

FAGLIG SLUTTRAPPORT

TITTEL Test av ulike kombinasjoner av forebyggende tiltak til beskyttelse mot lakselus

FORFATTERE Henrik Trengereid, Samantha Bui, Kat Gentry, Karin Pittman

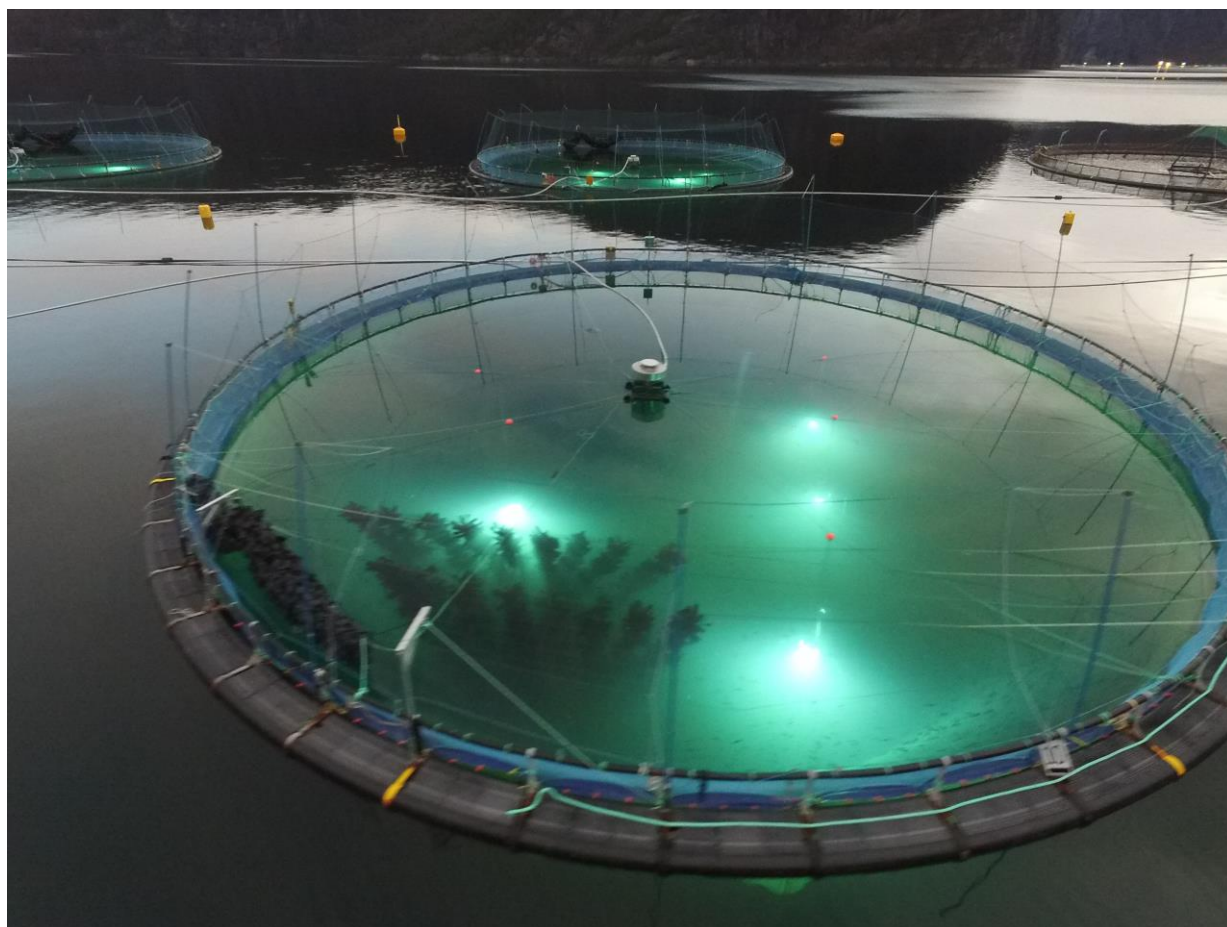
PROSJEKT FHF 901243

DATO 31.12.2020

SIDETALL 24

EIER CAC AS

Nøkkelord: Lakselus, luseskjørt, dypføring, dype lys, funksjonelle fôr, ytre barrierer, rensefisk, fiskevelferd, SWIM, kvantitativ histologi



Innholdsfortegnelse

1.0 OPPSUMMERING	3
1.1 Norsk oppsummering.....	3
1.2 English summary	3
2.0 INNLEDNING	4
2.1 Faglig bakgrunn	4
2.2 Prosjektets omfang	6
2.3 Prosjektorganisering	7
3. MÅLSETNINGER	7
3.1 Prosjektets effektmål	7
3.2 Prosjektets resultatmål	8
4.0 GJENNOMFØRING.....	8
5.0 RESULTATER	11
5.1 Forebyggende tiltak og effekt på laksens adferd.....	11
5.2 Forebyggende tiltak og effekt på lusepåslag	12
5.3 Forebyggende tiltak og effekt på bevegelige lus og avlusingsbehov	14
5.4 Forebyggende tiltak og effekt på fiskevelferd	15
5.5 Funksjonell diett og effekt på fiskens ytre barrierer	15
5.6 Forebyggende tiltak og effekt på rensefisk.....	21
6.0 HOVEDFUNN OG ANBEFALINGER	22
6.1 Hovedfunn oppsummert	22
6.2 Anbefalinger.....	23
7.0 LEVERANSER	23
8.0 VEDLEGG	24

1.0 Oppsummering

1.1 Norsk oppsummering

Norsk oppdrettsnæring har en vesentlig bærekrafts- og kostnadsutfordring relatert til kontroll av og med den ektoparasittiske lakselusen *Lepeophtheirus salmonis*. Stor innsats settes inn for å dreie lusekontrollen fra reaktive behandlingsmetoder og økt mot bruk av passive forebyggende tiltak, og dette prosjektet ble gjennomført for å dokumentere hvor godt ulike passivt forebyggende strategier fungerer i fullskala laksemerder over tid, samt hvordan tiltakene påvirker fiskens velferd. Fire forebyggende strategier ble testet over en 13 måneders periode ved et fullskala FoU anlegg i Rogaland. Den additive effekten av flere tiltak ble utforsket i 12 merder, hvor triplikate grupper ble utstyrt med ulike forebyggende strategier mot lakselus; rensefisk alene; rensefisk og bruk av funksjonelle fôr; rensefisk, funksjonelle fôr og dyp fôring/dype lys; samt en siste gruppe med alle de nevnte tiltakene i tillegg til luseskjørt rundt merden. Miljøforhold i merdene og ved lokaliteten, samt fiskens svømmeadferd, ble overvåket gjennom forsøksperioden, og prøvetaking ble gjennomført hver 2-6 uke for å overvåke nivået av lusepåslag og utvikling av fiskens velferdsstatus. Lusepåslaget ble vist å fluktuere med sesong som forventet, mens forsøksgruppen med alle forebyggende tiltak implementert opprettholdt et signifikant lavere påslag sammenlignet med gruppen som benyttet bare rensefisk og funksjonelle fôr. Det ble vist at man i forsøksgruppene som benyttet dyp fôring/dype lys (6 merder) påvirket svømmeadferd i vesentlig grad slik at fisken her over tid svømte dypere enn i merder uten dyp fôring/dype lys. Fisken i disse gruppene svømte også om lag 6 meter dypere enn haloklinen ved lokaliteten sett over tid. Imidlertid, og selv ved vesentlige gruppevis forskjell i påslag, kunne det ikke påvises signifikante forskjeller i antall bevegelige lus mellom forsøksgruppene, som dermed ble gitt om lag likt antall avlusinger i forsøksperioden. Det var ingen påvirkning av noen forebyggende tiltak på den generelle velferdsstatus for laksen i forsøket. Selv om forebyggende tiltak ikke resulterte i færre avlusinger, har man i forsøket dokumentert et mulighetsrom for strategisk å utnytte flere samtidige forebyggende strategier i kampen mot lakselusen, og spesielt den viktige interaksjonen mellom miljøforhold og smittepress som vil følges opp i videre studier.

Prosjektet hadde også mål om spesifikt å undersøke hvordan funksjonelle fôr påvirker laksens viktigste ytre barrierer, og om funksjonelle fôr kan være et nyttig luseforebyggende tiltak i seg selv. Vi fant ingen signifikant effekt av de spesifikke funksjonelle fôrene på lusepåslag, og det kunne heller ikke observeres gruppevis forskjeller mellom vanlig vekstfôr og funksjonell diett på laksens tilvekst eller egenskapene til mukus i hud/skinn, gjeller eller tarm. Hverken fôrtype, sesong/temperatur eller kjønn hadde innvirkning på fiskeprestasjon eller egenskapene til mukus, og vesentlig merdvis variasjon ble observert. Fiskens vekst stagnerte relativt tidlig i sjøvannsfasen og fisken i forsøket presterte langt dårligere enn forventet. Metodikk for å predikere eller varsle om redusert tilvekst/potensiale for tilvekst ble imidlertid oppdaget i prosjektet, med gjellevevet som beste og primære indikator. Disse observasjonene blir fulgt opp gjennom videre arbeid med å utvikle en operativ metode for å vurdere fiskens barrierestatus.

1.2 English summary

The Atlantic salmon (*Salmo salar*) aquaculture industry is faced with an obstacle in sustainability with increasing production, which is the control and prevention of the ectoparasitic salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. Lice prevention management is steering towards passive applications, and this study aimed to monitor multiple strategies in commercial cages over time, to determine the efficiency of these approaches and their effect on welfare. Four strategies were tested at a commercial scale over a 13-month period, covering a large proportion of a standard production cycle. The additive effect of multiple treatments was established in 12 cages, which were assigned to a prevention strategy of either: cleaner fish only, cleaner fish and functional feed, the previous two factors plus deep

attractant lights and submerged feeding, or the previous three factors plus a lice skirt. Environmental profiles and school swimming depth were monitored throughout the study period, and sampling events occurred every 2–6 weeks to assess the infestation and welfare status of salmon. The rate of infestation fluctuated with season; however, the group with all prevention strategies maintained a lower rate of new infestations compared to the groups with cleaner fish or functional feed only. Cages with deep lights and feeding influenced the school swimming depth, with these groups generally swimming deeper; this meant that these cages also swam ~6 m deeper than the halocline when pooled over time. However, even with strong differences in new infestations and vertical distribution, the level of mobile lice was similar among all groups, thus incurring a similar frequency of delousing events. There was no effect of these prevention strategies on overall welfare status of salmon. This study shows the promise of utilising multiple lice prevention approaches and highlights the interaction between environment and infestation pressure.

The study also specifically investigated the impact of functional feeds on key outer barriers of the salmon. In addition to finding no significant positive impact on lice infestations from functional feed as a preventative measure, neither was there any difference between normal grower diet and the functional diets on salmon growth or the mucous measurements of skin, gills and hindgut. Neither feed nor temperature nor sex had any effect on the growth or mucosal measurements between groups whereas there was variation between cages. Growth stagnated relatively early in the seawater phase and the fish in this field trial were underperforming. Methodology for early-warning signaling of reduced fish performance was developed in relation to the project, with gill tissue and gill barrier status emerging as the best and primary indicator. These observations will be subject to further work to develop an operative method to assess fish barrier status.

2.0 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn

Håndtering av lakselus påfører både fisk og oppdretter vesentlige utfordringer og kostnader. Dette har sammenheng både med strenge grenser for tillatt mengde lakselus per laks i et oppdrettsanlegg og de ikke-medikamentelle metodene som i all hovedsak benyttes for å kontrollere luseforekomsten. Som et ledd i planen for å kontrollere og bekjempe lakselus legges derfor stadig mer fokus på forebyggende metoder. Det finnes fremdeles et relativt begrenset antall forebyggende tiltak tilgjengelig i kommersiell skala, og et fåtall av disse er godt nok beskrevet med hensyn på forventet beskyttende effekt. Bransjeerfaringer tilsier at et enkelt forebyggende tiltak sjelden fungerer tilstrekkelig godt alene til vesentlig å redusere behandlingsfrekvensen. Det finnes også flere erfaringer hvor to tiltak er brukt i kombinasjon med en tilsynelatende større grad av suksess, for eksempel kombinasjonen skjørt og rensefisk, men hvor effekten heller ikke her er tilstrekkelig til å eliminere behovet for behandling. Gjennom dette prosjektet ønsket vi å inkludere de mest dokumenterte og tilgjengelige forebyggende tiltakene i ulike kombinasjoner for å undersøke om man oppnår suksessivt lavere lusenivå og færre behandlinger som en funksjon av antall tiltak man implementerer. De valgte tiltakene var rensefisk, luseskjørt, dyp fôring, dype lys og funksjonelle fôr.

Rensefisk er det mest utbredte forebyggende eller kontinuerlig kontrollerende tiltaket mot lakselus i norsk oppdrettsnæring. Det er vitenskapelig dokumentert i mellomstor skala at rensefisk er effektiv som lusespiser på laks (*Berggylt*: Skiftesvik et al. 2013; *Rognkjeks*: Imsland et al. 2014), og obduksjoner av rensefisk i felt kan i flere tilfeller vise store mengder lus spist av enkeltfisk. Rensefiskens effekt som kontinuerlig kontrollerende tiltak gis også god støtte i Mowi sine interne erfaringer fra operasjoner i Agder; når en enkelt oppdretter har full

kontroll på smittepresset i et område klarer man med hengiven bruk av rensefisk å holde lusenivåene på et svært lavt nivå over tid. Rensefisk ble derfor valgt som basalnivået i prosjektet da strategien til de fleste oppdrettere i Norge er inklusjon av >4 % rensefisk i hver merd.

