultater av diagnostiske tester kan oppsummeres slik:

- Scenarioer som kan gi falsk negativ vurdering:

  - Fiskens blod kan være overmettet uten at det dannes gassbobler: bobledannelsen er en energikrevende prosess som blant annet krever en boblekjerne, og denne prosessen kan ta tid.
  - Det kan ha blitt dannet bobler i fisken, men at disse ikke løsner under ultralyd-undersøkelsen: innenfor human dykkermedisin gjennomføres ultralydundersøkelser over gjentatte tidsintervall og ofte med provokasjonstester.
- Scenario som kan gi falsk positiv vurdering:
  - Det kan tenkes at vedvarende hjerteaktivitet hos fisk hvor gjellebue er avkuttet vil kunne føre til innsug av luft. Hvis dette er tilfelle, er det ved makroskopisk vurdering av gassbobler i systemisk sirkulasjon ved obduksjon viktig å dissekere inn til hjerte og store karstammer uten å kutte over store blodførende strukturer slik som gjeller.
  - Temperaturøkning etter avliving av fisken kan føre til totalgassovermetning i blodet og påfølgende bobledannelse.
  - Bakteriell nedbryting etter avliving av fisken.

Som omtalt er det utviklet protokoller i humanmedisin for kvantifisering av gass post mortem, som kan benyttes for å skille fatal gassboblesyke, iatrogen luftemboli (kunstig tilført gass i blod) og gass dannet ved bakteriell aktivitet post mortem. En slik gass-score kan tenkes etablert også for fisk, som et diagnostisk hjelpemiddel. Ved etablering av en scoringsmodell og protokoll for makroskopisk observasjon av gassbobler ved obduksjon, antas det å være avgjørende å unngå innsug av luft for eksempel ved å kutte over gjellebuer. Systematisk uttesting av en slik score er nødvendig før implementering i rutinemessig fiskehelsearbeid.

5 Konklusjoner

Denne feltstudien viser kompleksiteten i det å forstå effekt av vannkvalitet, akkumulerte stoffer og trykkforhold på laksevelferd ved brønnbåtoperasjoner. Flere forhold under brønnbåtoperasjonene kan variere og påvirker resultatene. For å få best mulig oversikt over effekt av endringer i vannkvalitetsparametere, akkumulering av stoffer og trykkforhold, er det en forutsetning at metodikk og diagnostikk som benyttes er gjennomførbare i felt og gir pålitelige resultater.

For korrekt utregning av totalgassmetning i vannet i brønn må trykket i luftlommen i brønnene benyttes. Denne studien bekreftet at manuelle målinger av totalgassmetning per i dag ikke tar høyde for modifisert trykk i brønnen ved lasting og lossing. Korrekt beregning av totalgassmetning vil være essensielt for å kunne vurdere risiko for gassboblesyke hos fisken. Funnene i denne studien tydet på at en betydelig reduksjon av trykk kan føre til økt risiko for gassboblesyke hos fisk i brønnbåt, men resultatene var mindre konklusive enn fra de kontrollerte trykk-forsøkene. Det er imidlertid ukjent hva som er øvre grense for en trykkreduksjon som medfører utfordringer hos fisken. Etablering av grenseverdier for problematisk trykkreduksjon som en funksjon av tid, vil være nødvendig for reduksjon av biologisk risiko ved bruk av brønnbåt.

For de fleste vannkvalitetsparametre mangler anbefalinger ved forhold som er relevante for brønnbåtoperasjoner. De fleste målte vannkvalitetsparametere i feltstudien var tilsynelatende ikke problematiske for fisken. Sinkverdiene var derimot høye ved en av de tre undersøkte brønnbåtoperasjonene (brønnbåtoperasjon 1), men påvirket tilsynelatende ikke fisken negativt i behandlingsperioden. Fraværet av vevsskade på fiskens gjeller knyttes til egenskapene til RO-vannet som ble benyttet.

Ultralydundersøkelse av hjertet like etter sedasjon viste ingen gassbobler til forskjell fra de kontrollerte forsøkene. Imidlertid ble det gjort ultralydfunn og/eller makroskopiske funn av gass i hjertet eller hjertenære strukturer ved obduksjon, *senere* i prøveuttakskjeden, og en kombinasjon av både artefakt og reelle forandringer ligger mest sannsynlig til grunn. Flere mulige feilkilder, som kan lede til enten falsk negativ eller falsk positive diagnostiske tester er identifisert. Dette underbygger at felt-diagnostikk av gassboblesyke krever videre utvikling. Dette inkluderer etablering av en standardisert semi-kvantitativ score av makroskopisk forekomst av gass post mortem, gitt at ingen større karstrukturer er kuttet. Basert på funnene fra de kontrollerte forsøkene og kunnskap fra humanmedisin, er ultralyd et egnet diagnostisk verktøy, men protokollen for undersøkelse må videreutvikles. Ultralyd som ikke-letal metode åpner for at et betydelig større antall individer kan undersøkes, noe som vil bidra til å øke sikkerheten på undersøkelsene.

