

## Eksperimentelle studier av aluminiumstoksisitet på *Gyrodactylus salaris*

*Sigurd Hytterød*  
*Kjetil Olstad*





Veterinærinstituttets rapportserie · 6 - 2010

**Tittel**

Eksperimentelle studier av aluminiumstoksisitet på *Gyrodactylus salaris*

**Publisert av**

Veterinærinstituttet · Pb. 750 Sentrum · 0106 Oslo

**Form omslag:** Graf AS

**Forsidefoto:** Histologisk snitt av *Gyrodactylus salaris* farget med Solochrome azurine etter eksponering for Al i 19 timer ved 0-2 °C, 100x forstørrelse.

**Foto:** Kjetil Olstad

**Bestilling**

kommunikasjon@vetinst.no

Faks: + 47 23 21 60 01

Tel: + 47 23 21 63 66

ISSN 1890-3290 elektronisk utgave

**Forslag til sitering:**

Hytterød S, Olstad K. Eksperimentelle studier av aluminiumstoksisitet på *Gyrodactylus salaris*. Veterinærinstituttets rapportserie 6-2010. Oslo: Veterinærinstituttet; 2010.

© Veterinærinstituttet

Kopiering tillatt når Veterinærinstituttet gjengis som kilde



Veterinærinstituttets rapportserie  
*National Veterinary Institute's Report Series*  
**Rapport 6 · 2010**

Ekperimentelle studier  
av aluminiumstoksisitet  
på *Gyrodactylus salaris*

*Forfattere*

*Sigurd Hytterød*

*Kjetil Olstad*

*Oppdragsgiver*

*Direktoratet for naturforvaltning*

*30. mars 2010*

*ISSN 1890-3290 elektronisk utgave*



**Veterinærinstituttet**  
*National Veterinary Institute*

## Forord

Lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* er ansett som en av de største truslene mot norsk Atlantisk laks (*Salmo salar*). Norske myndigheter ved Direktoratet for naturforvaltning (DN) har som et høyt prioritert mål å motarbeide spredning av parasitten, og om mulig å utrydde den fra de områdene hvor den allerede er etablert.

Veterinærinstituttet (VI) har i følge DN-notatet "Organisering av arbeidet med *Gyrodactylus*-bekjempelse" datert 15. juni 2007, et stort ansvar for bekjempelse av *G. salaris* i norske laksevassdrag. I tillegg til totalansvaret for kartlegging, planlegging og gjennomføring av kjemiske behandlinger er videreutvikling av behandlingsmetodikk en sentral oppgave for instituttet. I følge notatet skal VI sammen med Norsk institutt for vannforskning (NIVA) videreutvikle kombinasjonsmetoden, der aluminiumsulfat (AIS) brukes i kombinasjon med rotenon, som behandlingsform.

AIS ble lansert som kjemikalium i arbeidet med bekjempelse av *G. salaris* i 2003 og det har foregått en betydelig kunnskapsbasert utvikling for logistikk, doseringsteknikk og konsentrasjonsoptimalisering. Det har imidlertid vært viet lite oppmerksomhet til problemstillinger knyttet til virkningsmekanismer for aluminium (Al) på de påvirkede organismene. Dette prosjektet har bestått av tre separate forsøk som alle er relatert til virkningen av Al på *G. salaris*. Prosjektet er gjennomført på oppdrag fra, og finansiert av DN, og har hatt som mål å bidra til videreutvikling av AIS-metoden som bekjempelsesmetode mot *G. salaris*.

Alle eksperimentene er gjennomført i forsøksdyravdelingen Fellesakvariet NVH/VI ved VI i Oslo, etter godkjenning fra Forsøksdyrutvalget.

## Innhold

Forord .....	4
Innhold .....	5
Sammendrag .....	6
Summary .....	6
1. Innledning .....	7
2. Effekt av Al på <i>G. salaris</i> - dør parasitten som følge av eksponering for surt Al- holdig vann? .....	8
2.1. Problemstilling .....	8
2.2. Metodikk .....	8
2.3. Resultater .....	9
2.4. Diskusjon, dødelighet .....	10
3. Utvikling av toleranse/resistens for AIS-behandling ved gjentatte eksponeringer for subletale doser med giftig Al .....	11
3.1. Problemstilling .....	11
3.2. Metodikk .....	11
3.3. Resultater .....	14
3.4. Diskusjon resistens .....	17
4. Virkningsmekanismer på <i>G. salaris</i> ved eksponering for surt Al-holdig vann; overflateeffekt vs internalisering .....	17
4.1. Problemstilling .....	17
4.2. Metodikk .....	17
4.3. Resultater .....	18
4.4. Diskusjon .....	19
5. Forsøkene relevans for kjemisk behandling mot <i>G. salaris</i> i norske laksevassdrag .....	20
6. Referanser .....	21

## Sammendrag

Det har lenge vært kjent at lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* forsvinner fra Atlantisk laks (*Salmo salar*) når moderate konsentrasjoner av aluminium (Al) tilsettes til vannet. Siden 2001 har denne effekten blitt bekreftet gjennom laboratorietester og behandlinger med aluminiumsulfat (AIS) i store vassdrag. Allikevel står en del sentrale spørsmål foreløpig ubesvart, herunder enkelte problemstillinger relatert til virkningsmekanismer for Al: har kjemikaliet direkte virkning på parasitten, og dør den således direkte som følge av eksponering for surt Al-holdig vann, eller påvirkes den indirekte via vertens respons på eksponeringen? Kan *G. salaris* utvikle økt toleranse for Al-eksponering eller resistens mot kjemikaliet? Binder Al seg til overflaten hos *G. salaris* og/eller tas det opp i organismen? Kunnskap om disse mekanismene vil være verdifull for fremtidig valg av behandlingsstrategi ved bruk av AIS-metoden.