Selv om det benyttes rensefisk ved en stor andel norske oppdrettsanlegg klarer denne sjelden alene å holde tilstrekkelig kontroll på lusenivåene til å unngå avlusing over lengre perioder, spesielt andre året i sjø med økende biomasse ofte på et relativt begrenset geografisk område. Dette kan ha flere årsaker, eksempelvis variasjon i beiteeffekt med årstid, helsesituasjon i populasjonen og størrelse på laksen, at rensefisk dødeligheten er større enn registrert/antatt (f.eks på grunn av behandling), eller at smittepresset blir for høyt til at rensefisken har mulighet til å beite ned voksne lusestadier før tiltaksgrensen passerer. Dette medfører at selv om rensefisk kan fungere godt som enkelttiltak, spesielt første år i sjø, vil det alltid være et element av usikkerhet og variasjon forbundet med slik «biologisk avlusing», og denne variasjon i kombinasjon med et uforutsigbart smittepress i produksjonsmiljøet resulterer i få lokaliteter hvor oppdretter kan produsere en hel syklus med rensefisk som eneste innsatsfaktor mot lus. Ytterligere forebyggende tiltak er derfor ofte ansett nødvendig i kombinasjon med rensefisk.

Laksens ytre barrierer er viktig for motstandsdyktighet mot blant annet lusepåslag, og vi antar at modifisering av disse barrierene gjennom å benytte fôr tilsatt såkalte «funksjonelle ingredienser» vil bidra både til redusert lusepåslag og en mer robust laks (se for eksempel Refstie et al. 2010; Jensen et al. 2015; Torrecillas et al. 2015). Slike fôr er veletablerte produkter i internasjonal havbruksnæring og skal typisk bidra til å forhindre eller avbøte en negativ påkjenning, f.eks PD, lakselus eller AGD, eller styrke fiskens generelle robusthet. Disse fôrene er imidlertid mer kostbare enn vanlige vekstfôr og representerer slik en økt kostnad for oppdretter som må forsvares biologisk og økonomisk. Selv om fôrene viser signifikante effekter i småskala laboratorieforsøk finnes det begrenset dokumentasjon fra fullskala kommersielle forsøk, og erfaringer fra flere oppdrettere antyder at funksjonelle fôr alene ikke gir tilstrekkelig effekt for eksempelvis å unngå avlusinger. I dette forsøket inngår tiltaket imidlertid som en del av et mer omfattende forebyggende konsept, og i kombinasjon med nye og raffinerte funksjonelle fôr, antas dette å bidra positivt for å oppnå lavere lusepåslag.

Fôrene som skal benyttes i forsøket er Protec Gill og Skretting Shield. Protec Gill inneholder komponenter som skal være effektive mot både lusepåslag og infeksjoner med *Paramoeba perurans*, og brukes i perioden med høy risiko for infeksjon med begge parasitter (fra utsett i September og frem til jul 2016). Shield er et mindre kostbart fôr som er spesialdesignet som forebyggende tiltak mot lus, og skal brukes fra nyttår og frem til våravlusing 2017.

Fiskens svømmedyp har betydning for lusepåslag. De infiserende luseelarvene er positivt fototaktiske og oppholder seg hovedsakelig nær overflaten (Heuch et al., 1995; refs). Ved å bryte kontakten mellom parasitt og vert kan man derfor potensielt begrense lusepåslag i merden. Det er mulig å manipulere fiskens svømmedyp ved hjelp av dyp fôring og dype lys slik at laksen posisjonerer seg under lusebeltet i større deler av døgnet. Det er kjent at laks som svømmer dypt i merden opplever lavere lusepåslag enn individer som svømmer i overflaten. Forsøk med dype vs. grunne merder (Huse og Holm 1993, 0-6 m vs. 0-20 m) og forsøk med nedsenkede vs. grunne merder (Hevrøy et al., 2003, 4-8 m og 8-12 m vs. 0-4 m; Oppedal et al., 2014, 4-12 m vs. 0-12 m) og snorkel (Stien et al. 2016) har vist en negativ korrelasjon mellom laksenes svømmedyp og antall lus per fisk. Flere forsøk har også vist at dersom lys plasseres dypt i merden fortsetter laksen å stime i dypet også om natten (Juell et al., 2003; Juell & Fosseidengen, 2004; Oppedal et al., 2007; Frenzl et al., 2014). Det er potensial for å bruke lys hele året til å styre fisken dypere, siden bruk av lys med lav intensitet og av fiolett fargespekter ikke ser ut til å påvirke modning (Oppedal et al., 2006).

Undervannsfôring trekker fisk mot det dypet fôret tildeles på (Frenzl et al., 2014), som også sett i lengre perioder under tidligere forsøk ved CAC Kobbavik (FHF-prosjekt 901154). Undervannsfôring i kombinasjon med dype lys og rensefisk har imidlertid ikke gitt signifikant lavere lusetall sammenlignet med kontrollmerder ved CAC Kobbavik ved økende lusenivå etter våromrøring. Selv om fisken hovedsakelig står dypere i merder med dypfôring vil noen fisk også her søke overflaten, og denne andelen øker dersom temperaturen i overflaten er fordelaktig. Man ser samtidig at dersom temperaturen i overflaten blir for høy begynner fisken igjen å trekke dypere i merden. Uansett ser man tegn til at rensefisk, dyp fôring og dype lys benyttet sammen ikke vil fungere tilstrekkelig under alle miljøforhold. Derfor ønsket man i dette prosjektet også å inkludere et ytterligere tiltak for å bryte kontakten mellom parasitt og vert. Luseskjørt har vist seg å være effektivt til en viss grad (Næs et al. 2012; Grøntvedt & Kristoffersen, 2015), selv om bransjeerfaringer sier at bruk av luseskjørt alene eller i kombinasjon med rensefisk ikke nødvendigvis gjør at oppdretter unngår avlusing. Imidlertid kan effekten trolig forsterkes ytterligere dersom luseskjørt kombineres med dyp fôring og lys for å beskytte andelen av fisken som trekker til overflaten.

Oppsummert er et enkelt forebyggende oftest utilstrekkelig for å signifikant redusere antall avlusinger eller i alle fall å unngå avlusing fullstendig. I dette prosjektet forsøkte vi derfor 1, 2, 3 og 4 samtidige forebyggende tiltak over tid, ved en typisk fjordlokalitet. Rensefisk representerer den kontinuerlige biologiske avlusing i alle forsøksgrupper, men man vet erfaringsmessig at disse alene ikke håndterer omfattende lusepåslag. Derfor ble funksjonelle fôr inkludert som tiltak, som i mindre skala har gitt opptil 20 % reduksjon i lusenivå. I kombinasjon med rensefisk søkte man å skaffe kunnskap rundt hvor mye ekstra beskyttelse funksjonelle fôr tilbyr laksen, og gjennom inngående analyser av fiskens ytre barrierer få kunnskap om de funksjonelle ingrediensenes påvirkning på målvevene som antas viktigst for motstandsdyktighet mot lus og generell robusthet. Videre vet man at lys kan tiltrekke fisken nærmere dybden hvor disse er plassert, og man vet samtidig fra tidligere erfaringer ved CAC Kobbavik at dyp fôring i lange perioder kan sørge for at fisken i snitt svømmer dypere enn i merder med overflatefôring. Imidlertid er det ikke bevist at dette tiltaket sammen med rensefisk er tilstrekkelig for å unngå avlusing i fjordmiljø, og vi ønsket derfor også her å inkludere funksjonelle fôr for å undersøke om den ekstra beskyttelsen dette gir er tilstrekkelig for å unngå avlusing. I forsøkets siste gruppe skal det også inkluderes skjørt rundt merdens øvre 6 meter, da man i tidligere forsøk har sett at; a) selv om fisken hovedsakelig står dypere i merder med dypfôring vil noen fisk også her søke overflaten, og b) ved plutselige skift i temperaturgradienten (fra homogene vannmasser til varmere i overflaten) vil dypfôring/lys ikke fungere like godt for å holde fisken dypere i merden, og slik heller ikke gi god nok beskyttelse mot lusepåslag. Forsøket går over tilnærmet en hel produksjonssyklus for å dekke ulike sesonger og variasjoner i miljøforhold, men samtidig vil fokuset være størst frem til våravlusingen hvor målsetningen er å kunne unngå denne på merdene med effektive tiltak.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet ble gjennomført ved Centre for Aquaculture Competence sin FoU lokalitet Vindsvik i Jøsenfjorden (Hjelmeland kommune). Lokaliteten er utstyrt med 12 stk. 120m sirkelmerder. Det ble satt ut om lag 65.000 smolt per merd. Forsøket ble gjennomført fra utsett i september 2016 til utslakt i april 2018. Prøvetaking for vurdering av lusepåslag og fiskevelferd ble gjort hver 2-6. uke av forskere fra Havforskningsinstituttet (HI), mens prøvetaking for vurdering av funksjonell diett sin effekt på laksens ytre barrierer ble gjort ved 8 punkter gjennom forsøksperioden, av ansvarlige fra Mowi, Quantidoc, UiB og Nifes. Prosjektets totale økonomiske ramme var om lag 13 MNOK, med et faktisk forbruk i prosjektet på om lag 11,2 MNOK.

2.3 Prosjektorganisering

Centre for Aquaculture Competence er ansvarlig organisasjon og tilsagnsmottager. Forsøkslokalitet Vindsvik er for øvrig en spesielt oppsatt FoU lokalitet som driver under FoU tillatelser, og hvor flere ansatte har lang erfaring med prosjektarbeid i felt. Ansvarlig prosjektleder for forsøket er forsøkskoordinator for CAC, Henrik Trengereid, som til daglig prosjektleder i Mowi sin globale FoU-avdeling. Prosjektgruppen for øvrig består av ressurser fra eierorganisasjonene (Mowi, Skretting og AKVA) med lang erfaring innen felter som fiskehelse, lakselus, fôr og teknologi. CAC sine tre eiere vil alle, ved siden av deltagelse i prosjektgruppen, være tungt involvert i prosjektet gjennom sine FoU avdelinger og tilhørende kompetanse; herunder Mowi global R&D, Skretting ARC og AKVA group sin FoU-avdeling og avdeling for strategiske prosjekter.

I tillegg til kompetansen som finnes i eierorganisasjonene til CAC, vil relevant fagkompetanse tilknyttes direkte gjennom faglige partnere i Havforskningsinstituttet og Quantidoc/UiB, med hhv. Frode Oppedal og Karin Pittman som kontaktpersoner og medlemmer i prosjektgruppen. Gjennom styrings- og referansegruppen tar man også sikte på å tilknytte prosjektet ytterligere kompetanse på bruk av forebyggende tiltak og lakselus, ytre barrierer og funksjonelle fôr og rensefisk. Styringsgruppen består av Randi Grøntvedt (INAQ), Linda Jensen (Skretting ARC) og Liv Birte Rønneberg (Mowi Norway). Oppfølging fra FHF av Kjell Maroni.

3. Målsetninger

3.1 Prosjektets effektmål

Resultatene som skapes gjennom dette forsøket er av stor verdi for næringen som helhet. Lakselus er som kjent endemisk langs norskekysten, og bare et fåtall oppdrettslokaliteter evner å drive en hel produksjonssyklus uten behov for avlusing. I den forbindelse oppleves en problemstilling med stadig redusert sensitivitet hos lakselus overfor dagens tilgjengelige kjemiske avlusingsmidler. Næringen jobber kontinuerlig mot en overgang til mer effektive ikke-medikamentelle metoder, men hovedmengden av disse krever håndtering som potensielt kan resultere i økt behandlingsdødelighet.

Det er hevet over tvil at det mest optimale er fravær av behandling/avlusing i sin helhet, og da er per nå eneste løsning å implementere flere forebyggende tiltak samtidig. Vi vet at suksessfull bruk av forebyggende tiltak har potensiale til å redusere lusemengden og antall behandlinger, og gjennom dette forsøket skal det undersøkes og dokumenteres om man med dagens tilgjengelige forebyggende metoder kan oppnå en vesentlig reduksjon eller eliminasjon av behovet for avlusing. Dette vil være av stor verdi for oppdretter som får hhv. sparte kostnader gjennom mindre avlusing, bedre tilvekst, lavere behandlingsdødelighet og mulighet for fremtidig vekst gjennom kontroll på lakselus. Det representerer også fremskritt for fiskevelferd da håndtering og påfølgende stress og behandlingsdødelighet fra mekanisk avlusingsoperasjoner kan reduseres vesentlig.

Videre skal prosjektet vurdere både effektiviteten til rensefisk i samband med andre forebyggende metoder, samt vurdere nytteverdien av funksjonelle fôr både som forebyggende tiltak alene men også i forhold til hvordan fôrene påvirker målvevene i laksen. Denne kunnskapen vil bidra ytterligere til riktigere bruk av tiltak, og sammen med kunnskap om hvordan ulike kombinasjoner av forebyggende tiltak beskytter mot lusepåslag legges grunnlaget for mer treffsikker og kostnadseffektiv ikke medikamentell lusekontroll basert på passive metoder.

3.2 Prosjektets resultatmål

Prosjektets overordnede hovedmål er å beskrive og dokumentere effekten av ulike kombinasjoner forebyggende tiltak målt gjennom lusetall og behandlingsfrekvens i de ulike eksperimentelle gruppene.