Takk til

En stor takk rettes til brønnbåtmannskapene på brønnbåtene og driftspersonell på lokalitetene som tok vel imot oss og på en utmerket måte la til rette for feltstudien.

6 Referanser

Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2015). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. Trends in parasitology, 31(2), 72-81.

Alsop, D. H., McGeer, J. C., McDonald, D. G., & Wood, C. M. (1999). Costs of chronic waterborne zinc exposure and the consequences of zinc acclimation on the gill/zinc interactions of rainbow trout in hard and soft water. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 18(5), 1014- 1025

Brønnbåtveilederen [WWW Document], n.d. URL. https://bronnbatveilederen.no/behandling/ ferskvannsbehandling

Cole, A. J., Griffiths, D., Lavender, S., Summers, P., & Rich, K. (2006). Relevance of postmortem radiology to the diagnosis of fatal cerebral gas embolism from compressed air diving. Journal of clinical pathology, 59(5), 489-491.

Ellis, T., James, J. D., Sundh, H., Fridell, F., Sundell, K., & Scott, A. P. (2007). Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon. Aquaculture, 272(1-4), 698-706.

Espmark, Å. M. O., Midling, K. Ø., Nilsson, J., & Humborstad, O. B. (2016). Effects of pumping height and repeated pumping in atlantic salmon *Salmo salar*.

Fiskeridirektoratet (2023). Nøkkeltall fra norsk havbruksnæring 2022.

Fivelstad, S., Schwarz, J., Strømsnes, H., & Olsen, A. B. (1995). Sublethal effects and safe levels of ammonia in seawater for Atlantic salmon postsmolts (Salmo salar L.). Aquacultural Engineering, 14(3), 271-280.

Farrell, A. (2011). Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Academic press.

Gallaugher, P., Farrell, A. P. (1998). Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. In Fish physiology (Vol. 17, pp. 185-227). Academic Press.

Hess-Erga, O-K., Calabrese, S., Vogt, R. D., Steigum, E., Svendesen, F. S., Furseth, K., Storsul, T., Dalum, A. S., Stensby-Skjærvik, S., Rønnestad, I., Segadal, K., Løseth, K., Sanstad, A. R., Andersen, L., Eide. L. H. & Handegård, R. (2024) Ny brønnbåtkunnskap - biologisk risikofaktorer ved bruk av brønnbåt til transport og behandling av laks (AP3). FHF – 901788.

Hogstrand, C., Verbost, P.M., Bonga, S.& Wood, C.M. (1996). Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 270(5), R1141-R1147.

Höglund, E., Fernandes, P., Rojas-Tirado, P., Rundberget, J. T., & Hess-Erga, O. K. (2022). Assessing stress resilience after smolt transportation by waterborne cortisol and feeding behavior in a commercial Atlantic Salmon (*Salmo salar*) grow-out recirculating aquaculture system. Frontiers in physiology, 12, 771951.

Kassambara, A. (2020). tstatix: Statistical Analysis of Data. R package version 1.0.0. Retrieved from https://CRAN.R-project.org/package=tstatix

Kristensen T, Åtland Å, Rosten T, Urke HA & Rosseland BO (2009). Important influent-water quality parameters at freshwater production sites in two salmon producing countries. Aquacultural Engineering 41: 53–59

Laurent, P. E., Coulange, M., Bartoli, C., Boussuges, A., Rostain, J. C., Luciano, M., ... & Gorincour, G. (2013). Appearance of gas collections after scuba diving death: a computed tomography study in a porcine model. International journal of legal medicine, 127, 177-184.

Laurent, P. E., Coulange, M., Mancini, J., Bartoli, C., Desfeux, J., Piercecchi-Marti, M. D., & Gorincour, G. (2014). Postmortem CT appearance of gas collections in fatal diving accidents. American Journal of Roentgenology, 203(3), 468-475.

McWhinney, B. C., Briscoe, S. E., Ungerer, J. P., & Pretorius, C. J. (2010). Measurement of cortisol, cortisone, prednisolone, dexamethasone and 11-deoxycortisol with ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application for plasma, plasma ultrafiltrate, urine and saliva in a routine laboratory. Journal of Chromatography B, 878(28), 2863-2869.

Møllerløkken, A., Blogg, S. L., Doolette, D. J., Nishi, R. Y., & Pollock, N. W. (2016). Consensus Development Conference: Consensus guidelines for the use of ultrasound for diving research. Diving & Hyperbaric Medicine: Journal of the South Pacific Underwater Medicine Society, 46(1).