Resultater fra tidligere undersøkelser antyder at parasitten faktisk dør som en direkte effekt av eksponering. Dette støttes av resultater fra forsøk i denne rapporten og anses å være avgjørende for AIS-metodens egnethet i forhold til målsetning om utryddelse av *G. salaris*. Når det gjelder utvikling av resistens, ble det ikke funnet støtte for en slik hypotese. Dette forsøket ble imidlertid noe redusert som følge av uforutsette vannkjemiske endringer i driftsvannet som leveres til forsøksakvariet. Når det gjelder Al-virkningsmekanismer, indikerer resultatene at Al binder seg til overflaten på parasitten, men at metallionet ikke tas opp i organismen. I diskusjonen påpekes problemstillinger som bør belyses nærmere samt potensielle metodiske forbedringer som bør vurderes ved fremtidige arbeider med disse problemstillingene.

## Summary

The monogenean ectoparasite *Gyrodactylus salaris* is effectively removed from the host, Atlantic salmon (*Salmo salar*) when small amount of aqueous aluminium is added to the water. This effect is well documented in experimental studies as well as in treatment of natural river systems with aluminium sulphate (AIS). Several problems are still waiting to be addressed, including questions related to the toxic mechanisms of aqueous Al on *G. salaris*: Is there an effect from Al killing the parasite directly, or do Al trigger an immune response in the fish causing secondary effects on *G. salaris* infections? Another hypothesis to be tested is the possibility in *G. salaris* populations to develop increased tolerance/resistance to aqueous Al when exposed to sub lethal chemical doses. The last question addressed in this project was related to binding mechanisms of aqueous Al on *G. salaris*; does Al bind to the outer surface of the parasite or is there an effect due to Al entering the organism, affecting the internal environment of the animal?

These are all essential questions to be answered developing the AIS-method in the battle against *G. salaris* in Norwegian salmon rivers. The aim of this project has been to investigate the mechanisms leading to elimination of *G. salaris* when exposed to aqueous Al. Previous studies indicate a direct effect from Al after exposure to acidic aluminium-rich water. Results published in this report support the direct-effect theory. These findings are considered crucial knowledge supporting future use of AIS in chemical treatment against *G. salaris*.

The resistance theory is not supported by results in this study. However, these findings should be considered quite uncertain due to unstable water chemical conditions, negatively affecting the population of *G. salaris*. Results from the final experiment indicate a surface-effect from Al after binding to the tegument of the parasite rather than internalization. However, there are several methodical improvements to be done before any unambiguous conclusion can be drawn.

## 1. Innledning

Det har lenge vært kjent at lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* forsvinner fra atlantisk laks (*Salmo salar*) når moderate konsentrasjoner av aluminium (Al) tilsettes til vannet (Soleng mfl. 1999, Poléo mfl. 2004). At effekten er betydelig sterkere på *G. salaris* enn på verten gjør Al til et potensielt middel i kampen mot parasitten. Siden 2001 har denne effekten blitt bekreftet gjennom laboratorietester og behandlinger i store vassdrag med aluminiumsulfat (AIS). Ved behandling refereres det gjerne i denne sammenhengen til AIS-metoden eller kombinasjonsmetoden (ved bruk av rotenon i perifere deler av vassdraget). I løpet av disse årene har det skjedd en betydelig kunnskapsbasert utvikling i alt fra logistikk og doseringsteknikk til konsentrasjonsoptimalisering. Allikevel står en del sentrale spørsmål foreløpig ubesvart, herunder enkelte problemstillinger relatert til virkningsmekanismer for Al på de påvirkede organismene. Det er blant annet ikke dokumentert hvorvidt kjemikaliet har direkte virkning på parasitten og at den således dør direkte som følge av eksponering for surt Al-holdig vann, eller om den påvirkes indirekte via vertens respons på eksponeringen. Dermed er selve årsaken til at *G. salaris* fjernes fra laks ved eksponering for surt Al-holdig vann ukjent. Kunnskap om disse mekanismene vil være verdifull for fremtidig valg av behandlingsstrategi ved bruk av AIS-/kombinasjonsmetoden. Hvorvidt parasitten dør som følge av eksponering, enten direkte eller indirekte, anses som vesentlig dokumentasjon når egnetheten til AIS-behandling som utryddelsesmetode skal vurderes.

Det er ikke kjent om populasjoner av *G. salaris* kan utvikle økt toleranse for Al-eksponering eller resistens mot kjemikaliet. Problemstillingen er imidlertid svært relevant i forbindelse med bekjempelse av *G. salaris* ved bruk av AIS-metoden. Dagens strategi er basert på 10-14 dagers behandlinger som repeteres etter opphold på 6-12 måneder (brukt i Lærdalselva). Strategien gir mulighet for at enkeltindivider av *G. salaris* kan bli eksponert for subletale doser av Al. Populasjoner med utspring fra disse individene vil dermed bli eksponert for Al flere ganger. Ved utryddelsestiltak som gjennomføres som gjentatte AIS-behandlinger er det derfor essensielt å ha kunnskap om eventuell toleranseutvikling i forbindelse med fastsettelse av riktig Al-konsentrasjon ved behandling.

Fysiologien til *G. salaris* er lite studert og det er derfor vanskelig å vurdere hvilke fysiologiske prosesser som eventuelt påvirkes når organismen eksponeres for Al. Tegumentet (hudoverflaten) til artsfrenden *Gyrodactylus derjavinoidea*, omtalt av forfatterne som *Gyrodactylus derjavini*, er imidlertid beskrevet å bestå av blant annet galaktosederivater og glykoproteiner (Buchmann 1998). Dette er komponenter som også finnes i slimlaget rundt fiskegjeller (Wold & Selset 1977) og som danner negative bindingssteder der positivt ladd Al kan binde seg (Exley mfl. 1996). Basert på kunnskap om de kjemiske egenskapene til Al i vann, binding av Al til fiskegjeller, samt oppbygningen av tegumentet til Gyrodactylider, er det grunn til å fremme hypotesen om at Al binder seg til overflaten hos *G. salaris*.