Delmål:

- a) **Lakselus** – beskrive utviklingen i påslag og totalt lusenivå i de ulike gruppene, samt benytte miljø- og adferdsdata for å underbygge resultater og synliggjøre eventuelle forskjeller i behandlingsfrekvens.
- b) **Fiskevelferd** – over tid å verifisere gjennom SWIM evalueringer i samtlige merder at man ikke påfører vesentlig redusert fiskevelferd ved bruk av dagens tilgjengelige forebyggende tiltak i kommersiell skala.
- c) **Ytre barrierer** – beskrive med flere metoder hvordan funksjonelle fôr påvirker fiskens ytre barrierer (skinn, gjeller og tarm), beskrive hvordan ytre barrierer utvikles gjennom overgangen fra ferskvann til sjøvann og videre i den kritiske første perioden i sjø, samt hvordan disse påvirkes av eventuell lusebehandling.
- d) **Rensefisk** – over tid å forsøke evaluere rensefiskens prestasjon i de ulike gruppene gjennom monitorering av adferd, obduksjoner for evaluering av beiteeffekt, evaluering av velferd for rensefisken i de ulike gruppene etter predefinert standard.

4.0 Gjennomføring

Praktisk gjennomføring:

CAC ved prosjektleder Henrik Trengereid og driftsleder Agnes Kleppa har ansvar for daglig drift av lokalitet og prosjekt. Personell ved CAC vil bidra ved samtlige prøvetakinger (uttak av fisk med eget utstyr og opparbeiding av prøvemateriale etter opplæring), og gjennomføre lusetellinger og gjellescoring for AGD i forsøksperioden. Evaluering av rensefiskens effekt i de ulike gruppene vil gjennomføres av anleggets personell under assistanse/opplæring av områdets veterinær og rensefiskansvarlige.

Mowi har ansvar for prøvetaking av ytre barrierer under oppfølging og opplæring fra Quantidoc, uttak av gjelleprøver for hhv. histologiske analyser, risikobaserte uttak (qPCR) for påvisning av *P.perurans*, uttak for geneekspresjonsanalyser (analyseres ved Nifes) og uttak for analyse av mukus viskositet hos Skretting ARC. Videre har Mowi også ansvar for generell oppfølging av fiskehelse, fiskeprestasjon og evaluering for innslag av tidlig kjønnsmodning hvilket vil gjøres både ved løpende veterinærtilsyn og ved fastsatte evalueringspunkter (se vedlegg 2). Mowi og Skretting vil sammen være ansvarlig for prøvetaking på slakteri Q1 2018. Videre har Skretting og Skretting ARC ansvar for produksjon og leveranser av funksjonelle fôr, og for analyser på gjellelev for evaluering av viskositet og innhold av lysozym i mucus. AKVA group har ansvar for produksjon, installasjon og oppfølging av system for undervannsføring og undervannsslys.

Havforskningsinstituttet (HI) har ansvar for prøvetaking for å beskrive behandlingenes forebyggende effekt mot lusepåslag og det generelle lusenivået, samt SWIM evaluering ved samtlige prøvetakingpunkter for beskrivelse av de ulike kombinasjonenes effekt på fiskevelferd. HI har også ansvar for montering og oppfølging av ekkolodd, oppsummering/sammenstilling av miljø- og ekkodata, samt endelig rapport for beskrivelse av observert forebyggende effekt på lus og påvirkning på velferd. Quantidoc/UiB har ansvar for opplæring på prøvetaking av ytre barrierer (i ferskvann og sjø), oppfølging og gjennomføring av prøvetaking, histologiske analyser («mucosal mapping») av opparbeidet materiale, samt endelig rapport ytre barrierer.

Vitenskapelig oppsett:

Forsøket utføres ved forskningslokaliteten Vindsvik i Rogaland. Anlegget har 12 stk 120m sirkelmerder i to parallelle rader, og det settes ut ca. 65.000 høstsmolt (MOWI) à 100 gram i hver merd. Det ble satt ut rensefisk tilsvarende om lag 5 % innblanding i hver merd. Fisken ble satt ut i starten av september 2016. Forsøket har planlagt varighet på en hel produksjonssyklus (om lag 18 måneder) for å inkludere de sesongmessige variasjonene i fiskeadferd (spesielt vertikal posisjonering), miljøfaktorer og smittepress i området. Mulighet for å opprettholde forsøket gjennom hele produksjonssyklus vil likevel avhenge av fiskehelsen og lokale miljøforhold. CAC forbeholder seg retten til å gjøre tiltak som avviker fra plan dersom nødvendig for å overholde nasjonale eller lokale regelverk, eller ved situasjoner hvor den generelle fiskehelsen er alvorlig truet. Handlinger ved slike forserlige situasjoner diskuteres først i prosjekt- og styringsgruppe.

Merd 1 Gruppe B: Rensefisk Funksjonell diett HERAND	Merd 3 Gruppe D: Rensefisk Funksjonell diett Dype lys & føring Luseskjørt HERAND	Merd 5 Gruppe A: Rensefisk HERAND	Merd 7 Gruppe D: Rensefisk Funksjonell diett Dype lys & føring Luseskjørt HERAND	Merd 9 Gruppe C: Rensefisk Funksjonell diett Dype lys & føring KVIINGO	Merd 11 Gruppe B: Rensefisk Funksjonell diett KVIINGO
Merd 2 Gruppe C: Rensefisk Funksjonell diett Dype lys & føring HERAND	Merd 4 Gruppe A: Rensefisk HERAND	Merd 6 Gruppe C: Rensefisk Funksjonell diett Dype lys & føring HERAND	Merd 8 Gruppe B: Rensefisk Funksjonell diett HERAND	Merd 10 Gruppe D: Rensefisk Funksjonell diett Dype lys & føring Luseskjørt KVIINGO	Merd 12 Gruppe A: Rensefisk KVIINGO

Figur 1: Oversikt over forsøksgruppene og de aktive forebyggende tiltak per gruppe.

Forsøket består av fire triplikater satt opp som følger;

- **Gruppe 1, kontroll:** Tre merder hvor det gjennom produksjonssyklus bare brukes rensefisk som forebyggende tiltak. Rensefisk benyttes fra utsett. Det plasseres SAIC sonarer («merdøyer») i samtlige merder i denne gruppen for å følge fiskens vertikale fordeling.
- **Gruppe 2, behandling 1:** Tre merder hvor det benyttes rensefisk fra utsett, og i tillegg funksjonelle fôr i perioden fra utsett til våravlusning 2017; Protec Gill i perioden fra utsett til nyttår 2016, og Skretting Shield i perioden fra nyttår og frem til våravlusning 2017.
- **Gruppe 3, behandling 2:** Identisk med behandling 1 frem til uke 45-46. Da vil det monteres 1 stk. dypfører (AKVA Subfeeder, 7m utføringsdyp) og 5 stk. AKVA 100W UV LED kombinasjonslys i 6 merder, hvorav 3 inngår i behandling 2. Dette skjer etter notskift til dypere nøter for å tillate bedre utnyttelse av dypføring. Det plasseres SAIC sonarer («merdøyer») i samtlige merder i denne gruppen for å følge fiskens vertikale fordeling. Lysene startes på svak intensitet og eventuelt økes dersom de ikke har tiltrekkende effekt på laksen. Lav intensitet og fiolett farge brukes for å unngå potensiell kjønnsmodning. Lysene er nytviklet og kombinerer bruken av fiolett UV og blåspektralt antikjønnsmodningslys slik at oppdretter bare behøver en type lys. Lysene kan styres automatisk, og skiftet fra fiolett UV til blåspektralt lys (og vice versa) gjøres via dim-funksjon.
- **Gruppe 4, behandling 3:** Identisk med behandling 2, men ved samme tid (uke 45-46) monteres også luseskjørt rundt disse merdene (6m dype skjørt, leverandør NWP) for beskyttelse mot smitte i tilfeller hvor laksen søker overflaten. Det plasseres SAIC sonarer («merdøyer») i samtlige merder i denne gruppen for å følge fiskens vertikale fordeling. Det plasseres O2-sonder i disse merdene i og like under skjørtzone for å dokumentere at oksygenivåer ikke truer fiskevelferden.

Tabell 1: Oversikt over tiltak i hver gruppe. Alle grupper har tre merder; to fra settefiskanlegg 1 og en fra settefiskanlegg 2.

Gruppe	Rensefisk	Funksjonelle fôr	Dyp fôring/lys	Luseskjørt
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	+

Det settes opp utstyr for kontinuerlig miljømåling (CTD) på anlegget. Hver merd benytter høyoppløselig kamera til fôring av laks, og disse kan samtidig benyttes til adferdsobservasjoner. Merdenes gruppetilhørighet randomiseres før oppstart. Smolten som benyttes i forsøket kommer fra to settefiskanlegg, med hhv. 8 og 4 merder fra hvert anlegg. For å sikre representativitet vil hver gruppe bestå av to merder fra settefiskanlegg 1 og en merd fra settefiskanlegg 2.

Datainnsamling og metodikk:

Det vil gjennom forsøksperioden samles inn en betydelig mengde data, primært relatert til lus, fiskevelferd og ytre barrierer. Det henvises til Vedlegg 1, 2 og 4 for detaljert informasjon om statistisk analyse og modellbeskrivelser for forsøket.

Lakselus og fiskevelferd

For å besvare forsøkets hovedmål vil det fokuseres mye på lakselus og utvikling over tid. Det skal telles lus ukentlig på alle merder, 20 fisk per merd, av anleggets personell. Disse deles inn i følgende stadier; fastsittende (kopepoditter, Chalimus 1 og 2), små bevegelige (pre-adult 1), store bevegelige (pre-adult 2 begge kjønn og voksne hanner), og voksne hunner. Ved 15 punkter gjennom forsøket skal HI gjennomføre mer detaljerte tellinger, hvor det skal avlives 20 fisk per merd og lus identifiseres til det spesifikke stadium i livshistorien. Disse tellingene foretas hyppigere ved høye temperaturer, og er organisert slik at man etter en gitt telling kan benytte lusetall, kunnskap om de enkelte stadiers varighet ved ulike temperaturer og miljødata for å tilbakeregne og slik finne tidsperioden hvor påslag(ene) fant sted. Dette sammenholdes med adferdsdata (sonar) i den estimerte påslagsperioden for å beskrive hvor i vannsøylen fisken hovedsakelig oppholdt seg i perioden.

I et forsøk på en objektiv vurdering av rensefisken beiteeffekt i de ulike gruppene vil man, korresponderende med enkelte av lusetellingene foretatt av HI, også obdisere rensefisk i alle grupper for beskrivelse av mageinnhold. Det skal også registreres på disse individene ytre og indre velferdsindikatorer, samt at adferdsundersøkelser gjennomføres som sammenhold med øvrige parameter kan gi informasjon om rensefiskens reelle beiteeffekt.

Ved de 15 utvidete uttakene skal personell fra HI også gjøre velferdsevalueringer (SWIM) på all fisk som et deskriptivt mål på fiskevelferd.

Ytre barrierer (skinn, gjeller og tarm)

Kunnskapen om utvikling av ytre barrierer i felt over tid er svært mangelfull. Beskrivelse av hvordan laksens ytre barrierer endres over tid (for eksempel som følger av lusepåslag eller andre ytre stressorer), samt hvordan de påvirkes av funksjonelle ingredienser i fôret, av lusebehandling og av overføring mellom fersk- og sjøvann, er slik et spesifikt delmål i prosjektet. Dette vil, ved siden av rene lusetellinger, utgjøre bakgrunnsdata for å konkludere hvor effektivt funksjonelle fôr er i beskyttelsen mot parasitter. Ved siden av effekt mot lakselus har vi også valgt å inkludere her den nest viktigste eksterne parasitten i norsk oppdrett, *Paramoeba perurans*, som forårsaker amøbegjellesykdom (AGD). Ved siden av selv å være en svært skadelig parasitt som det vil være stor verdi i å dokumentere suksessfull forebygging

mot, vil laksen ved infeksjon svekkes på andre områder, herunder dens kapasitet til å motstå lusepåslag gjennom sitt medfødte immunsystem.

Vi vil evaluere hvordan de ytre barrierene påvirkes, med spesielt fokus på hud, gjeller og tarm, ved bruk av en rekke metoder. Vi skal ved 7 punkter i sjøvannsfasen (samt et nulluttak i ferskvann) ta prøver av alle merder i gruppe 1 (kontroll) og 2 (funksjonelle fôr) for analysering av ytre barrierer (skinn, gjeller og tarm) ved hjelp av kvantitativ histologi (se Pittman et al. 2011; Pittman et al. 2012). Dette er en dokumentert metode («mucosal mapping») som beskriver histologisk de morfometriske forandringer i fiskens primære ytre barrierer. Det er vist at disse påvirkes betydelig av eksterne stressorer som eksempelvis lusepåslag. Vi ønsker gjennom studien å kartlegge disse endringene over tid og hvordan de i full skala påvirkes både av utfordringer (transport, avlusing) og av forebyggende tiltak (funksjonelle fôr).