Myhre Jensen, E., Horsberg, T. E., Sevatdal, S., & Helgesen, K. O. (2020). Trends in de-lousing of Norwegian farmed salmon from 2000–2019—Consumption of medicines, salmon louse resistance and non-medicinal control methods. Plos one, 15(10), e0240894.

Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H., & Turnbull, J. F. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare.

Pleizier, N. K., Nelson, C., Cooke, S. J., & Brauner, C. J. (2020). Understanding gas bubble trauma in an era of hydropower expansion: how do fish compensate at depth?. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 77(3), 556-563.

de Quirós, Y. B., Saavedra, P., Møllerløkken, A., Brubakk, A. O., Jørgensen, A., González-Díaz, O., ... & Fernández, A. (2016). Differentiation at necropsy between in vivo gas embolism and putrefaction using a gas score. Research in Veterinary Science, 106, 48-55.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from https://www.R-project.org

Rosseland, B. O. (1989) Kalking av rennende vann. Vurdering av toleransegrenser for laks og sjøørret ved driftsstans av doseringsanlegg

Rosseland, B. O. (1989) Kalking av rennende vann. Vurdering av toleransegrenser for laks og sjøørret ved driftsstans av doseringsanlegg. url: niva.brage.unit.no

Shedge, R., Krishan, K., Warrier, V., & Kanchan, T. (2019). Postmortem changes.

Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Moldal, T., Oliveira, V., Svendsen, J., Haukaas, A. & Brun, E. (2024). Fish health report 2023. Technical Report 8a/2024, Norwegian Veterinary Institute.

Varlet, V., Smith, F., Giuliani, N., Egger, C., Rinaldi, A., Dominguez, A., Chevallier, C., Bruguier, C., Augsburger, M., Mangin, P. & Grabherr, S. (2015). When gas analysis assists with postmortem imaging to diagnose causes of death. Forensic science international, 251, 1-10.

Wahl-Ovesen, H. (2024) Evaluering av gassbobler i finner og angiotensinkonverterende enzym (ACE) for deteksjon av gassboblesyke under simulerte laste- og losseoperasjoner av atlantisk laks (*Salmo Salar* L.). Masteroppgave i fiskehelse - akvamedisin, Institutt for biovitenskap Universitetet i Bergen.

Sviland Walde, C., Bang Jensen, B., Pettersen, J. M., & Stormoen, M. (2021). Estimating cage-level mortality distributions following different delousing treatments of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. Journal of fish diseases, 44(7), 899-912.

Wedemeyer, G. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Springer Science & Business Media.

Weitkamp, D. E., & Katz, M. (1980). A review of dissolved gas supersaturation literature. Transactions of the American Fisheries Society, 109(6), 659-702.

Wheen, C. L. & Williams, M. P. (2009) Post-mortem in recreational scuba diver deaths: The utility of radiology. Journal of Forensic and Legal Medicine 16, 273–276.

Appendiks

Tabell A. 1: Vannkjemiske parametere målt i vannprøver fra brønn 3 og 4 under last 1, 20/12/2023 (brønnbåtoperasjon 1).