Målet med prosjektet har vært å undersøke virkningen av Al på *G. salaris*. Det har også vært et mål å se nærmere på hvilke mekanismer som forårsaker den observerte effekten; nemlig at *G. salaris* fjernes fra laks ved Al-eksponering. Kunnskap om virkningen av metallet og mekanismene på parasitten anses som viktig for videreutvikling av kjemiske behandlinger der aluminiumsulfat (AIS) brukes som hovedkjemikalium. Det er grunn til å hevde at dødelighet hos *G. salaris* som følge av eksponering for Al faktisk er en forutsetning for å kunne utrydde parasitten fra norske laksevassdrag med AIS-metoden. Det har vært et mål å belyse disse problemstillingene ved å ta utgangspunkt i en arbeidshypotese med bakgrunn i antagelsen om at Al har en direkte effekt på parasitten.

Prosjektet har vært delt opp i tre arbeidspakker som følger:

**1: Effekt av Al på *G. salaris* - dør parasitten som følge av eksponering for surt Al-holdig vann?**

Problemstillingen ble adressert gjennom et eksperimentelt oppsett i forsøksakvarium med formål å undersøke om parasitten dør ved eksponering for surt Al-holdig vann. Dette inkluderte også studier av effekter ved forskjellige Al-konsentrasjoner og eksponeringstider ved forskjellig temperatur.

**2: Utvikling av toleranse/resistens for AIS-behandling ved gjentatte subletale eksponeringer for surt Al-holdig vann**

Problemstillingen ble belyst gjennom et eksperimentelt oppsett i forsøksakvarium med formål å undersøke om gjentatte subletale eksponeringer for Al-holdig vann påvirker parasittens toleranse for den kjemiske behandlingen.



### 3: Fysiologiske virkningsmekanismer ved eksponering for surt Al-holdig vann: overflateeffekt vs internalisering

Denne problemstillingen ble belyst gjennom en kombinasjon av eksperimentelt oppsett og prøvetaking under AIS-behandling i elv, med formål å undersøke eventuelle virkningsmekanismer som følge av at Al enten binder seg til overflaten hos *G. salaris* og/eller tas opp i organismen.

Problemstilling, metoder og resultater fra de tre arbeidspakkene blir presentert separat i denne rapporten. Resultatene og deres samlede betydning for AIS som behandlingsmiddel mot *G. salaris* diskuteres deretter samlet.

## 2. Effekt av Al på *G. salaris* - dør parasitten som følge av eksponering for surt Al-holdig vann?

### 2.1. Problemstilling

Hvorfor *G. salaris* fjernes fra laks ved Al-tilsetning er et ubesvart spørsmål. Likeså er det ikke dokumentert at parasitten dør som følge av eksponeringen. Studier indikerer imidlertid at Al virker direkte på *G. salaris* (Grimsmo 2001). En alternativ teori ville være at parasitten påvirkes indirekte ved at Al utløser en immunrespons hos verten, som samtidig virker på *G. salaris*. Disse problemstillingene er forsøkt belyst gjennom et eksperimentelt forsøk med utgangspunkt i arbeidshypotesen om at Al har en direkte effekt på parasitten.

### 2.2. Metodikk

Eksperimentet ble gjennomført som et overlevelsesforsøk for *G. salaris in vitro* (uten tilstedeværelse av vert) med forskjellige konsentrasjoner av Al i vann som medium.



Figur 1: Venstre: 96 brønners mikrotiterplate samt 0,3 - 3  $\mu$ l mikropipette. Høyre: Undersøkelse av enkeltindivider av *G. salaris* under stereolupe.



Fisk infisert med *G. salaris* ble samlet inn fra Lierelva ved hjelp av elektrisk fiskeapparat, og transportert til forsøksdyravdelingen ved Veterinærinstituttet i Oslo. Selve forsøket startet med at levende enkeltindivider av *G. salaris* ble overført til brønner i mikrotiterplater ved hjelp av mikropipette (Figur 1). Surgjort Al-løsning ble deretter applisert til totalt volum på 50 µl i alle brønner hvor levende parasitter var observert. Al-holdig vann ble laget ved tilsetning av aluminiumsulfat (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) til driftsvann surgjort med svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) til pH = 5.8. I forsøket ble det brukt tre konsentrasjoner av tilsatt Al: 0 (kontroll), 200 og 400 µg Al/l. I tillegg ble det satt opp en repetisjon med eksponering for surgjort vann, pH=5,8 uten tilsatt Al (som sur kontroll). For totalt eksperimentelt oppsett, se Tabell 1. Umiddelbart etter applisering av eksponeringsvannet ble hver enkelt *G. salaris* undersøkt ved hjelp av stereolupe. Med bevegelse og kroppsfasong som kriterier ble parasittene kategorisert på tre nivåer, levende (L), moribunde (M) og døde (D) (jmfør metodikk beskrevet i Olstad mfl. 2006). Observasjon av parasittene ble gjort ved utvalgte tidspunkt frem til alle i gruppen var døde. Serien med tre konsentrasjoner (0, 200 og 400 µg Al/l) ble satt opp i to repetisjoner: en som ble oppbevart og kontrollert ved 15 °C og en som ble oppbevart og kontrollert ved 3 °C i en skål med isvann.

**Tabell 1:** Eksperimentelt oppsett for eksponering av enkeltindivider av parasitten *G. salaris* uten tilstedeværelse av vert (*in vitro*). Al-konsentrasjon i µg/l, temperatur, pH og antall eksponerte parasitter er oppgitt for hver gruppe.