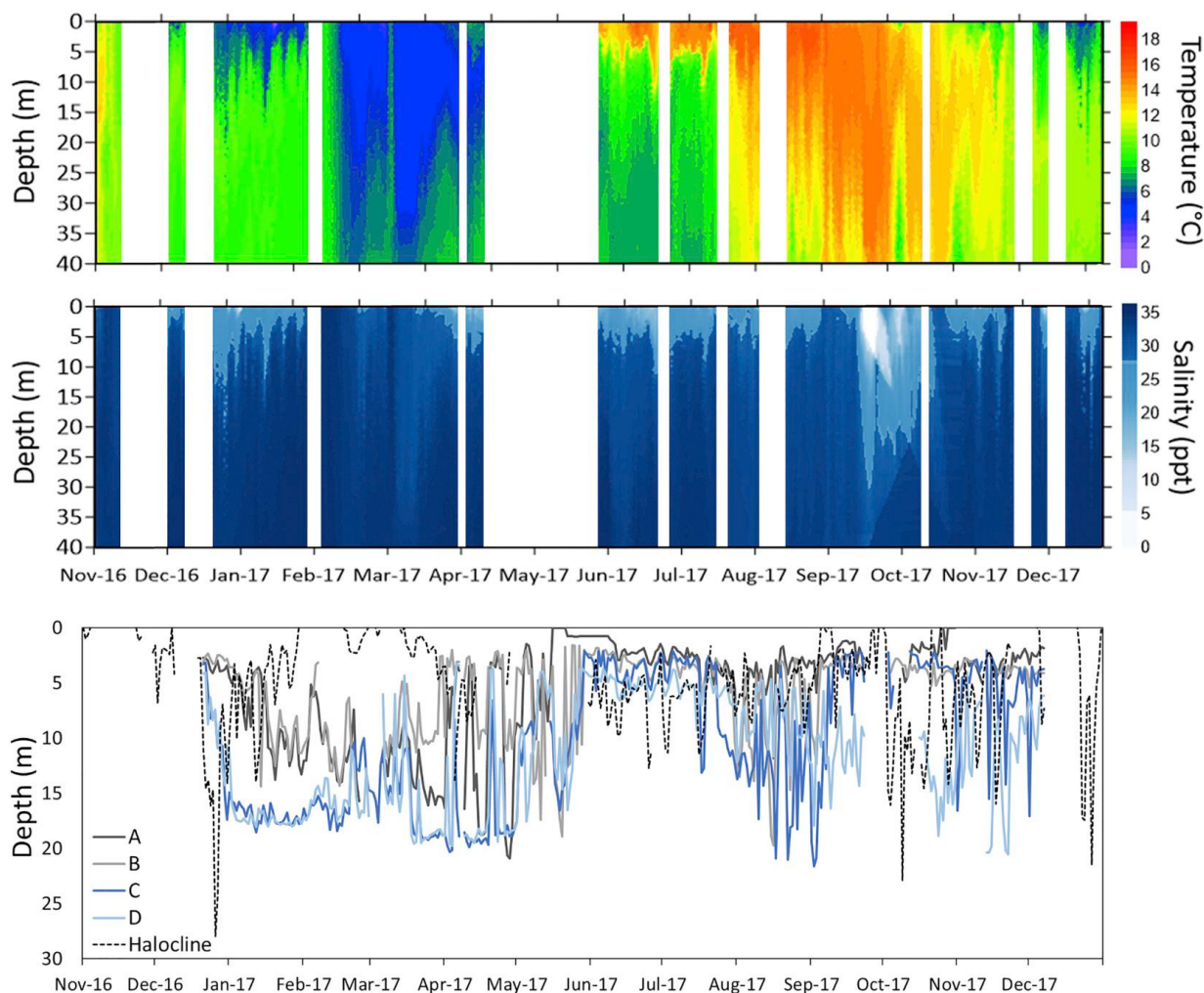
Komplementært til kvantitativ histologi skal vi ta ut tilsvarende vev (fra samme fisk) for geneekspresjonsanalyser på indikatorproteiner for barrierefunksjon. Dette vil gi oss ytterligere inngående kunnskap ved siden av de visuelle og morfometriske endringene i målvevene, og gjennom disse analysene kan vi også få mer spesifikk informasjon om hvilke celler eller vevsstrukturer som påvirkes, og om endringene i barrierefunksjon faktisk resulterer fra bruk av funksjonelle ingredienser og ikke fra for eksempel miljøfaktorer eller annet «feltstøy». Disse analysene vil utføres ved Nifes.

5.0 Resultater

Det henvises for øvrig til Vedlegg 1, 2, 3 og 4 for komplett og detaljert fremleggelse av resultatene i prosjektet. Det følgende kapittel inkluderer de viktigste funn og resultater.

5.1 Forebyggende tiltak og effekt på laksens adferd

Selv om laksen responderte på ulike miljøvariabler som varierte med sesong så vi en konsekvent forskjell i gjennomsnittlig dybdefordeling (av den grunnest svømmende sub-populasjonen) mellom gruppene. Merder med dyp fôring og dype lys (gruppe C og D) svømte dypere enn fisk i merder med overflatefôring (gruppe A og B), med eksperimentell gruppe som signifikant variabel i modellen (gruppe C dybdeestimat +/- SE: 5.85 +/- 1.18, $z = 4.95$, $p < .001$; gruppe D dybdeestimat +/- SE: 6.30 +/- 1.18, $z = 5.33$, $p < .001$). Dataene viste et gjennomsnittlig svømmedyp på 11.05 m (SE: +/-0.2 m) for fisk i gruppe C og 11.49 m (+/- 1 m) for gruppe D. Ved sammenligning hadde fisk i gruppe A og B et gjennomsnittlig median svømmedyp over studieperioden (den grunnest svømmende sub-populasjonen) på hhv. 5.18 (+/- 1.7) og 5.55 (+/- 0.4) m. Tilstedeværelsen av mer enn en stim (bi- eller polymodal fordeling i merden) ble observert i 24% av studieperioden for gruppe A og B (15-32%) og 31% av tiden for gruppe C og D (21-40%). Forsøkslokaliteten ligger langt inne i en smal og dyp fjord, og en stratifisering av temperatur og salinitet ble ofte observert (Fig. 2). Det er verdt å påpeke at et tydelig brakkvannslag var til stede i store deler av forsøksperioden, og noen ganger strakk brakkvannslaget dypere enn dybden på luseskjørtet (6 m) (Fig. 2). Svømmedypene var i gjennomsnitt ~0.03 og 0.16 m over haloklinen for gruppe A og B over forsøksperioden, mens for gruppe C og D var svømmedypet i snitt ~5.76 og 6.79 m under haloklinen dog med større variasjon mellom dager (Fig. 3).



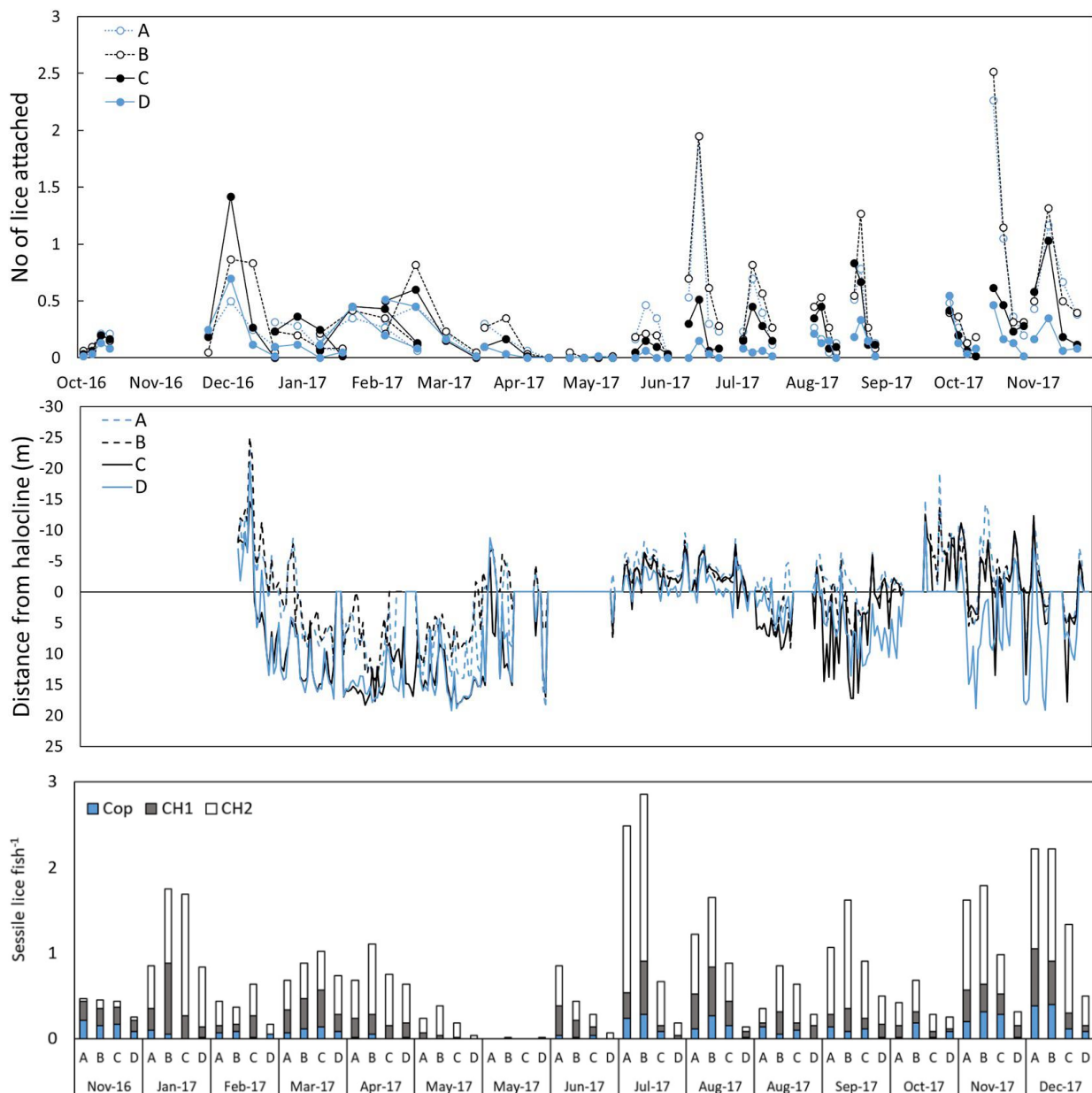
Figur 2 (øvre) og 3 (nedre): Fig 2: Miljøprofil ved lokaliteten i forsøksperioden. Fig 3: Svømmedyp i alle forsøksgrupper sammenholdt mot haloklinen ved lokalitet.

5.2 Forebyggende tiltak og effekt på lusepåslag

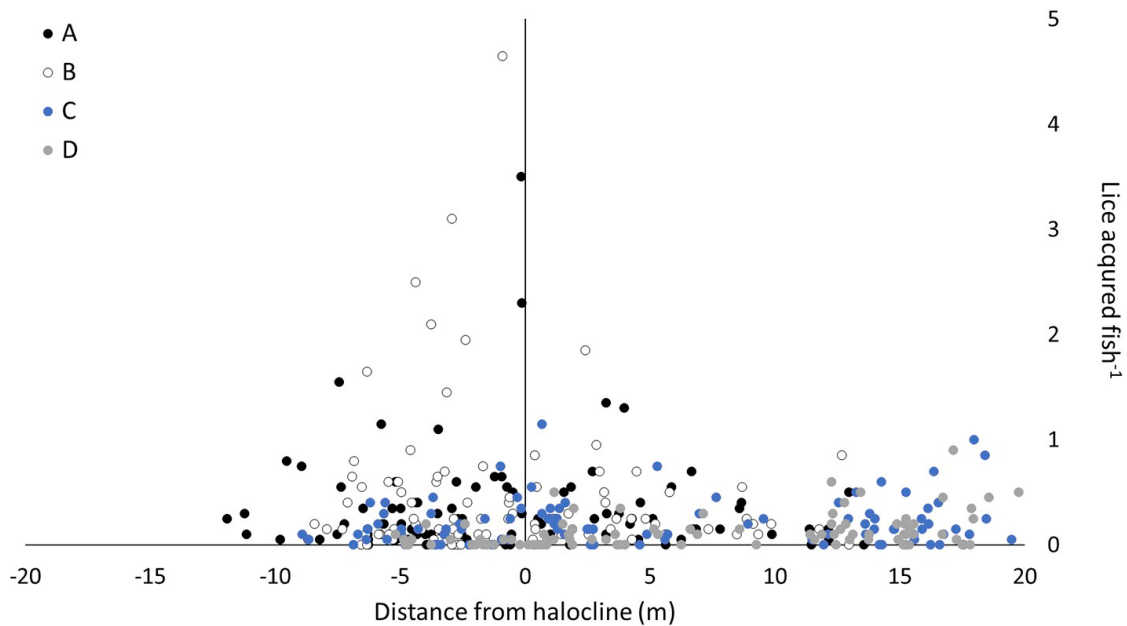
De høyeste lusepåslagene ble interessant nok observert i ulike sesonger i de ulike eksperimentelle gruppene, med de høyeste nivåene registrert i juli 2017 for gruppe A (kontroll) og B (hvh. 2.48 and 2.85 lus påslått per fisk), mens høyeste påslag ble registrert i hhv. desember og mars 2017 for gruppe C (1.33 lus påslått per fisk) og D (0.72 lus påslått per fisk) (Fig. 6). Når sannsynlig påslagsdato ble estimert ved modellering tilbake i tid, ble det observert relativt store forskjeller i påslag mellom dager selv innenfor korte perioder med varighet fra dager til uker (Fig. 4). Eksperimentell behandling bidro signifikant til å forklare den observerte variasjonen i lusepåslag mellom gruppene ($\chi^2 = 12.1$, $p = .007$). Sammenlignet med kontrollgruppen (A), hadde ikke gruppe B og C signifikant lavere påslag over studieperioden ($p > .33$ for begge grupper), selv om gruppe C ved flere prøvetakingspunkter hadde numerisk lavere verdier enn kontrollgruppen (A) og gruppe B (Fig. 6). Imidlertid kunne man i gruppen med alle forebyggende tiltak implementert (D) registrere en signifikant reduksjon i lusepåslag (intercept estimate: -0.43 , estimate \pm SE: -1.03 ± 0.34 , $z = -3.04$, $p = .002$), med 51.3% og 63.3% færre fastsittende lus over hele studieperioden sammenlignet med hhv. gruppe A og B. (Fig. 4 og 6). GLM modellen viser også at prøvetakingsdato (og dermed sesong) hadde sterk påvirkning på lusenivået ($z = 2.03$, $p = .042$). Effekten av behandling varierte med prøvetakingsdato i gruppe D sammenlignet med kontrollen (A), og varierte fra 7.3% mer lus i mars 2017 (på relativt lave lusenivåer) til 92.6% færre lus i juli 2017. Gjennom store deler av forsøksperioden viste tiltakene i gruppe D lovende påslagshemmende effekt, med 8 av 13

prøvetakinger hvor gruppe D hadde >40% færre påslåtte lus enn kontrollen (A), og bare to prøvetakingspunkter hvor lavere lusenivåer ikke ble observert i gruppe D sammenlignet med kontrollen (A). Til forskjell fra gruppe D hadde gruppe C faktisk like lusenivåer som kontrollen (A) over studieperioden, med i gjennomsnitt 0.7% mer lus i gruppe C enn i kontrollen (A) selv om det ved enkelte prøvetakinger var vesentlig lavere påslag også i gruppe C (Fig. 6)

Ved undersøkelse av sammenhengen mellom laksens gjennomsnittlige avstand fra haloklinen og påfølgende antall lus påslått viser analysene at hverken svømmedyp eller avstand fra haloklinen alene forklarer forskjellen i lusepåslag mellom gruppene. Imidlertid finnes en interessant trend i dataene hvor avstand fra haloklinen bidrar mer til variasjonen i mengde påslått lus ($z = -1.86$, $p = .062$) sammenlignet med svømmedyp ($z = -1.64$, $p = .101$; Fig. 7), hvilket kan indikere at miljøforhold ved ulike dyp som for eksempel salinitet kan ha betydning for effekten av forebyggende tiltak.