Feltundersøkelse nr.1 Ferskvannsbehandling Last 1		Merd 5 Sjøvann 20.12.2023	RO anlegg RO-vann 20.12.2023	Buffertank Brønn 4 kl. 14:13 RO-vann 20.12.2023	Buffertank Brønn 3 kl. 14:13 RO-vann 21.12.2023	Brønn 4 Før fisk kl. 11:15 RO-vann 20.12.2023	Brønn 3 Før fisk kl. 11:15 RO-vann 20.12.2023	Brønn 4 Halvveis kl. 17:19 RO-vann 20.12.2023	Brønn 3 Halvveis kl. 17:21 RO-vann 20.12.2023	Brønn 4 Ved lossing kl. 21:22 RO-vann 20.12.2023	Brønn 3 Ved lossing kl. 21:19 RO-vann 20.12.2023
Temperatur (in situ)	°C	5,2				5,7	6,0	6,5	6,9	7,0	7,3
pH (in situ)	pH	8,15				8,26	8,29	7,80	7,73	7,82	7,73
pH	pH	7,95	6,4	7,3	7,3	7,45	7,5	7,35	7,3	7,4	7,3
Ledningsevne	mS/m		27,7	173	171	151,5	152	172	170	174	192
Alkalitet	mmol/l	2,14	0,02	1,75	1,73	1,735	1,73	1,75	1,75	1,705	1,63
Alkalitet ($CaCO_3$)*	mg/l		1,0	87,5	86,5	86,75	86,5	87,5	87,5	85,25	81,5
Teoretisk CO_2 (basert på insitu-pH og alk.) Hongve*	mg/l	1,5				1,0	0,9	2,8	3,3	2,6	3,0
Turbiditet (TURB860)	FNU	0,215	0,2	2	2,1	1,9	2	2	2	2	1,8
Salinitet (beregnet på klorid)*	ppt		0,1	0,8	0,8	0,7	0,6	0,8	0,9	0,8	1,1
Ammonium (NH4-N)	µg N/l	94	33	2700	2800	2900	2800	3100	3100	2700	2900
Beregn. Ammoniakk (NH_3-N)* ved in situ temperatur og pH	µg N/l	1,2				50,3	53,2	20,1	17,6	19,0	17,0
Totalt organisk karbon (TOC)	mg C/l	0,65	<0,30	5,7	8,8	8,3	9,9	6,5	8,6	9,1	7,2
Klorid (Cl)	mg/l	7800	81,2	414	421	355,5	352	436	468	458	572
Sulfat (SO_4)	mg/l	979,5	0,4	44,3	45	42,65	43	46,95	50,3	49,8	51,2
Aluminium (Al) - total	µg/l	< 4	< 1,0	5,7	2,2	2,25	2	1,9	2,1	2	1,9
Al - kolloidalt *	µg/l		0	0	0	0	0	0	0	0	<1,9
Al - reaktivt	µg/l		9,0	10	9,4	8,4	12	8,35	9,5	8,5	<5,0
Al - ikke labilt	µg/l		<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Al - labilt *	µg/l		<9,0	<10	<9,4	<9,7	<12	<8,6	<9,5	<12	<5,0
Kalsium (Ca)	mg/l		0,12	10	9,7	8,25	8,2	9,85	9,9	9,95	12
Kobber (Cu)	µg/l	< 5	0,12	1,7	2	0,715	0,63	0,63	0,66	0,625	0,58
Jern (Fe)	µg/l	< 50	< 0,30	18	32	10,3	9,2	11	12	9,9	9,9
Sink (Zn)	µg/l	< 2	0,93	550	560	540	540	590	600	605	610
Bly (Pb)	µg/l	< 0,2	0,07	0,11	0,1	0,0775	0,078	0,0835	0,11	0,0815	0,073
Magnesium (Mg)	mg/l		0,31	26	25	21,5	22	25,5	25	27	31
Mangan (Mn)	µg/l	< 5	< 0,05	1,5	1,8	0,41	0,44	0,43	0,5	0,435	0,41
Silisium (Si)	mg/l		< 0,10	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3
SiO2*	mg/l		0,11	3,0	3,0	3,0	3,2	3,0	3,0	2,8	2,8
Hardhet (Ca+Mg)*	mg/l		1,56	132,0	127,2	109,1	111,1	129,6	127,7	136,0	157,6
Kalsium hardhet ($CaCO_3$)*	mg/l		0,29	25,0	24,2	20,6	20,5	24,6	24,7	24,8	30,0

*beregnede verdier, ikke målt

Tabell A. 2: Vannkjemiske parametere målt i vannprøver fra brønn 1 og 2 under last 2, 20-21/12/2023 (brønnbåtoperasjon 1).