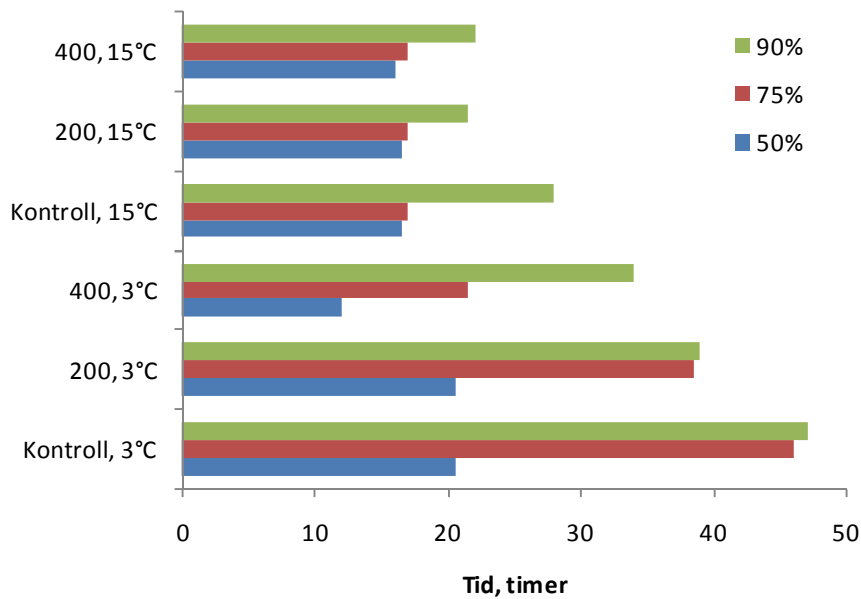
Gruppe	Al-kons. (µg/l)	Temp. (°C)	pH (-log[H <sup>+</sup> ])	n
Kontroll ved 3 °C	0	3	7,9	40
Al-200 µg/l ved 3 °C is	200	3	5,8	48
Al-400 µg/l ved 3 °C	400	3	5,8	57
Sur kontroll ved 3 °C	0	3	5,8	42
Kontroll ved 15 °C	0	15	7,9	45
Al-200 µg/l ved 15 °C	200	15	5,8	57
Al-400 µg/l ved 15 °C	400	15	5,8	84

Dødelighet i de forskjellige gruppene fremstilles numerisk som tid til henholdsvis 50, 75 og 90 % av individene i gruppen var døde. I tilfeller hvor dette tidspunktet ikke sammenfalt med tidspunkt for observasjon, fremkom tiden ved ekstrapolering mellom to observasjonstidspunkt.

## 2.3. Resultater

Resultatene er oppsummert i Figur 2. Ved 15 °C var det ingen forskjell i tid frem til 50 og 75 % av individene i gruppene var døde. Forskjeller mellom kontrollgruppen og de to Al-eksponerte gruppene fremkommer allikevel sent i forløpet ved at det tok lenger tid før kontrollgruppen var redusert med 90 %.

Blant gruppene som ble oppbevart og kontrollert på is ved 3 °C var det større forskjeller mellom Al-eksponerte grupper og kontroll, der trenden var at overlevelsen ble redusert med økende konsentrasjon av Al. Unntaket var manglende forskjell i tid til 50 % død mellom kontrollgruppen og gruppen som var eksponert for 200 µg Al/l.



**Figur 2:** Tidspunkt for henholdsvis 50, 75 og 90 % død i grupper eksponert for 3 forskjellige konsentrasjoner (0, 200 og 400 µg/l), og ved to temperaturer, 3 °C og 15 °C.

## 2.4. Diskusjon, dødelighet

Resultater fra forsøket der overlevelsen til *G. salaris* eksponert for surt Al-holdig vann ble testet, indikerer at vann tilsatt Al reduserer overlevelsen til parasitten. Det var generelt høyere dødelighet i gruppen som ble eksponert for vann tilsatt 400 µg Al/l enn i gruppen som ble holdt i driftsvann uten Al-tilsetning. Ved tilsetning av 200 µg Al/l var det også en redusert overlevelse i forhold til kontrollgruppen, men ikke like utvetydig. Basert på utfordringer knyttet til eksperimentell design, redegjort for i neste avsnitt, bør resultatene tolkes med forsiktighet. Redusert levetid for *G. salaris* i vann tilsatt Al sammenlignet med kontrollgruppen gir imidlertid støtte til hypotesen om at Al-holdig vann dreper parasitten direkte.

Gjennom arbeid med dette forsøket, har det vist seg som en utfordring å lage gode eksperimentelle oppsett for testing av virkningsmekanismer til Al på *G. salaris*. Når parasitten sitter festet til en laks vil nemlig interaksjoner mellom vert og parasitt kunne påvirke og maskere effekter som i virkeligheten skyldes endringer i det ytre miljøet, for eksempel endring i vannkvalitet. For testing av Al med hensyn på direkte/indirekte effekt ble det derfor vurdert som nødvendig å isolere *G. salaris* fra laks og dermed eliminere effekten av eventuelle vertsrespons som følge av Al-eksponeringen. Levedyktigheten til parasitten er imidlertid svært avhengig av at den sitter festet til en mottakelig vert. I tillegg er overlevelse ved fravær av vert i stor grad avhengig av vanntemperatur, ved at overlevelse øker dramatisk ved lave temperaturer (Olstad mfl. 2006). Med visshet om redusert overlevelse ved isolering fra laks, ble en strategi med eksponering for relativt høy Al-konsentrasjon ved lav temperatur valgt i forsøk på å skille eventuell Al-indusert dødelighet fra bakgrunnsdødelighet. Resultatene indikerer også at det var større forskjell i dødelighet mellom kontrollgruppe og Al-eksponert gruppe ved lav- sammenlignet med ved høy temperatur. Disse resultatene er fristende å sette i kontekst av forskjeller i giftighet til Al ved lav og høy temperatur. Det kan imidlertid ikke utelukkes at resultatene skyldes forhøyet bakgrunnsdødelighet ved 15 °C. Ytterligere undersøkelser anbefales for å kunne konkludere angående en slik hypotese, spesielt på bakgrunn av de svært ulike kjemiske forutsetningene ved lav kontra høy temperatur i disse eksperimentene.