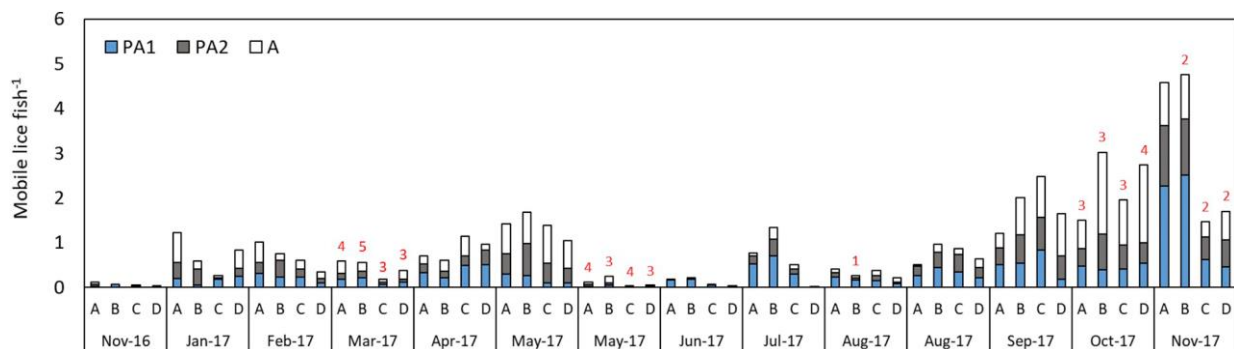
Figur 4 (øvre), 5 (midtre) og 6 (nedre): Fig 4: Påslagsdato per fisk, tilbakeregnet ved hjelp av informasjon om temperatur og lusenens utviklingshastighet. Fig 5: Fiskens registrerte avstand fra haloklinen. Fig 6: Fastsittende lakselus registrert per forsøksgruppe (gjennomsnitt for gruppen).



Figur 7: Gruppefisk sammenligning mellom påslåtte lus per fisk (gruppevis gjennomsnitt, y-aksen) og fiskens avstand fra haloklinen (x-aksen). Trenden i dataene tilsier at antall lus påslått øker nærmere haloklinen (både over og under haloklinen).

5.3 Forebyggende tiltak og effekt på bevegelige lus og avlusingsbehov

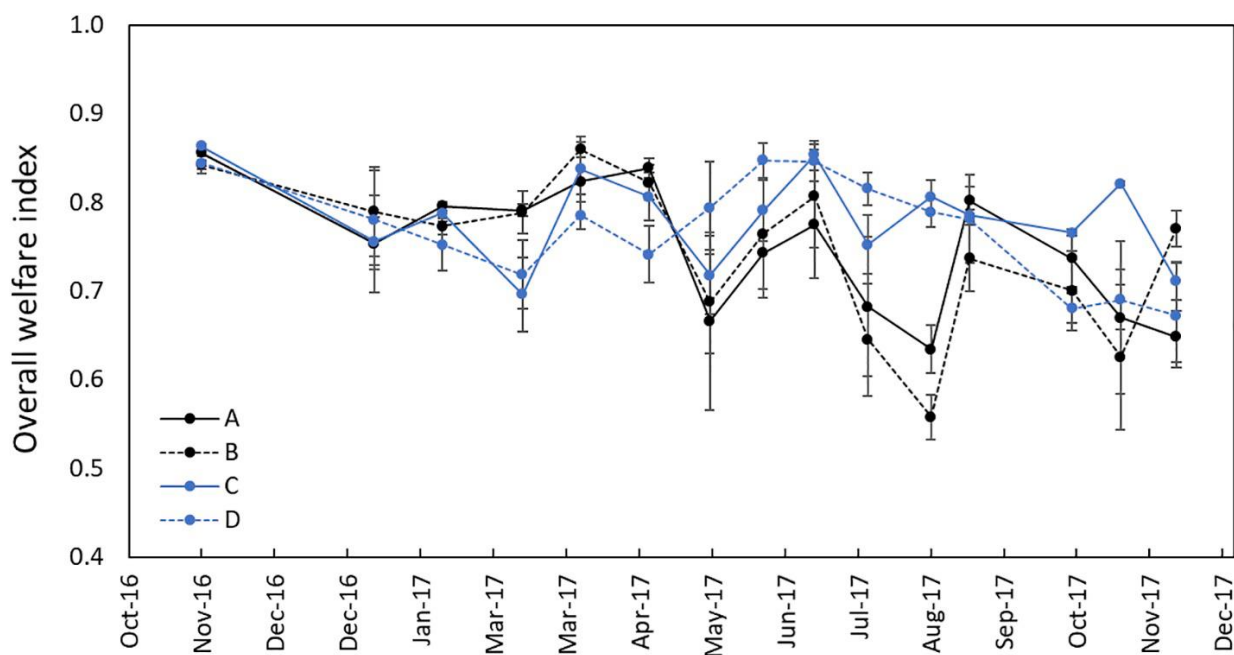
Sett over hele studieperioden var mengden bevegelige lus høyest på fisk i gruppe B og C (gjennomsnitt +/- SE: 2.4 +/- 0.5 og 2.0 +/- 0.4 mobile lus per fisk), etterfulgt av kontrollgruppe A (1.5 +/- 0.4 bevegelige lus per fisk) og gruppe D (1.4 +/- 0.3 mobile lus fisk⁻¹). Over tid ble det altså observert relativt like lusenivåer mellom gruppene, for eksempel bare med ett prøvetakingspunkt (Nov 2017) hvor gruppe C og D hadde >2.0 færre bevegelige lus sammenlignet med kontrollen (A, Fig. 8) selv om det ved noen øvrige prøvetakingspunkter var numerisk lavere lusetall i de ulike eksperimentelle behandlinger sammenlignet med kontrollgruppen (Fig. 8). Selv med avlusinger i perioden var det en topp i lusetall på vinteren og senvår 2017 samtidig med en mer forventet gradvis økning på høsten 2017 (Fig. 8). Mengden bevegelige lus utløste en rekke avlusinger i studieperioden, og avlusingsfrekvensen var ikke forskjellig mellom gruppene. Gruppe A (kontroll) og B hadde hhv. 14 og 16 avlusinger i sum per gruppe (gjennomsnitt på hhv. 4.7 og 5.3 merdbehandlinger), mens gruppe C og D begge måtte behandles 14 ganger (gjennomsnitt på 4.7 merdbehandlinger i begge grupper).



Figur 8: Antall bevegelige lusestadier per fisk (gruppevis gjennomsnitt). Merdvis avlusning indikeres med rødt tall (f.eks 4 betyr fire merdbehandlinger i forsøksgruppen i perioden før neste lusetelling).

5.4 Forebyggende tiltak og effekt på fiskevelferd

Eksperimentell behandling som variabel påvirket ikke de operasjonelle velferdsindikatorer (OWI'er) som ble fulgt opp i prosjektet (sammenlignet med nullmodellen, $\chi^2 = 0.25$, $p = .969$), hvilket viser at de ulike forebyggende strategiene ikke påvirket fiskevelferden over forsøksperioden. Imidlertid kunne man observere betydelig variasjon mellom prøvetakingspunkter og en trend mot generell reduksjon i de fleste velferdsindikatorer over forsøksperioden uavhengig av eksperimentell behandling (Fig. 9). De maksimale verdiene for velferdsindikatorerne var lik mellom gruppene (0.86 for gruppe A, B, og C, og 0.85 for gruppe D), mens de laveste observerte velferdsscorene ble observert i gruppe A og B (hhv. 0.63 og 0.56, sammenlignet med hhv. 0.70 and 0.67 i gruppe C og D). Prøver fra august 2017 og utover høsten, med unntak av et punkt i september, viste noen gruppeviseforskjeller i velferdsindikatorerne (Fig. 9). Gruppe A og B hadde moderat redusert velferdsscore under 0.7 i august og september 2017, og dette var i hovedsak drevet av svekket kondisjon på øyner og høyere lusetall i denne perioden.



Figur 9: Velferdsscore (SWIM, gjennomsnitt per forsøksgruppe) over forsøksperioden.

5.5 Funksjonell diett og effekt på fiskens ytre barrierer

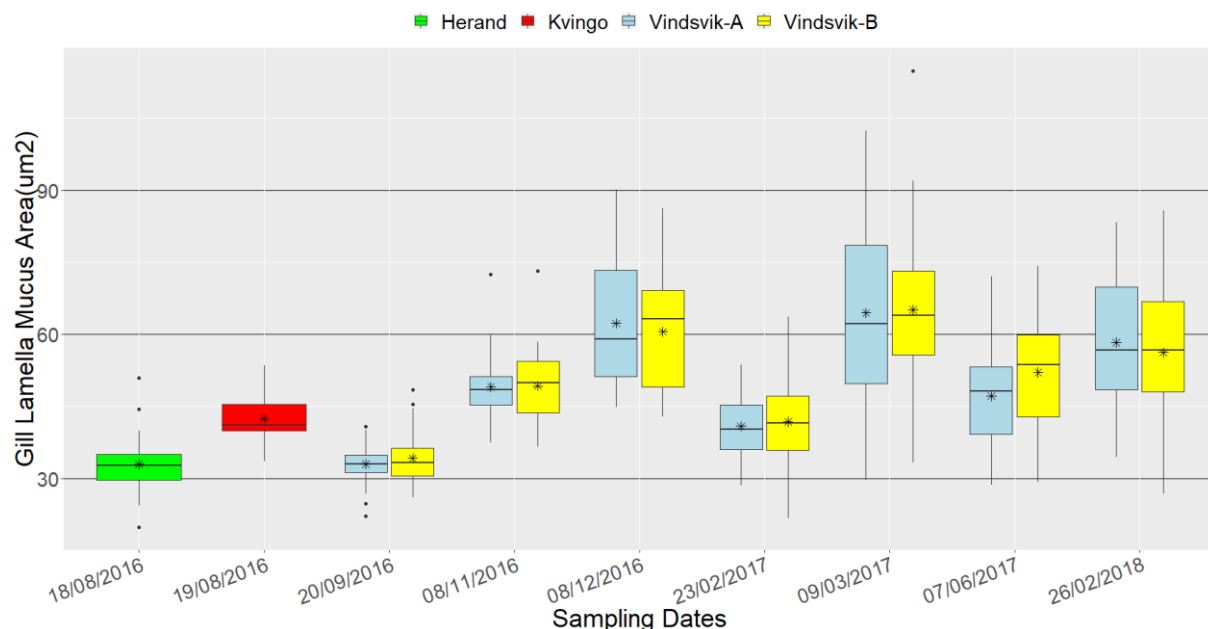
Gjeller:

Mucus cellene på gjellenes lameller har en distinkt forskjell som følger av smoltens opprinnelse (Fig. 10-12), og reflekterer forskjellige mikrobielle miljøer i de to settefiskanleggene ($33 \mu^2$ Herand mot $42 \mu^2$ Kvingo). Tettheten til mucus cellene er under 2.5% i ferskvann, og reduseres ytterligere til under 1% etter transport til sjøvann. Smolten var frisk og uten kjente sykdommer ved utsett, og miljøet i både settefiskanlegget og på lokalitet (etter utsett) kan dermed tolkes å være godt siden lite stimulering av det innebyggede immunsystemet kan observeres i gjellene. Etter utsett i sjøvann var cellene om lag $33 \mu^2$ og reflekterer nå et nytt mikrobiom i sjø. Forskjeller mellom settefiskanleggene er tilsynelatende forsvunnet ved første prøvetaking i sjøvann, og man kan ikke se forskjeller mellom diettene i gjellenes mucus eller barrierestatus gjennom hele perioden hvor den funksjonelle dietten benyttes (Fig. 10-12).