Feltundersøkelse nr.1 Ferskvannsbehandling Last 2		Merd 7 Sjøvann 20.12.2023	Brønn 1 FØR fisk kl.16:30 RO-vann 20.12.2023	Brønn 2 FØR fisk kl.16:30 RO-vann 20.12.2023	Brønn 1 Halvveis kl. 22:51 RO-vann 20.12.2023	Brønn 2 Halvveis kl. 22:57 RO-vann 20.12.2023	Brønn 1 Ved lossing kl.02:30 RO-vann 21.12.2023	Brønn 2 Ved lossing kl.02:29 RO-vann 21.12.2023
Temperatur (in situ)	°C		6,7	7,2	6,2	6,8	5,8	6,3
pH (in situ)	pH		8,32	8,25	7,57	7,52	7,62	7,61
pH	pH	7,9	7,5	7,5	7,2	7,3	7,35	7,3
Ledningsevne	mS/m	>1000	172	167	222	218	216	223
Alkalitet	mmol/l	2,13	1,82	1,79	1,835	1,81	1,78	1,8
Alkalitet ($CaCO_3$)*	mg/l	106,5	91	89,5	91,75	90,5	89	90
CO2 (VINDTA)	mg/l		2,2				4,2	
Teoretisk CO_2 (basert på insitu-pH og alk.) Hongve*	mg/l		0,9	1,0	4,9	5,5	4,3	4,4
Turbiditet (TURB860)	FNU	0,2	1,95	1,9	2	2,6	2,1	2,2
Salinitet (beregnet på klorid)*	ppt	30,6	0,8	0,8	1,1	1,0	1,0	1,1
Ammonium (NH4-N)	µg N/l		2600	2400	3100	3100	2850	3300
Beregn. Ammoniakk (NH_3-N)* ved in situ temperatur og pH	µg N/l		55,8	45,7	11,6	10,8	11,5	13,6
Totalt organisk karbon (TOC)	mg C/l	0,7	7,0	7,5	4,0	4,1	6,4	6,7
Klorid (Cl)	mg/l	16600	412	451	588	547	526,5	592
Sulfat (SO_4)	mg/l	6010	44,2	48,7	67,2	62,1	59,9	68,4
Aluminium (Al) - total	µg/l	< 10	2	2,3	3,05	2,2	2	2,1
Al - kolloidalt *	µg/l		0	0	0	0	0	0
Al - reaktivt	µg/l		11	<5,0	10,45	14	8,7	10
Al - ikke labilt	µg/l		<5,0	<5,0	<5	<5,0	<5	<5,0
Al - labilt *	µg/l		<10	<5	<11	<14	<9	<10
Kalsium (Ca)	mg/l	460	9,85	9,5	14	13	13,5	14
Kobber (Cu)	µg/l	0,59	0,53	0,61	0,665	0,68	1,3	0,68
Jern (Fe)	µg/l	12	8,65	19	16	15	10,5	12
Sink (Zn)	µg/l	9,3	600	590	670	660	685	690
Bly (Pb)	µg/l	< 0,10	0,12	0,14	0,15	0,14	0,275	0,14
Magnesium (Mg)	mg/l	1200	25,5	25	35,5	35	35	35
Mangan (Mn)	µg/l	1,1	0,36	0,44	0,775	0,54	0,48	0,46
Silisium (Si)	mg/l	< 1,0	1,45	1,4	1,45	1,4	1,4	1,4
SiO2*	mg/l	<1	3,1	3,0	3,1	3,0	3,0	3,0
Hardhet (Ca+Mg)*	mg/l	6090,2	129,6	126,7	181,1	176,6	177,8	179,1
Kalsium hardhet ($CaCO_3$)*	mg/l	1148,7	24,6	23,7	35,0	32,5	33,7	35,0
*beregnede verdier, ikke målt								

Tabell A. 3: Konsentrasjoner av gjellermetaller målt i µg/g tørr gjelle før og etter ferskvannsbehandlinger (brønnbåtoperasjon 1).

ID		Dato		Aluminium (µg/g tørr gjelle)	Jern (µg/g tørr gjelle)	Kobber (µg/g tørr gjelle)	Sink (µg/g tørr gjelle)
Last 1	Fra trenging/før Behandling (n=4)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,65**	**305,5**	**2,08**	**1045**
			SD	0,24	116,38	0,36	153,43
			Max	0,91	458	2,62	1152
			Min	0,44	201	1,84	823
	Fra lossing/etter behandling (n=12)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,75**	**206,67**	**1,7**	**1089**
			SD	0,38	87,25	0,17	247,97
			Max	1,63	411	2,12	1485
			Min	0,27	130	1,41	687
Last 2	Fra trenging/før Behandling (n=4)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,59**	**202**	**1,68**	**762,25**
			SD	0,16	67,06	0,09	71,57
			Max	0,77	301	1,77	862
			Min	0,49	155	1,58	694
	Fra lossing/etter behandling (n=12)	21.12.2023	**Gjennomsnitt**	**1,74**	**147,58**	**1,72**	**969**
			SD	2,69	29,81	0,12	305,84
			Max	9,37	226	1,9	1777
			Min	0,54	105	1,53	743

Tabell A. 4: : Fysiokjemisk vannkvalitet under behandling 1, 6 timer ferskvannsavlusning + termisk avlusing 10. til 11. januar 2024 (brønnbåtoperasjon 2), totalt sirkulasjonsvolum 3 744 m^3 (brønner + CO_2 utlufting + sirkulasjon).