De kjemiske egenskapene til Al i vann er godt studert i forbindelse med forskning på sur nedbør og effekter på fisk i forsurede vassdrag (Driscoll mfl. 1980, Lydersen 1991). Det er også godt dokumentert at forhøyede konsentrasjoner av Al i surt vann har negativ effekt på andre akvatiske organismer (Gensemer & Playle 1999). Effekten til metallet er imidlertid avhengig av hvilke tilstandsformer av Al som foreligger (Poléo mfl. 1995, Gensemer & Playle 1999). Sammen med blant annet pH og tilgjengelige ligander, som

for eksempel organisk materiale, er temperaturen i vannet en bestemmende faktor for hvor mye Al som foreligger på giftig form til en hver tid (Lydersen mfl. 1990). En økning i pH eller temperatur kan føre til at giftig Al omdannes til ikke giftige Al-tilstandsformer, en prosess som vil pågå helt til alt Al feller ut av løsning. I forsøk der gifteffekten fra Al skal undersøkes bør derfor fremtidige forsøksoppsett bestå av et åpent system med kontinuerlig vanngjennomstrømning slik at giftigheten til metallet holdes stabil. Strømmende vann, kombinert med mulighet for kontinuerlig oppsyn med isolerte enkeltindivider av *G. salaris*, ble imidlertid ansett som svært usikker metodikk med hensyn på praktisk gjennomføring. Studier av isolerte parasitter i stillestående vann er derimot dokumentert å fungere fint (Olstad mfl. 2006), og ble valgt som metode til tross for potensiell toksisitetsreduksjon av Al. Det kan derfor ikke utelukkes at effekten fra Al på *G. salaris* ble redusert som følge av forsøksbetingelsene.

Metodiske utfordringer nevnt ovenfor gjør det vanskelig å konkludere utvetydig angående hypotesen om at *G. salaris* dør direkte som følge av Al-eksponering på bakgrunn av resultater fra dette forsøket. Resultatene viser imidlertid at Al-holdig vann reduserer levetiden til parasitten, og er således en indikasjon på at *G. salaris* dør direkte som følge av eksponeringen. På bakgrunn av nevnte metodeutfordringer foreslås det at problemstillingen også belyses gjennom forsøk der *G. salaris* eksponeres for Al i et åpent system med gjennomstrømning, og der parasitten er festet til en mottakelig vert.

### 3. Utvikling av toleranse/resistens for AIS-behandling ved gjentatte eksponeringer for subletale doser med giftig Al

#### 3.1. Problemstilling

Al har en ukjent giftvirkning på *G. salaris*, og dermed er også potensialet for at parasitten kan utvikle toleranse overfor kjemikaliet ukjent. Et ytterpunkt i utvikling av toleranse er full resistens, noe som synes usannsynlig i dette tilfellet jamfør metallers giftighet generelt, slik det rapporteres i internasjonale forskningstidsskrifter (Gensemer & Playle 1999). Eventuell utvikling av toleranse er allikevel i seg selv interessant å belyse, og dette forsøket er gjennomført som repeterte eksponeringer av en populasjon med *G. salaris* for subletale belastninger med Al. Resultatet fra forsøket anses å ha relevans for fastsetting av Al-konsentrasjoner ved gjentatte AIS-behandlinger.

#### 3.2. Metodikk

Forsøket ble gjennomført som et eksperimentelt oppsett ved forsøksdyravdelingen på Veterinærinstituttet i Oslo. Laksunger infisert med *G. salaris* ble eksponert for surgjort vann tilsatt Al frem til parasittinfeksjonen var redusert til ca 5 % av startintensiteten. Restinfeksjonen ble så overført til naiv fisk og fikk utvikle seg på disse i 15 uker. Overlevelsen for avkom av *G. salaris* som var blitt utsatt for Al-eksponeringer ble deretter sammenliknet med overlevelsen til *G. salaris* ved førstegangseksponering til Al.

##### Fisk og forsøksbetingelser

I dette forsøket ble det brukt årsyngel av laks fra Ljøsne klekkeri i Lærdal. Laksungene stammer fra Lærdalselvas egen laksestamme. Fisken ble fraktet i plastposer med oksygenert vann til akvarieavdelingen ved VI i Oslo. Avedlingens driftsvann kommer fra Maridalsvannet som er Oslo bys hoveddrikkevannskilde. Vannet blir filtrert gjennom et partikkelfilter (Hydrex II Filter. Modell GX05-20, lengde 20", 05 Micron polypropylen) og et kullfilter (20 micron/20" - GAC-20BB, Granular Activated Carbon Filter Cartridge) samt luftet i en luftkolonne før det distribueres ut til avdelingens akvarierom. Fisken ble akklimert til dette driftsvannet i ca en uke før forsøkene startet. *G. salaris* som ble brukt i forsøket stammet fra Lierelva og er beskrevet som haplotype F (Hansen mfl. 2003). Infisert villfisk, laksunger 1+ og 2+, ble fanget med elektrisk fiskeapparat og fraktet til VI i Oslo i plastsekker med vann. Der ble de holdt i eget kar frem til forsøksstart. Fisken hadde fra 50 - 2000 parasitter når de ble fanget.

### Eksponering 1

Selve forsøket startet med at 40 klekkerifisk ble infisert med *G. salaris* i kohabitasjon med infisert villfisk. Etter oppsmittingen ble forsøksfisken undersøkt for nøyaktig antall før de ble fordelt i sine respektive eksponeringskar. 30 fisk ble fordelt på tre kar og eksponert for surgjort vann der pH i utgangspunktet var justert til pH = 5,8 og tilsatt ca 100 µg Al/l. Selve Al-tilsetningen varte i 7 døgn (Gruppe Al-1, 2 og 3), men pH varierte mye i eksponeringsperioden. Al som (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) løst i driftsvann og H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ble tilsatt med peristaltisk pumpe (Watson Marlow SciQ 323) fra tilblandete stamløsninger. 10 fisk eksponert for driftsvann, uten Al- og syretilsetning fungerte som kontroll. Etter endt eksponering ble gjenværende parasitter overført til naiv fisk. Der utviklet infeksjonen seg i 105 døgn.

### Eksponering 2

Forsøket startet på samme måte som ved Eksponering 1 ved at 40 naive klekkerifisk ble infisert med *G. salaris* fra infisert villfisk. 30 fisk fordelt på tre forsøkskar ble eksponert for surgjort vann, pH = 5,85, tilsatt ca 90 µg Al/l i 2 døgn (Gruppe Al-naiv 1, 2 og 3). Samtidig ble 30 fisk fordelt på tre kar, infisert med avkom fra tidligere Al-eksponerte *G. salaris* (Gruppe Al-preeksp. 1, 2 og 3). Disse ble eksponert parallelt med- og for samme pH og Al-konsentrasjon som populasjonen med naive *G. salaris*. Ti infiserte fisk gikk i akvarievann uten tilsetning av AlS og fungerte som generell miljøkontroll. For totalt eksperimentelt oppsett, se Figur 3 og 4.