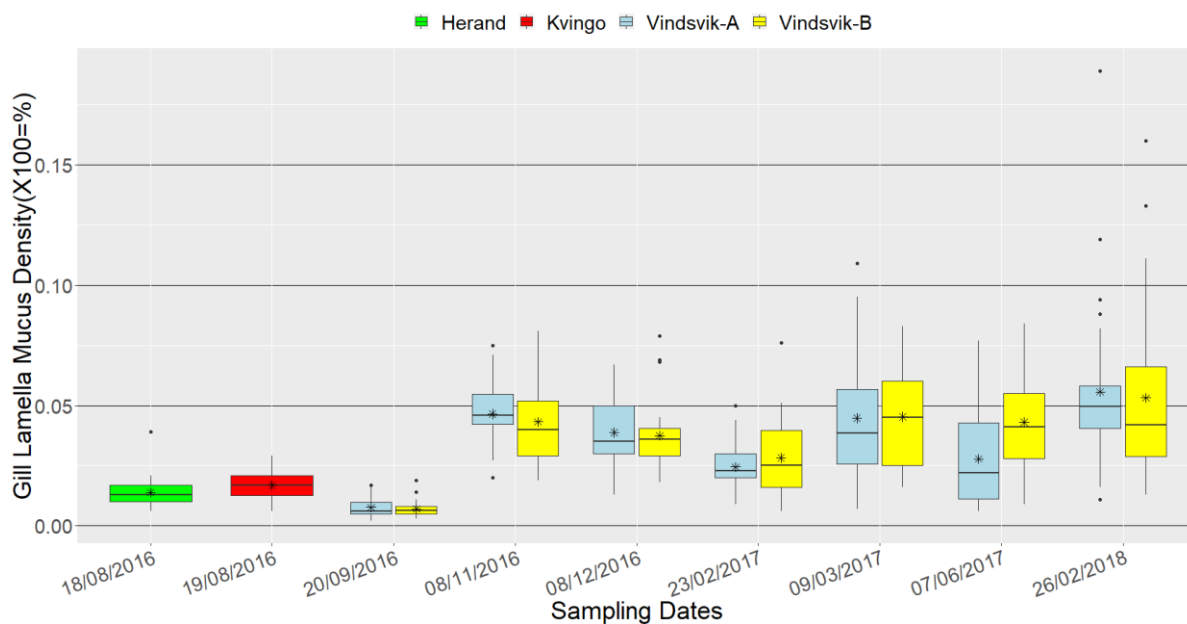
Det observeres en interessant og tydelig økning i mukus cellenes størrelse, tetthet og den generelle barrierestatusen ved prøvetakinger i november og desember, og dette sammenfaller med gjennomføring av notskifte operasjoner ved lokaliteten. Mukus celle tetthet på gjellenes lameller øker fra under 2% (volumetrisk tetthet) til om lag 5% (Fig. 10), og barrierestatus øker fra under 0,2 til om lag 1. Gjellenes barrierestatus for all fisk opp til 500g viser tydelig økt respons i november, og denne responsen ses ikke igjen i noen andre perioder for fisk av samme størrelse (Fig. 12). Dette kan indikere rekruttering av mukus celler i respons til operasjonene ved anlegget. Notskift og notspyling innebærer typisk både frislipp av groeorganismer som hydroider med lokalirriterende nematocyster, og generelt frislipp av små organiske partikler fra de impregnerte nøtene. Flere ulike groeorganismer kan forårsake skader på laksens gjeller (Bloecher et al 2018). Gjellenes respons denne høsten tyder på en sterk og formodentlig vanlig respons i fiskens respiratoriske organ til det som anses normale operasjoner ved et oppdrettsanlegg. Fiskens gjeller kan påføres skader av operasjoner som notspyling, men for frisk og relativt nyutsatt smolt kan man i dette materialet interessant nok se en tydelig immunrespons for å beskytte organismen mot slike stressorer.

De første avlusinger ved lokalitet skjedde i februar 2017, og man ser i denne sammenheng en nedgang i størrelsen på gjellelamellenes mukus celler fra om lag 60 til 40 μ^2 og videre en nedgang i cellenes tetthet fra om lag 4.5% til 2.5% (Fig. 10-11). Største cellestørrelse observeres en måned senere i mars, mens barrierestatusen i februar og mars opprettholdes på om lag 0.6 (Fig. 12), hvilket indikerer at antallet mukus celler var stabilt mens nedgangen i cellestørrelse var driver for den observerte nedgang i tetthet. Man ser tilsynelatende en respons på avlusing med hydrogen peroksid i februar, men at gjellenes potensiale for å stille opp en immunrespons styrkes igjen etterhvert som tiden passerer siden avlusing.

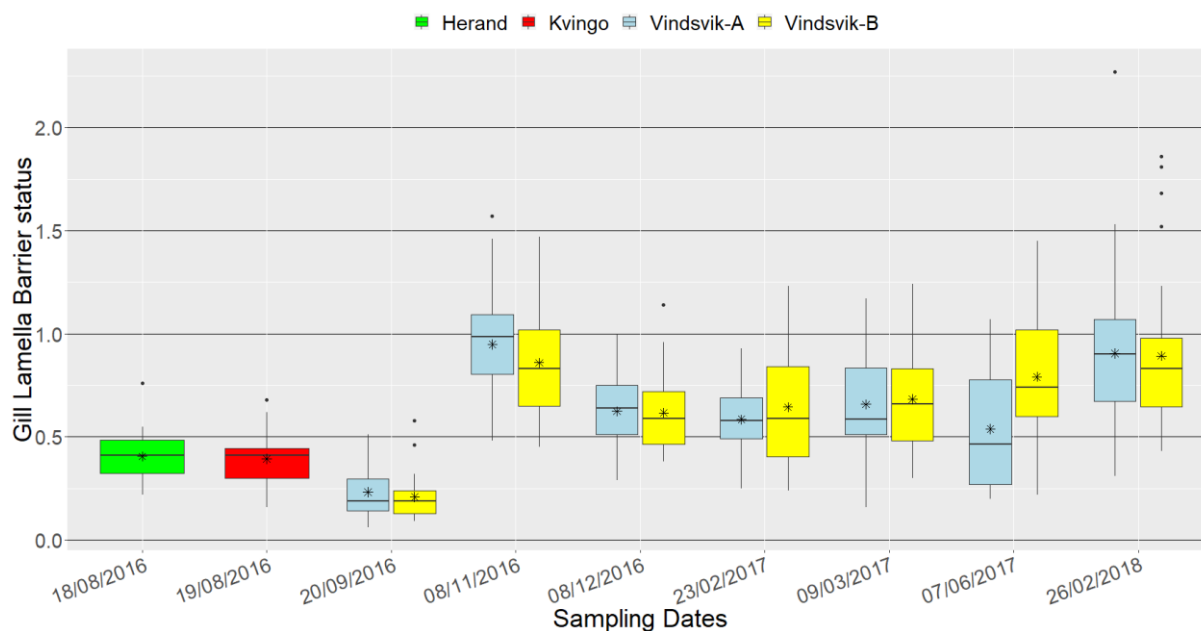
Gjennom de neste 6 måneder fra juli 2017 til februar 2018 ser man at gjennomsnittlig mukus celleareal opprettholdes ved om lag 60 μ^2 mens tettheten opprettholdes rundt 5%. Disse observasjonene styrker antagelsen om at fisken ved lokaliteten i utgangspunktet lever i et sunt livsmiljø frem til slakt.



Figur 10: Oversikt over gjellenes mukus celle størrelse gjennom 8 prøvetakinger i ferskvann- og sjøvann (kvadrat mikron). Standard vekstfor indikeres med blå stolper, mens verdier for gruppen som ble gitt en funksjonell diett angis med gule stolper. Alle merker sammenslått per diett.



Figur 11: Oversikt over gjellenes mukus celle tetthet (volumetrisk tetthet i % av gjelle epitel) gjennom 8 prøvetakinger i ferskvann- og sjøvann. Standard vekstfôr indikeres med blå stolpe, mens verdier for gruppen som ble gitt en funksjonell diett angis med gule stolper. Alle merder sammenslått per diett.



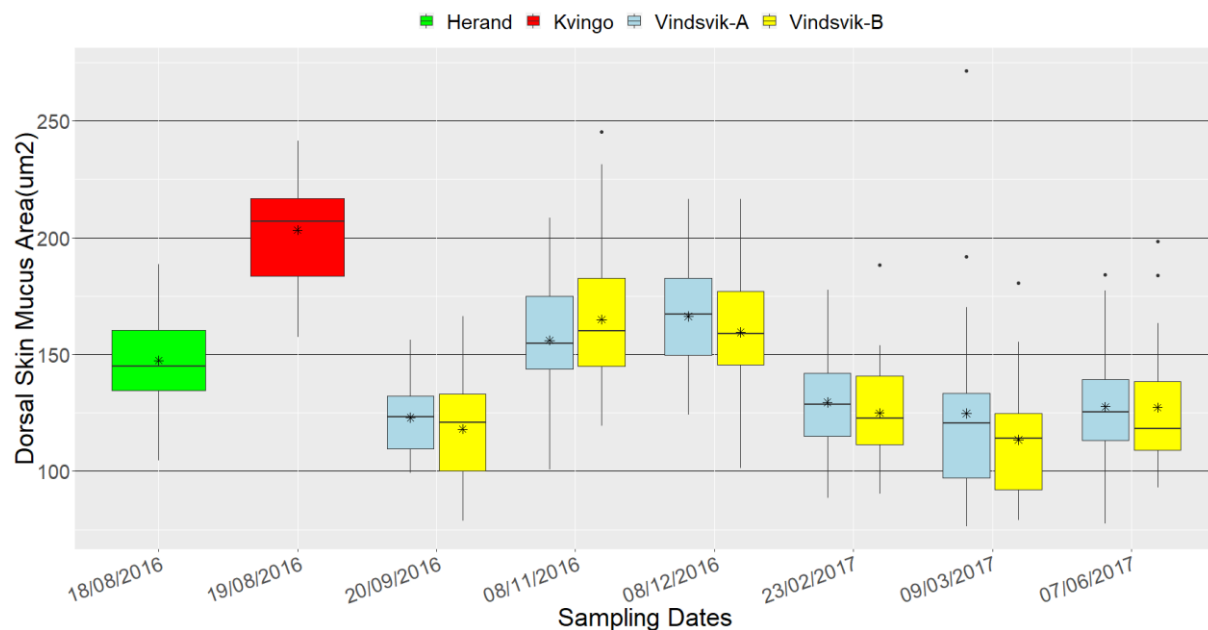
Figur 12: Oversikt over gjellenes mukus barrierestatus gjennom 8 prøvetakinger i ferskvann- og sjøvann. Standard vekstfôr indikeres med blå stolpe, mens verdier for gruppen som ble gitt en funksjonell diett angis med gule stolper. Alle merder sammenslått per diett.

En tydelig korrelasjon ble observert mellom gjellenes barrierestatus og fiskens vekt gjennom forsøksperioden, mens øvrige korrelasjoner mellom status i de indre og ytre barrierer var svakere og mer sporadiske (<0.4). Korrelasjonen mellom gjellens barrierestatus og vekt kunne ikke observeres i ferskvannsfasen, og ble også forstyrret ved operasjoner som tidligere påpekt i november og desember første høst i sjø. Imidlertid så man ved midtsommer 2017 at korrelasjonen styrket seg ($R=0.53$ til 0.75 for vanlig vekstdiett A og $R=0.58$ for funksjonell diett

B) og denne sammenhengen var sterkt signifikant ($p < 0.001$). Denne korrelasjonen svekket seg igjen mot slutten av produksjonssyklus (Feb 2018), muligens grunnet grundig fjerning av taperfisk fra merdene - fisk som var under 1.5 kg etter om lag 16 måneder i sjø, og som hadde gjennomgående lav barrierestatus ved alle målinger. Resultatene indikerer enten at fisk som hadde tilstrekkelig energi til å sette opp en effektiv immunrespons i gjellene også hadde bedre tilvekst, eller det motsatte at fisk med dårlig vekst og lav energetisk status ikke hadde krefter til å produsere en tilpasset immunrespons i møte med utfordringer. Funnene understøtter også en mulig endring i sammensetningen av mukus ved og etter overføring til sjøvann, men at sammensetningen uansett er svært avhengig av gjellenes barrierestatus. Det kan tyde på at overvåking av gjellenes mukus barrierestatus kan være en effektiv måte å objektivt predikere tilvekst og suksess i produksjonen i et kommersielt oppdrettsanlegg. Se også Vedlegg 5 og 6 for mer utdypende diskusjoner om en slik potensiell metodikk for prediksjon av fiskens vekst.