Feltundersøkelse nr.2 Ferskvannsbehandling med utlossing via termisk avlusingsenhet Last 1		Merd Sjøvann 10.01.2024	Råvann Ferskvann 10.01.2024	STB Før ferskvanns behandling Ferskvann 10.01.2024	STB Før lossing Ferskvann 10.01.2024	Termisk avlusingsenhet Før fisk Sjøvann 10.01.2024	Termisk avlusingsenhet Halvveis Sjøvann 10.01.2024	Termisk avlusingsenhet Slutt Sjøvann 10.01.2024
Temperatur (in situ)	°C			8,0	8,2	23,5	23,5	23,1
pH (in situ)	pH			7,7	6,7	7,7	7,3	7,2
pH	pH	7,8	6,7	7,6	6,9	7,4	6,8	6,7
Ledningsevne	mS/m		25,1	62,0	56,6			
Alkalitet	mmol/l	2,19	0,114	0,7	0,8	2,2	2,1	2,1
Alkalitet ($CaCO_3$)*	mg/l	109,5	5,7	34,6	40,1	111,5	107,0	107,3
Teoretisk CO_2 (basert på insitu-pH og alk.) Hongve*	mg/l	3,5	2,3	1,6	14,6	4,1	10,2	13,2
Turbiditet (TURB860)	FNU	0,19	0,75	0,3	1,0	2,2	27,0	25,5
Salinitet (beregnet på klorid)*	ppt	29,5	0,1	0,3	0,2	25,8	20,3	18,7
Total Nitrogen (Inline)	µg/l		540,0					
Nitrat (NO3-N)	µg/l		160					
Ammonium (NH4-N)	µg N/l	64	240	36,5	1700,0	1474,0	11099,0	10379,0
Beregn. Ammoniakk (NH_3-N)* ved in situ temperatur og pH	µg N/l			0,2	1,1	24,1	73,0	52,5
Totalt organisk karbon (TOC)	mg C/l	0,9	4,4	3,6	7,2	8,0	60,4	54,3
Klorid (Cl)	mg/l	16000	62,9	154,0	135,0	14000,0	11000,0	10150,0
Sulfat (SO_4)	mg/l	1960	9,97	22,1	19,6	2080,0	1465,0	1505,0
Aluminium (Al) - total	µg/l	< 4	99	96,0	94,5	13,5	30,0	30,5
Al - kolloidalt *	µg/l		72	64,5	74,0			
Al - reaktivt	µg/l		27	31,5	20,5			
Al - ikke labilt	µg/l		23	20,0	16,5			
Al - labilt *	µg/l		4,0	11,5	4,0			
Kalsium (Ca)	mg/l	440,0	2,9	5,4	4,7	430,0	310,0	330,0
Kobber (Cu)	µg/l	< 0,5	0,84	0,3	0,4	2,8	1,1	1,1
Jern (Fe)	µg/l	<50	75	61,5	76,0		50,0	50,0
Sink (Zn)	µg/l	< 2	7,5	9,6	17,5	53,5	48,0	47,0
Natrium (Na)	mg/l		37	99,0	88,5			
Magnesium (Mg)	mg/l		4,3	9,3	8,6			
Kalium (K)	mg/l		1,4					
Mangan (Mn)	µg/l	<5,0	4	2,2	2,2			
Silisium (Si)	mg/l		0,62	1,3	1,3			
SiO2*	mg/l		1	2,7	2,7			
Hardhet (Ca+Mg)*	mg/l		24,9	51,5	47,2			
Kalsium hardhet ($CaCO_3$)*	mg/l	1098,8	7,2	13,4	11,7	1073,8	774,1	824,1
*beregnede verdier, ikke målt								

Tabell A. 5: Fysiokjemisk vannkvalitet under behandling 2, 6 timer ferskvannsavlusning + termisk avlusing 10. til 11. januar 2024 (brønnbåtoperasjon 2), totalt sirkulasjonsvolum 3 744 m^3 (brønner + CO_2 utlufting + sirkulasjon).

Feltundersøkelse nr.2 Ferskvannsbehandling med utlossing via termisk avlusingsenhet Last 2		STB Før Ferskvanns behandling Ferskvann 11.01.2024	STB Før lossing Ferskvann 11.01.2024	Termisk avlusingsenhet Før fisk Sjøvann 11.01.2024	Termisk avlusingsenhet Halvveis Sjøvann 11.01.2024	Termisk avlusingsenhet Slutt Sjøvann 11.01.2024
Temperatur (in situ)	°C	8,7	8,0	25,1	24,8	23,8
pH (in situ)	pH	7,2	6,8	7,8	7,4	7,1
pH	pH	7,0	6,9	7,3	6,8	6,8
Ledningsevne	mS/m	64,9	102,5			
Alkalitet	mmol/l	0,8	0,9	2,2	2,2	2,2
Alkalitet ($CaCO_3$)*	mg/l	41,3	47,4	110,8	110,8	111,5
CO_2 (VINDTA)*	mg/l					6,0
Teoretisk CO_2 (basert på insitu-pH og alk.) Hongve*	mg/l	4,9	14,7	3,8	8,4	16,9
Turbiditet (TURB860)	FNU	3,9	2,1	1,8	19,5	26,0
Salinitet (beregnet på klorid)*	ppt	0,3	0,5	23,0	18,8	19,0
Ammonium (NH4-N)	µg N/l	2050,0	3850,0	1786,5	8140,5	11845,0
Beregn. Ammoniakk (NH_3-N)* ved in situ temperatur og pH	µg N/l	4,3	3,6	35,0	74,8	60,0
Totalt organisk karbon (TOC)	mg C/l	7,7	11,0	8,0	57,6	76,6
Klorid (Cl)	mg/l	150,5	272,0	12500	10200	10300
Sulfat (SO_4)	mg/l	19,4	35,3	1520	1225	1290
Aluminium (Al) - total	µg/l	93,5	91,0	6,8	24,5	30,5
Al - kolloidalt *	µg/l	79,5	78,5			
Al - reaktivt	µg/l	14,0	12,5			
Al - ikke labilt	µg/l	14,0	12,5			
Al - labilt *	µg/l	0,5	0,0			
Kalsium (Ca)	mg/l	5,1	7,7	435,0	350,0	315,0
Kobber (Cu)	µg/l	0,5	0,6	1,3	1,6	1,3
Jern (Fe)	µg/l	94,5	115,0	<50	<50	60,0
Sink (Zn)	µg/l	25,0	51,0	39,5	53,5	53,0
Natrium (Na)	mg/l	100,0	160,0			
Magnesium (Mg)	mg/l	10,0	17,5			
Mangan (Mn)	µg/l	2,3	2,7			
Silisium (Si)	mg/l	1,2	1,2			
SiO2*	mg/l	2,6	2,6			
Hardhet (Ca+Mg)*	mg/l	53,9	91,2			
Kalsium hardhet ($CaCO_3$)*	mg/l	12,7	19,1	1086,3	874,0	786,6
*beregnede verdier, ikke målt						