### Telling av *G. salaris*

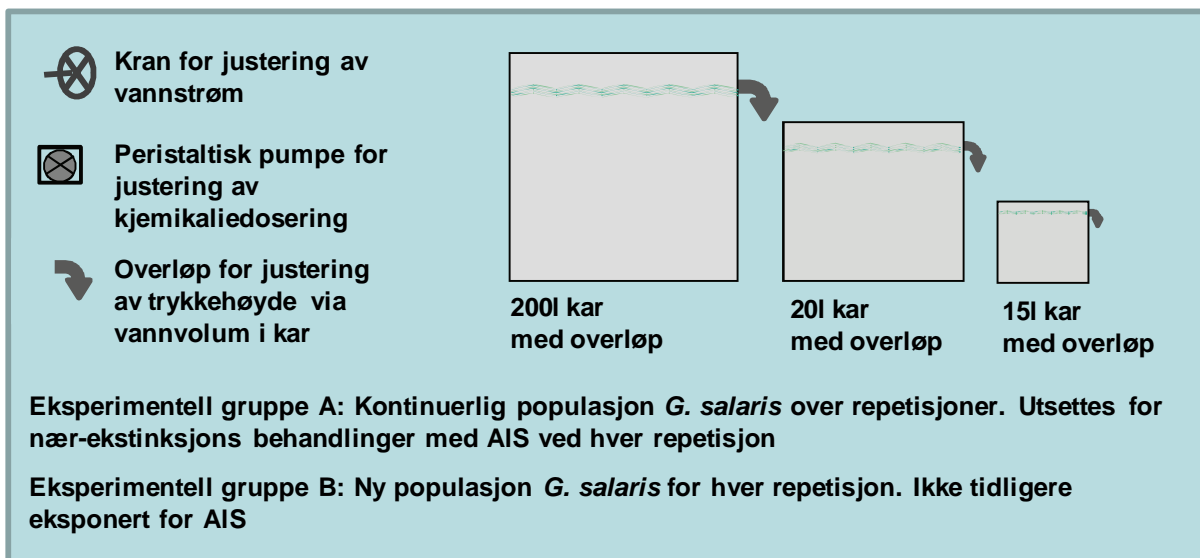
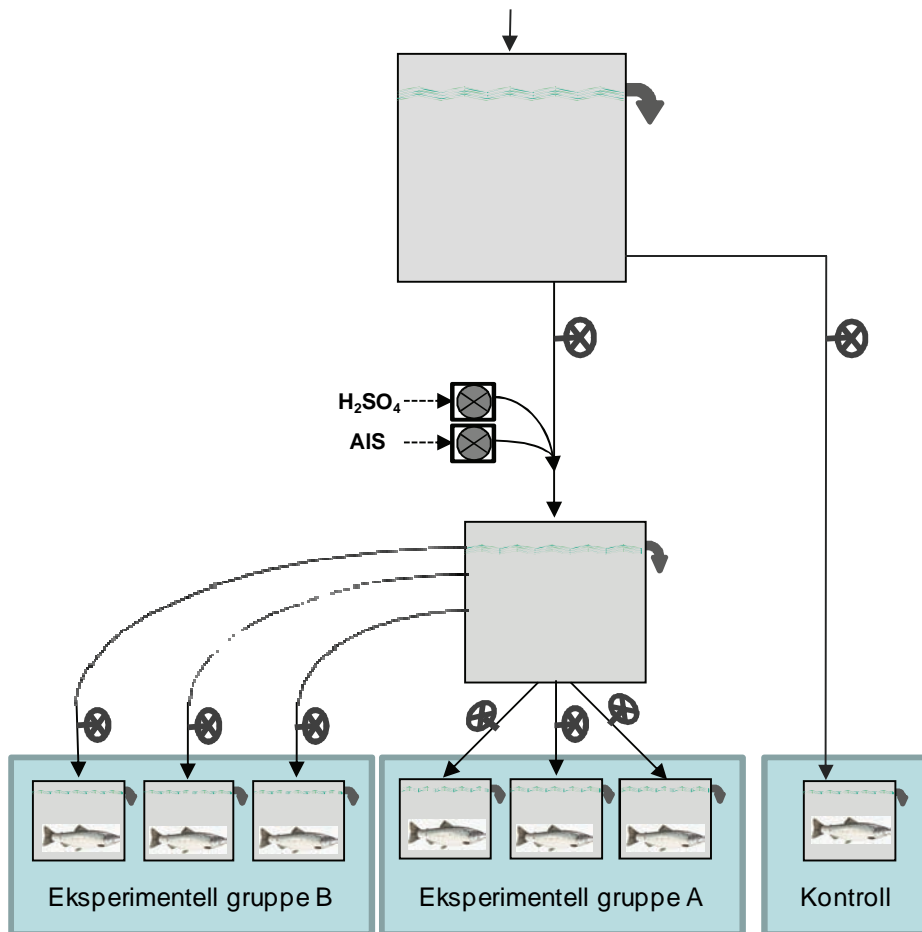
Ved utvalgte tidspunkt ble antall *G. salaris* på hver fisk bestemt. Telling foregikk ved hjelp av lupe. Fisken ble bedøvet i klorbutanoløsning (0,05 %) før undersøkelsen. Etter telling ble fisken oppbevart i en bøtte med vann, boblet med luft. All fisk ble tilbakeført til forsøkskaret etter telling.

### Vannanalyser

pH, vanntemperatur og ledningsevne ble målt daglig i alle fiskekarene (WTW pH/Cond 340i). I tillegg ble det daglig tatt ut en vannprøve for analyse av totalt aluminium. Al-analysene ble gjennomført ved NIVAS akkrediterte laboratorium (ICP-MS, NS-EN ISO 17294-1 og NS-EN ISO 17294-2).