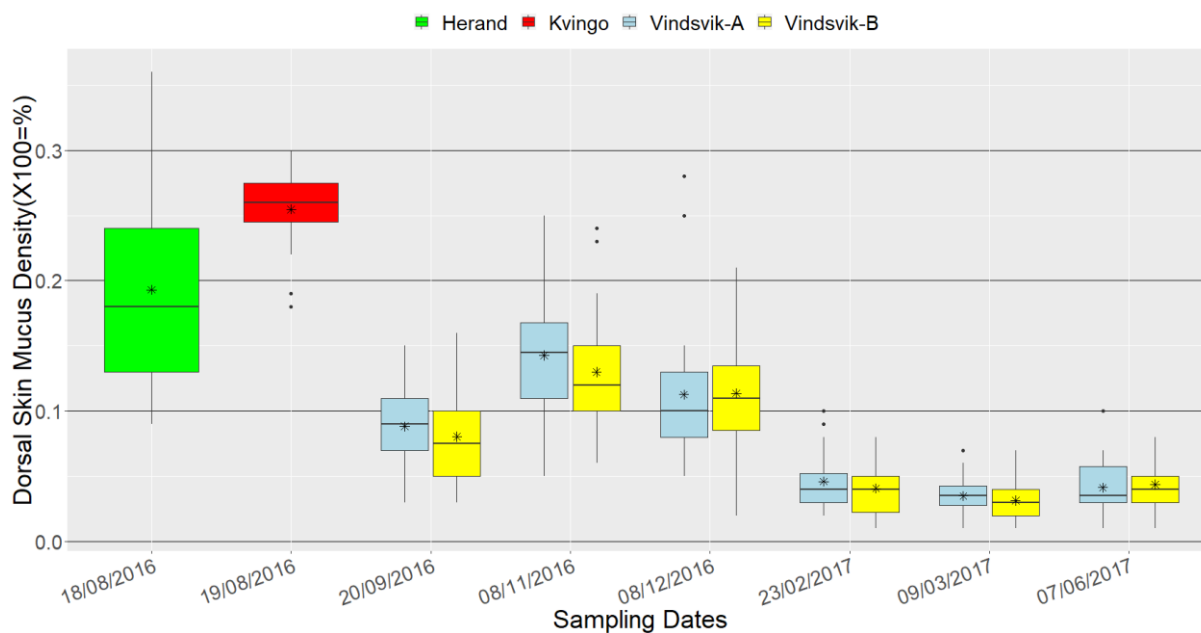
Hud/skinn:

Skinnets mukus cellestørrelse (u^2), tetthet (l % av gjelleepitel) og barrierestatus viser alle en reduksjon ved utsett i sjøvann, og eksempelvis observerer man en reduksjon i cellestørrelse fra 150-200 u^2 i ferskvann til mindre enn 125 u^2 i sjøvann (Fig. 13-15). Cellestørrelsen øker igjen til omlag 150 u^2 ved prøveuttak i november i samband med notskifter og notspyling ved lokalitet. Fra desember ser man imidlertid at størrelsen igjen går ned mot 120 u^2 nå med vesentlig individuell variasjon i målingene. Nedgangen i gjellenes barrierestyrke ved utsett i sjø støttes av tidligere funn (O'Byrne-Ring et al. 2003).



Figur 13: Skinnets mukus cellestørrelse (i μ^2). Standard vekstfôr indikeres med blå stolpe, mens verdier for gruppen som ble gitt en funksjonell diett angis med gule stolper. Alle merker sammenslått per diett.

Tettheten av mukus celler var høyest i ferskvann, hvor cellene fylte 20-25% av epitelet, hvoretter man ser en reduksjon etter utsett i sjøvann til under 10% (Fig. 14). Operasjoner som notskift og notspyling første høsten i sjøen gav en økning til om lag 10-15%, mens etter desember hvor flere håndteringer av fisken ble gjennomført (for eksempel avlusinger) ble tettheten av mukus celler redusert til så lavt som 5% gjennom vår og sommer 2017. Dette er lavere enn det som ble funnet på de respiratoriske overflatene i fiskens gjeller, og videre langt lavere det som i Quantidoc sin database anses å være normale verdier (ca. 20%).



Figur 14: Skinnets mukus tetthet (i % av gjelleepitel). Standard vekstfôr indikeres med blå stolpe, mens verdier for gruppen som ble gitt en funksjonell diett angis med gule stolper. Alle merder sammenslått per diett.

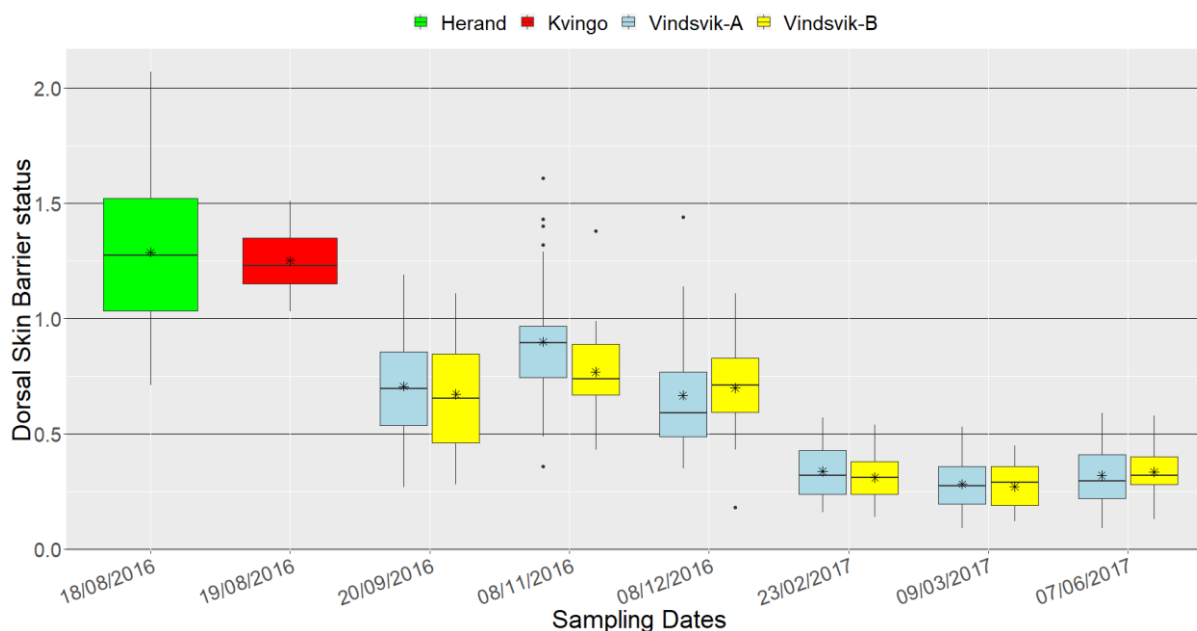
Skinnets barrierestatus var også på sitt høyeste i ferskvann (om lag 1.3) og man observerte en stadig nedgang etter utsett i sjø og etterhvert som produksjonssyklus skred frem, med laveste observerte verdi på 0.3 (Fig. 15). Dette indikerer en ganske tydelig kumulativ uttømming av skinnets naturlige barrierer, mest trolig grunnet operasjoner ved lokaliteten slik som trenging og både kjemisk og mekanisk avlusing. Selv om cellestørrelsen ble opprettholdt over 100 μ^2 , ser man at nedgangen i mukus celle tetthet driver nedgangen i barrierestatus. Et tydelig fall i barrierestatus mellom prøvetakingene i desember 2016 og februar 2017 skjer samtidig med behandling med hydrogen peroksid i helpresenning (alle merder). Etter denne behandlingen ser man faktisk at skinnets barrierestatus ikke blir restituert før fisken slaktes over et år senere. Siden målingene på cellenes tetthet i fiskeskin er uavhengig av tykkelsen på mukuslaget tyder disse observasjonene på en manglende evne i skinnets epitel (mucosa) til å generere tilstrekkelig mengde nye mukus celler, en evne som er ansett sentral for et funksjonelt innebygget immunsystem.

Transkriptomikk i hud/skin:

Analysene gjort i forsøket genererte store mengder data, som dog ble noe komplisert av individuell variasjon mellom behandlinger og merder, og grunnet den generelle nedgangen i barrierestatus over tid. Inngående detaljer om genetiske analyser og tolkning av disse kan ses i Vedlegg 5 og 6.

Indre barrierer (fortarm og baktarm):

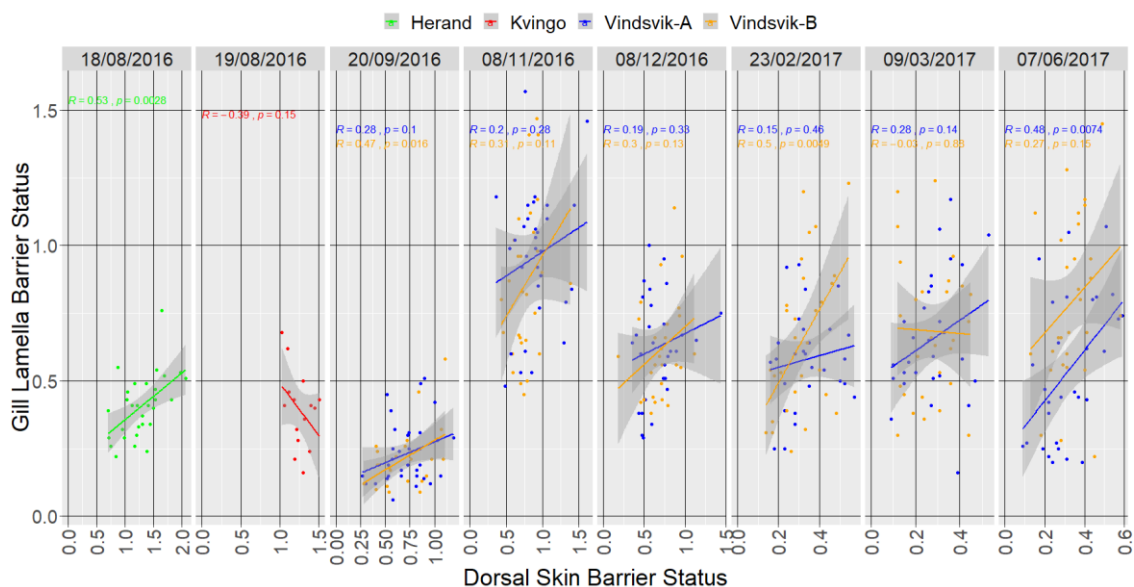
Det ble observert svært få effekter av funksjonell diett på laksens indre barrierer. Inngående resultater og tolkning av disse finnes i Vedlegg 5 og 6.



Figur 15: Skinnets barrierestatus. Standard vekstfôr indikeres med blå stolpe, mens verdier for gruppen som ble gitt en funksjonell diett angis med gule stolper. Alle merker er sammenslått per diett.

Korrelasjon mellom barrierestatus i ulike vev:

De to ytre barrierevevene (gjelle og skinn) viste en svak men positiv korrelasjon mellom deres respektive barrierestatuser gjennom forsøksperioden (Fig. 16). Dette kan indikere at disse vevene responderer prinsipielt likt til de utfordringer i fiskens miljø. Imidlertid tyder resultatene på at operasjoner som trenging og avlusing av fisk forårsaker uttømming av skinnets mukusreservoar i større grad enn gjellene. Skinnen viser også generell nedgang i barrierestatus fra utsett i sjø, og dette kan muligens ha sammenheng med ulike regenerative rater mellom disse to ytre barrierevevene, hvor gjellevev regenereres raskere enn skinn. Siden barrierestatusen til gjellene, men ikke skinnen, også er korrelert med fiskens tilvekst, kan observasjonene tyde på at evne til å sette opp en immunrespons i det respiratoriske organet er fordelaktig for hele organismen, og også relativt viktigere enn å evne den samme immunresponsen i skinnen.

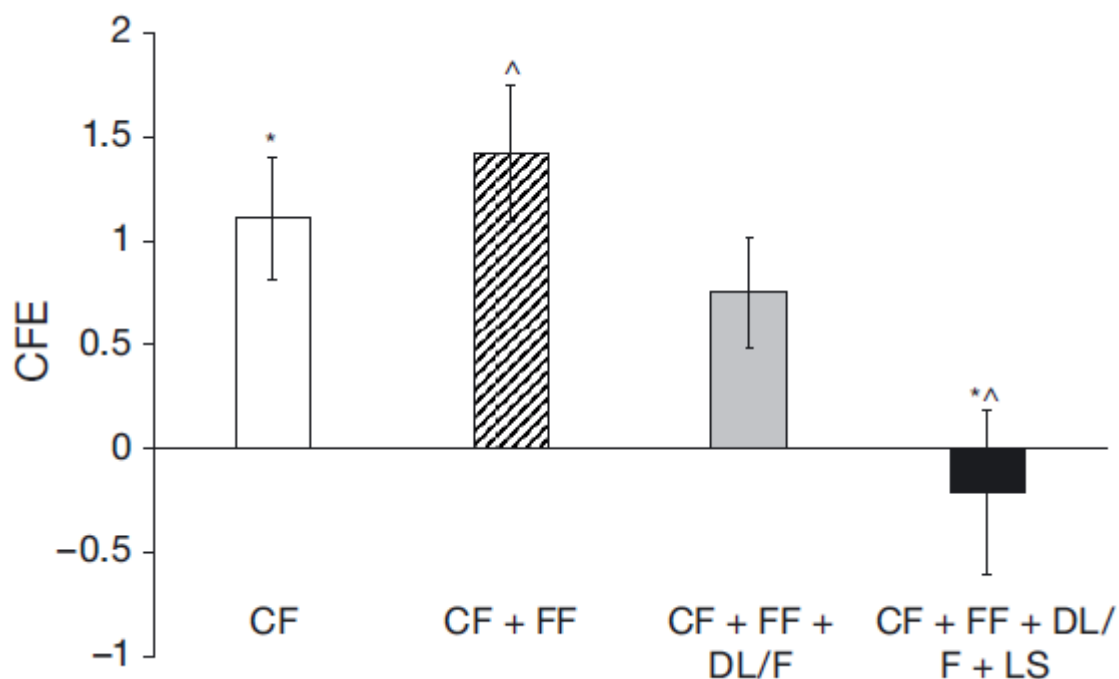


Figur 16: Korrelasjon mellom barrierestatus i gjeller og skinn fra ferskvannsfasen (august 2016) og gjennom sjøvannsfasen frem til våravlusing våren 2017 (n=60 fisk per gruppe per målepunkt).