Tabell A. 6: Konsentrasjoner av gjellermetaller målt i µg/g tørr gjelle før og etter ferskvannsbehandlinger kombinert med termisk behandling (brønnbåtoperasjon 2).

ID		Dato		Aluminium (µg/g tørr gjelle)	Jern (µg/g tørr gjelle)	Kobber (µg/g tørr gjelle)	Sink (µg/g tørr gjelle)
Last 1	Fra trenging/før Behandling (n=4)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,65**	**305,5**	**2,08**	**1045**
			SD	0,24	116,38	0,36	153,43
			Max	0,91	458	2,62	1152
			Min	0,44	201	1,84	823
	Fra lossing/etter behandling (n=12)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,75**	**206,67**	**1,7**	**1089**
			SD	0,38	87,25	0,17	247,97
			Max	1,63	411	2,12	1485
			Min	0,27	130	1,41	687
Last 2	Fra trenging/før Behandling (n=4)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,59**	**202**	**1,68**	**762,25**
			SD	0,16	67,06	0,09	71,57
			Max	0,77	301	1,77	862
			Min	0,49	155	1,58	694
	Fra lossing/etter behandling (n=12)	21.12.2023	**Gjennomsnitt**	**1,74**	**147,58**	**1,72**	**969**
			SD	2,69	29,81	0,12	305,84
			Max	9,37	226	1,9	1777
			Min	0,54	105	1,53	743

Tabell A. 7: Fysiokjemisk vannkvalitet under slaktetransport last 1 den 7. februar 2024 (brønnbåtoperasjon 3), totalt sirkulasjonsvolum 2800 m^3.

Feltundersøkelse nr.3 Slaktetransport Last 1		Merd Sjøvann 07.02.2024	BB Før fisk kl. 11:35 Sjøvann 07.02.2024	BB Halvveis (slutt lukket) kl. 17:05 Sjøvann 07.02.2024	BB Før lossing kl. 19:15 Sjøvann 07.02.2024
Temperatur (in situ)	°C	4,4	4,5	5,2	5,3
pH (in situ)	pH	7,95	7,8	6,9	7,3
pH	pH	7,9	7,7	7,0	7,5
Ledningsevne	mS/m				
Alkalitet	mmol/l	1,99	1,9	2,1	2,2
Alkalitet ($CaCO_3$)*	mg/l	99,5	94,8	102,8	108,0
CO_2 (VINDTA)	mg/l			8,0	
Teoretisk CO_2 (basert på insitu-pH og alk.) Hongve*	mg/l	2,2	2,8	24,1	10,6
Turbiditet (TURB860)	FNU	0,14	0,2	1,7	0,6
Farge (410 nm)	mg Pt/l	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Salinitet (beregnet på klorid)*	ppt	35,0	32,2	31,3	35,0
Ammonium (NH4-N)	µg N/l	14	12,5	1045,0	295,0
Beregn. Ammoniakk (NH_3-N)* ved in situ temperatur og pH	µg N/l	0,1	0,1	0,8	0,6
Totalt organisk karbon (TOC)	mg C/l	1,1	3,3	4,7	1,8
Klorid (Cl)	mg/l	19000	17500,0	17000,0	19000,0
Sulfat (SO_4)	mg/l	2260	2120,0	2050,0	2260,0
Aluminium (Al) - total	µg/l	9,6	5,5	4,3	<4
Kalsium (Ca)	mg/l				
Kobber (Cu)	µg/l	< 0,5	0,8	0,8	0,6
Jern (Fe)	µg/l	< 50	<50	<50	<50
Sink (Zn)	µg/l	3,3	2,9	16,5	9,3
Sink (Zn), filtrert	µg/l	2		18,0	9,0
Bly (Pb)	µg/l				
Magnesium (Mg)	mg/l				
Mangan (Mn)	µg/l	< 5	<5	<5	<5
Silisium (Si)	mg/l				
SiO2*	mg/l				
Hardhet (Ca+Mg)*	mg/l				
Kalsium hardhet ($CaCO_3$)*	mg/l				
*beregnede verdier, ikke målt					