### Uheldige omstendigheter:

Perioden for gjennomføring av toleranse/resistensforsøket var delvis sammenfallende med en periode hvor Vann og avløpsetaten i Oslo (VAV) gjennomførte bytte av produksjonslinje for drikkevann/konsumvann for Oslo by. Dette medførte så ustabile og uforutsigbare kjemiske forhold at forsøkene i første omgang måtte utsettes. Til tross for utsettelse av forsøket oppsto det problemer med ustabil vannkjemi i forbindelse med gjennomføringen. Dette gjorde seg utslag i form av ustabil pH under selve Al-tilsetningen og dermed stor variasjon i giftigheten til Al under eksponeringen. I tillegg ble det i Eksponering 2-forsøket observert en ukontrollert negativ effekt på parasittinfeksjonen i kontrollgruppen. Slike episoder har vært observert tidligere ved smitteforsøk med *G. salaris* i forsøksdyravdelingen og årsaken sees derfor ikke i direkte sammenheng med ovennevnte bytte av produksjonslinje. Årsaken er imidlertid ukjent, men utredes fortløpende. Det er også vanskelig å si hvilken innvirkning denne ekstraordinære dødeligheten har hatt på resultatene i Eksponering 2-forsøket. Det er imidlertid på det rene at Al-tilsetningen i forbindelse med Eksponering 2 burde vært lenger i tid for å kunne konkludere sikkert med henhold til forskjeller i effekt på naiv gruppe kontra avkom av tidligere behandlede parasitter. I tillegg førte episoden til negative effekter på alle populasjoner av *G. salaris* i forsøksdyravdelingen og i påfølgende periode forsvant alle individer av *G. salaris*. Dermed var det ikke mulig å gjennomføre den planlagte Eksponering 3 av toleranse/resistensforsøket *G. salaris*.



Figur 3: Skjematisk fremstilling av eksperimentelt oppsett for undersøkelse av utvikling av toleranse/resistens mot AIS-behandling ved gjentatte subletale eksponeringer for surt Al-holdig vann.

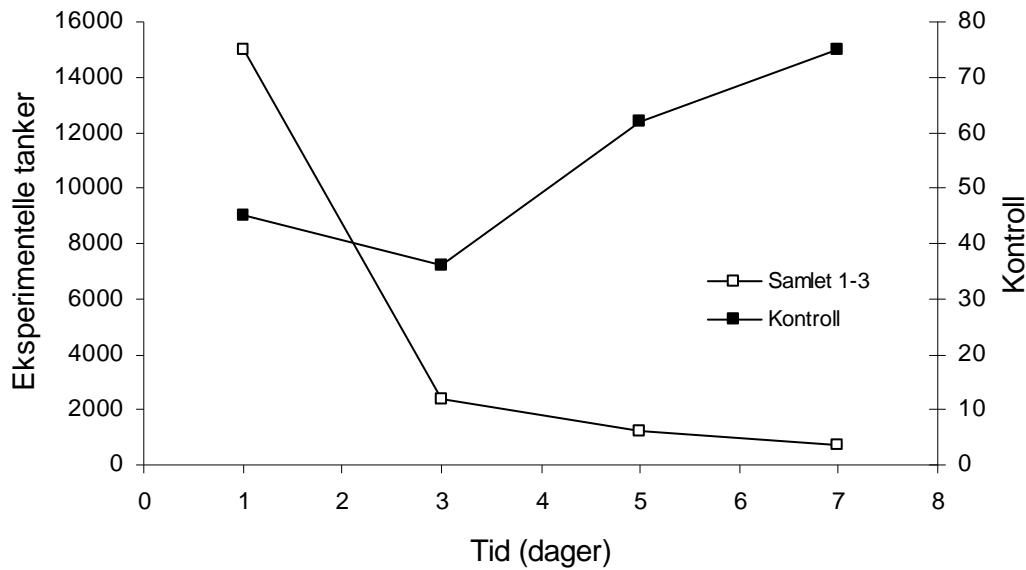


**Figur 4:** Forsøksoppsett som viser doseringspumper (lysegrønne), kanner (25l) for Al- og svovelsyrestamløsninger, innblandingskar for vann tilsatt kjemikalier (sort kar), og bøtter for Al-eksponering av laks infisert med *G. salaris*.

### 3.3. Resultater

#### Eksposering 1, effekt på *G. salaris*

Initiell infeksjon på totalt ca 15000 *G. salaris* ble ved eksponering for Al over syv døgn redusert med mer enn 95 %, til ca 700 parasitter (se Figur 5). I kontrollgruppen økte antallet parasitter i samme tidsperiode med 67 % fra 45 til 75 stk.



**Figur 5:** Resultater fra Eksponering 1: Utviklingen i samlet antall *G. salaris* på laks i tre eksperimentelle grupper eksponert for AI (AI 1-3) og hos en gruppe laks i kontrollgruppe eksponert for driftsvann uten AI-tilsetning.

#### Eksponering 2, effekt på *G. salaris*

I Eksponering 2 ble antallet *G. salaris* redusert med mer enn 95 % i løpet av to døgn (Tabell 2). Det var ingen forskjell mellom gruppen med *G. salaris* som ikke tidligere var eksponert for AI og gruppen som var etterkommere etter Eksponering 1.