5.6 Forebyggende tiltak og effekt på rensefisk

Forebyggende tiltak og påvirkning på rensefiskens effektivitet som lusespiser:

Grønngylt i merder med luseskjørt (gruppe D) var tilsynelatende de minst effektive lusespisere sammenlignet med fisk i øvrige forsøksgrupper, både ved henblikk på antall lus funnet ved analyse av mageinnhold og CFE («cleaner fish effect») (Fig. 17). Det ble observert lus i mageinnholdet for 11% av prøvetatt fisk uavhengig av forsøksgruppe. Gjennomsnittlig antall lus per mage var 0.3 (+/- 0.2), 0.9 (± 0.4), 1.8 (± 0.9), og 0.2 (± 0.0) for hhv. gruppe A, B, C og D. Den fulle statistiske modellen indikerte signifikant effekt av eksperimentell gruppe på mengde lus per mage. Post-hoc parvis testing viste at denne effekten primært var drevet av forskjeller mellom gruppe D og B ($z = 2.8$, $p = 0.001$) og mellom gruppe D og C ($z = 5.1$, $p < 0.0001$). Ved benyttelse av CFE-estimatet, antyder resultatene at den mest effektive rensefisken fantes i gruppe B med funksjonelle fôr som eneste forebyggende tiltak ved siden av rensefisk (gjennomsnitt \pm SE CFE = 1.4 ± 0.33). Der var ingen signifikant forskjell mellom kontrollgruppe A (CFE = 1.1 ± 0.3), gruppe C (CFE = 0.8 ± 0.26) og gruppe D (CFE = -0.2 ± 0.4) (Fig 17), selv om det åpenbart var en numerisk forskjell i gruppe D som den eneste gruppe med negativ CFE i gjennomsnitt. Sammenligning mellom full og reduserte statistiske modeller indikerer en effekt av forebyggende tiltak på rensefiskens effektivitet ($F = 5.1$, $p = 0.009$) og ingen effekt av prøvetakingsdato ($F = 2.6$, $p = 0.12$). Post-hoc parvise sammenligninger viser at effekten var drevet av forskjeller mellom både gruppe D og A ($p = 0,04$) og gruppe D og B ($p = 0.008$).



Figur 17: Estimert "rensefiskeffekt" (Cleaner fish effect (mean \pm SE), "CFE"), kalkulert som gjennomsnittlig predikert antall lus minus det faktisk observerte lus per gruppe (med antagelsen om at differansen er lus konsumert av rensefisk).

Rensefiskens mageinnhold:

Det mest vanlige funnet i magen til Grønngylten, uavhengig av forsøksgruppe, var fordøyd og ikke identifiserbar materiale (38%), alger (29%), andre krepsdyr (21%), lakselus (1.8%) og fôr (0.9%) (Fig. X). Ti prosent av de undersøkte magene var helt tomme. Krepsdyr, hovedsakelig amfipoder (*Caprellidae*), var 5 ganger mindre viktig bytte for rensefisken i gruppe B sammenlignet med gruppe D ($z = -3.6$, $p = 0.001$). Der var ingen andre forskjeller i mageinnhold mellom gruppene med ulike forebyggende tiltak. Totalt hadde 20% av

Grønngylten fiskeskjell i mageinnholdet, og forsøksgruppe hadde ingen påvirkning på prevalensen av fiskeskjell i mageinnholdet ($p = 0.4$).

Rensefiskens kondisjon:

De ulike forebyggende tiltakene hadde lik påvirkning på Grønngylten sin fysiske kondisjon. Kondisjon (målt ved K-verdi, C-score) var lik mellom forsøksgruppene med hensyn på fiskens vekt og lengde, samt status på finner ($p = 0.5$), hud ($p = 0.7$), øyner ($p = 0.8$) og snute ($p = 0.6$). Skader på gjelle og gjellelokk ble sjelden observert og hadde for lav prevalens (hhv. 19 og 12 funn) til fornuftige statistiske analyser. Finneskader var et vanlig funn for Grønngylten (75% prevalens), etterfulgt av hudslitasje/skade (28% prevalens), skader på øyet (13% prevalens), skader på gjellelokk (4% prevalens) og snuteskade (3% prevalens).

Rensefiskens adferd:

Det ble ikke observert forskjeller i Grønngylten sin adferd mellom gruppene (adferd; spiser lus, $p = 0.3$; inspeksjon av laks, $p = 0.3$; svømmer nær laks, $p = 0.4$; beiting (ikke lus), $p = 0.6$; unnviker laks, for lav prevalens for statistisk behandling). Den vanligste adferden, uavhengig av forsøksgruppe, etter 10 timer analysert video var «svømmer nær laks» (89 observasjoner), «beiting (ikke lus)» (45 observasjoner), «inspeksjon av laks» (25 observasjoner), «unnviker laks» (8 observasjoner) og «beiting på lus» (6 observasjoner).

6.0 Hovedfunn og anbefalinger

6.1 Hovedfunn oppsummert

- Forsøksgruppen med alle forebyggende tiltak (D) akkumulerte signifikant lavere påslag av lus over tid sammenlignet med kontrollgruppen (A), dog med betydelig sesongmessig variasjon.
- Til tross for signifikant lavere påslag kunne ikke redusert behandlingsfrekvens påvises sammenlignet med kontrollgruppen. Mulige forklaringer for dette kan være internsmitte ved anlegget og miljøfaktorer (for eksempel langvarig tilstedeværelse av et dypt brakkvannslag ved lokaliteten).
- Forebyggende tiltak medførte ikke svekket fiskevelferd sammenlignet med kontrollgruppen.
- Bruk av forebyggende tiltak kan påvirke fiskens svømmedyp, og grupper med tiltak som dypfôring og dype lys svømte i snitt $>6\text{m}$ dypere enn kontrollgruppen.
- Avstand fra lokalitetens haloklin kan være like viktig som fiskens svømmedyp per se, siden lakselus har evne til å tilpasse sin adferd etter salinitet.
- Det finnes indikasjoner på at forebyggende tiltak, og spesielt for gruppen som benyttet alle forebyggende tiltak i kombinasjon (D), kan forstyrre rensefiskens beiteeffekt. Dette følges opp i videre studier ved HI, finansiert av CAC.
- Funksjonelle fôr (gruppe B) brukt over lengre perioder hadde i denne studien ikke påviselig effekt som forebyggende tiltak mot lakselus alene, sammenlignet med kontrollgruppen (gruppe A). Resultatet kan ha blitt påvirket av merdenes plassering internt i anlegget. De funksjonelle fôrene resulterte ikke i biologisk signifikante forskjeller i fiskens barrierevev sammenlignet med kontrollgruppe-fôret med standard høyenergi vekstfôr.
- Operasjoner ved anlegg, slik som notskift og avlusinger, spesielt med hydrogen peroksid, resulterte i svekkelse av fiskens ytre barrierer over tid, spesielt synlig for de ytre barrierer (hud og gjeller).
- Gjellens barrierestatus trekkes frem som mulig prediktiv indikator for fiskens tilvekst, eller potensiale for tilvekst. Dette følges opp i videre studier av Quantidoc og UiB.

6.2 Anbefalinger

- For å maksimere muligheten for å omsette et oppnådd lavere lusepåslag i færre avlusinger, gjennom å unngå at internsmitte i ubeskyttede merder bygges opp, bør forebyggende strategier utarbeides og implementeres på anleggsnivå (alle merder).
- Dersom funksjonelle dietter skal benyttes som forebyggende tiltak bør dette gjøres i kombinasjon med andre forebyggende verktøy.
- Grønngylt bør ikke benyttes sammen med de forebyggende tiltakene som var implementert i gruppe D, spesielt luseskjørt. Grønngylten var ikke en særlig effektiv lusespiser i noen grupper, og nøye vurderinger bør gjennomføres av den enkelte oppdretter om forsvarligheten med å bruke Grønngylt til biologisk lusekontroll.
- Resultatene i denne studien antyder at miljøforholdene ved lokaliteten er viktige for suksessen til en forebyggende strategi. Spesielt fiskens avstand fra en eventuell haloklin kan være avgjørende, og dersom fisken svømmer nært haloklinen kan dette medføre at de forebyggende tiltakene virker mot sin hensikt. Dette bør inkluderes i planene for bruk av forebyggende tiltak, og ved langvarige og dype brakkvannslag på lokalitet bør man endre hvilke forebyggende tiltak som er i bruk (for eksempel unngå bruk av skjørt i slike perioder for å sikre at fisken maksimerer avstand fra haloklinen). Dette vil følges opp i videre studier ved CAC.
- Både operasjoner som notskift og notspyling påvirker fiskens barrierevev. Dette understøtter tidligere anbefalinger om å unngå eller sterkt redusere in-situ spyling av begrodde nøter i sjø, eller notskifte operasjoner på særlig begrodde nøter.
- Behandling med hydrogen peroksid bidrar til at fiskens skinn tørker ut, og dermed blir mindre motstandsdyktig mot eksterne stressorer, og mindre i stand til å sette opp en forholdsvis immunrespons mot slike stressorer (for eksempel påslag av lus). Oppdretter bør nøye vurdere bruken av hydrogen peroksid opp mot tidspunkt i produksjonssyklus og sannsynlige lusepåslag i kommende tid etter behandling.

7.0 Leveranser

- Referat oppstartsmøte: 01.09.16
- Referat styringsgruppe: 10.11.16
- Referat prosjektgruppemøte: 10.11.16
- Referat styringsgruppe: 17.02.17
- Referat prosjektgruppemøte: 17.02.17
- Referat prosjektgruppemøte: 08.06.17
- Referat styringsgruppemøte: 09.06.17
- Status / halveisrapport: 30.06.17
- Faktaark, anbefalinger for bruk av forebyggende tiltak: 30.06.17
- Referat styringsgruppe: 12.09.17
- Referat prosjektgruppemøte: 14.09.17
- Referat oppsummeringsmøte: 25.05.18
- Faglig sluttrapport: 31.12.20
- Vitenskapelige publikasjoner:
 - Bui, S., Oppedal, F., Nilsson, J., Oldham, T., Stien, L. 2019. Summary and status of deep lights and deep feed use in commercial settings: welfare, behaviour and infestation at three case study sites - End report from the FHF project 901154 "Dypelysogfôring". Rapport fra Havforskningen 2019-4. 33p.
 - Bui, S., Stien, L. Nilsson, J., Oppedal, F., 2018. Assessment of long-term implementation of sea lice prevention technologies: efficiency in reducing infestations and impact on fish welfare. Rapport fra Havforskningen 45-2018. 38s.
 - Bui, S., Stien, L., Nilsson, J., Trengereid, H., Oppedal, F., 2020. Efficiency and welfare impact of long-term simultaneous in situ management strategies for

- salmon louse reduction in commercial sea cages. *Aquaculture*. Vol 520 (2020), 734934.
- Gentry, K., Bui, S., Oppedal, F., Dempster, T., 2020. Sea lice prevention strategies affect cleaner fish delousing efficacy in commercial Atlantic salmon sea cages. *Aquaculture Environment Interactions*. Vol 12: 67-80, 2020.
 - Pittman K., Okubamichael M., Merkin G.V., Sissener N.H., Olsvik, P., Jensen L., Girons A., Trengereid H., Myre O.J. Manuscript under final revision, to be submitted in 2020. Quantitative mucosal mapping of skin, gills and intestines and transcriptomics of skin and gills in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* throughout a commercial scale production cycle: Routine procedures impact mucosal health and override potential effects of feed.
 - Presentasjoner av vitenskapelig arbeid:
 - Bui, S., Trengereid, H., Oppedal, F. (2017) EFFICIENCY OF SEA LICE PREVENTION TECHNOLOGIES IN A COMMERCIAL SETTING: SALMON WELFARE, INFESTATION LEVELS, AND TREATMENT FREQUENCIES. *Aquaculture Europe*, Dubrovnik, Croatia. 19.10.17
 - Trengereid, H. (2018) Lakselus: Medikamentfri kontroll ved kombinerte tiltak (FHF prosjekt: 901243). Presentasjon FHF Nasjonal konferanse på forebygging og kontroll av lakselus. Trondheim, 23.01.18
 - Bui, S., Trengereid, H., Stien, LH., Oppedal, F. (2018) EFFECT OF LICE PREVENTION TECHNOLOGIES ON SALMON WELFARE AND INFECTION STATUS. *ISAAC*, Charlottetown, Canada. 03.09.18
 - Oppedal et al. (2018). Examples of alternative preventative methods on sealice control. Workshop Non-Medicinal control, SEALICE 2018, Dream hotel, Punta Arenas, 5-9 November 2018.
 - Bui, S., Trengereid, H., Stien, LH., Oppedal, F. (2019) Use of deep lights and feeding, and skirts for lice infestation prevention. FHF Lusekonferanse, Trondheim. 21.01.19
 - Oppedal et al. (2019) Lakselusa - når og hvor? FHF's lusekonferanse 2019 Trondheim 21-23 Januar 2019
 - Oppedal et al. (2019) Laksevelferd med skjørt, snorkel eller nedsenking. Frisk fisk 2019, Tromsø 6-7 Februar 2019
 - Oppedal, F., (2019) Hvorfor bry seg om fiskevelferd? Hvordan skille laks og lus med ny teknologi på fiskens premisser. Teknas Havbrukskonferanse 2019, Ørnen hotel, Bergen 13.11.19.

8.0 Vedlegg

- Vedlegg 1: Prosjektregnskap
- Vedlegg 2: Revisorgodkjenning av prosjektregnskap
- Vedlegg 3: Vitenskapelig publikasjon 1, Bui et al. 2020
- Vedlegg 4: Vitenskapelig publikasjon 2, Gentry et al. 2020
- Vedlegg 5: Vitenskapelig publikasjon 3, Pittman et al. 2020. Executive summary legges ved, publikasjonen er sendt inn og er under vurdering.
- Vedlegg 6: Quantidoc sluttrapport vedrørende funksjonelle fôr og påvirkning på de ytre barrierer