Tabell A. 8: Fysiokjemisk vannkvalitet under slaktetransport last 2 den 7. og 8. februar 2024 (brønnbåtoperasjon 3), totalt sirkulasjonsvolum 2800 m^3.

2024 NIVA Norsk institutt for vannforskning Feltundersøkelse nr.3 Slaktetransport Last 2		**Merd** Sjøvann 08.02.2024	**BB Før fisk kl. 02:40** Sjøvann 08.02.2024	**BB Halvveis** Sjøvann 08.02.2024	**BB Slutt lukket kl. 07:35** Sjøvann 08.02.2024
Temperatur (in situ)	°C	4,9	5,2	5,9	5,6
pH (in situ)	pH	7,97	8,0	7,1	7,0
pH	pH	7,8	7,9	7,3	7,3
Ledningsevne	mS/m				
Alkalitet	mmol/l	2,02	2,0	2,0	2,0
Alkalitet ($CaCO_3$)*	mg/l	101	98,3	101,5	101,5
CO_2 (VINDTA)	mg/l				6,9
Teoretisk CO_2 (basert på insitu-pH og alk.) Hongve*	mg/l	2,2	1,9	18,1	21,8
Turbiditet (TURB860)	FNU	0,18	0,1	0,6	0,8
Farge (410 nm)	mg Pt/l	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Salinitet (beregnet på klorid)*	ppt	33,2	35,0	31,3	32,2
Ammonium (NH4-N)	µg N/l	21	4,8	590,0	880,0
Beregn. Ammoniakk (NH_3-N)* ved in situ temp.	µg N/l	0,1	0,0	0,8	1,1
Totalt organisk karbon (TOC)	mg C/l	1,2	1,3	2,4	3,7
Klorid (Cl)	mg/l	18000	19000,0	17000,0	17500,0
Sulfat (SO_4)	mg/l	2140	2245,0	2065,0	2085,0
Aluminium (Al) - total	µg/l	6,1	6,0	4,6	4,3
Kalsium (Ca)	mg/l				
Kobber (Cu)	µg/l	0,5	<0,5	1,8	1,0
Jern (Fe)	µg/l	< 50	<50	<50	<50
Sink (Zn)	µg/l	4,2	2,9	14,0	19,0
Sink (Zn), filtrert	µg/l	4	3,0	13,0	24,0
Bly (Pb)	µg/l				
Magnesium (Mg)	mg/l				
Mangan (Mn)	µg/l	< 5	<5	<5	<5
Silisium (Si)	mg/l				
SiO2*	mg/l				
Hardhet (Ca+Mg)*	mg/l				
Kalsium hardhet ($CaCO_3$)*	mg/l				

Tabell A. 9: Konsentrasjoner av gjellemetall målt i µg/g tørr gjelle før og etter last 2 av slaktetransporten (brønnbåtoperasjon 3).

ID		Dato		Aluminium (µg/g tørr gjelle)	Jern (µg/g tørr gjelle)	Kobber (µg/g tørr gjelle)	Sink (µg/g tørr gjelle)
Last 1	Fra trenging/før Behandling (n=4)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,65**	**305,5**	**2,08**	**1045**
			SD	0,24	116,38	0,36	153,43
			Max	0,91	458	2,62	1152
			Min	0,44	201	1,84	823
	Fra lossing/etter behandling (n=12)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,75**	**206,67**	**1,7**	**1089**
			SD	0,38	87,25	0,17	247,97
			Max	1,63	411	2,12	1485
			Min	0,27	130	1,41	687
Last 2	Fra trenging/før Behandling (n=4)	20.12.2023	**Gjennomsnitt**	**0,59**	**202**	**1,68**	**762,25**
			SD	0,16	67,06	0,09	71,57
			Max	0,77	301	1,77	862
			Min	0,49	155	1,58	694
	Fra lossing/etter behandling (n=12)	21.12.2023	**Gjennomsnitt**	**1,74**	**147,58**	**1,72**	**969**
			SD	2,69	29,81	0,12	305,84
			Max	9,37	226	1,9	1777
			Min	0,54	105	1,53	743