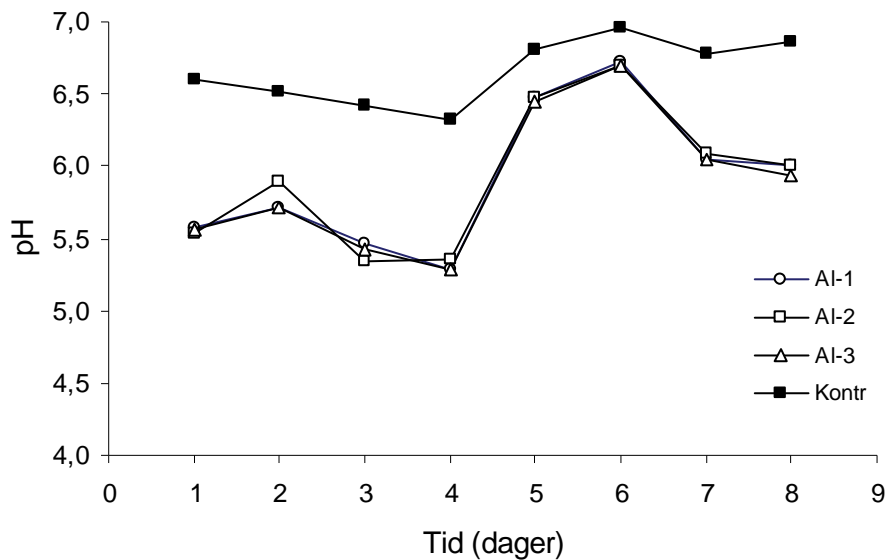
**Tabell 2:** Resultater fra Eksponering 2: Utviklingen i samlet antall *G. salaris* på laks: Gruppen AI-naiv (1-3) infisert med *G. salaris* som ikke tidligere var eksponert for AI og Gruppe AI-preeksp. (1-3) som var infisert med avkom av *G. salaris* eksponert for AI i Eksponering 1.

Gruppe	Ant. <i>G. salaris</i> (Tid 0)	Ant. <i>G. salaris</i> (Tid 2 døgn)
Gruppe AI-naiv 1-3	1227	40
Gruppe AI-preeksp. 1-3	1236	53

#### Eksponering 1 og 2, vannkjemi

Resultater fra pH-målinger under forsøket Eksponering 1 presenteres som en grafisk fremstilling for å illustrere den store variasjonen i pH gjennom dette eksperimentet (Figur 6).





**Figur 6:** Resultater fra Eksponering 1: pH i vann tilsatt AIS og svovelsyre (åpne symboler, AI-1, 2 og 3) og pH i driftsvann (fylte firkanter, Kontr). Figuren viser at pH varierte, men at vannet i de tre AI-eksponerte gruppene holdt tilnærmet samme pH gjennom hele eksponeringsperioden.

Resultater fra pH-målinger i Eksponering 2 er presentert i Tabell 3 sammen med vanntemperatur, konduktivitet og Al-konsentrasjon for både Eksponering 1 og 2. Ved oppstart av Eksponering 1 lå pH i vann tilsatt AIS på 5,6-5,8. Store vannkjemiske variasjoner i driftsvannet, særlig perioder med forhøyede mengder av Ca (opplysninger fra Vann og avløpsetaten), gjorde at pH varierte mye under eksponeringen, fra 5,3-6,7 i vann tilsatt AIS og fra 6,3-7,0 i driftsvann uten AIS-tilsetning (Figur 6).

Under Eksponering 2 var det stabile vannkjemiske forhold og pH holdt seg konstant på 5,85 gjennom hele eksponeringen (Tabell 3). Eksponering 1 ble gjennomført med vanntemperatur på ca 10°C, mens temperaturen i Eksponering 2 lå på 5,4°C. Temperaturen mellom replikater og mellom AI-eksponerte grupper og kontrollgruppe var imidlertid tilnærmet lik i begge eksponeringsrundene. Forskjellen i vanntemperatur i de to separate forsøkene skyldes årstidsvariasjon i temperatur på driftsvannet som leveres til forsøksdyravdelingen. Konduktiviteten i driftsvannet varierte fra 32-96 µS/cm i Eksponering 1, mens den var stabil på 30 µS/cm i Eksponering 2 (Tabell 3). Variasjon i konduktivitet har samme forklaring som variasjon i pH, nemlig ujevn tilsetning av ioner til vannet, særlig Ca.

**Tabell 3:** Resultater fra vannkjemianalyser under Eksponering 1 og 2: Alle verdier er oppgitt som middelveier ± standardfeil. Antall målinger (n) er oppgitt i parentes. AI er oppgitt som AI-total.

Eksponering	Dato	pH (-log[H <sup>+</sup> ])	Temp (°C)	Kond (µS/cm)	Al (µg/l)
<b>Resistens 1</b>	03.10-10.10.08				
AI 1			10,1 ± 0,1 (8)	60,9 ± 10,2 (8)	166 ± 9,0 (8)
AI 2			10,2 ± 0,2 (8)	61,4 ± 10,2 (8)	162 ± 7,1 (8)
AI 3			10,0 ± 0,1 (8)	61,3 ± 10,5 (8)	173 ± 11,5 (7)
Kontroll			9,8 ± 0,1 (8)	56,1 ± 9,9 (8)	65 ± 6,2 (7)
<b>Resistens 2</b>	09.02.-11.02.09				
AI naiv 1		5,85 ± 0 (3)	5,3 ± 0,1 (3)	33,0 ± 0 (3)	160 ± 0,0 (3)
AI naiv 2		5,85 ± 0 (3)	5,4 ± 0 (3)	33,0 ± 0 (3)	160 ± 0,2 (3)
AI naiv 3		5,85 ± 0 (3)	5,3 ± 0 (3)	33,0 ± 0 (3)	160 ± 0,0 (3)
AI preeksp. 1		5,84 ± 0 (3)	5,4 ± 0 (3)	33,0 ± 0 (3)	164 ± 3,7 (3)
AI preeksp. 2		5,84 ± 0 (3)	5,4 ± 0 (3)	33,0 ± 0 (3)	163 ± 3,0 (3)
AI preeksp. 3		5,84 ± 0 (3)	5,4 ± 0 (3)	33,0 ± 0 (3)	160 ± 0,0 (3)
Kontroll		6,72 ± 0 (3)	5,6 ± 0,2 (3)	30,0 ± 0 (3)	73 ± 0,7 (3)

### 3.4. Diskusjon resistens

Utryddelse av *G. salaris* fra norske laksevasdrag har vist seg å være en utfordrende oppgave (Johnsen mfl. 2008). Kjemisk behandling, med rotenon og fiskesperrer, eller med AIS i kombinasjon med rotenon og fiskesperrer, er i dag forvaltningens metoder i kampen mot parasitten. Utryddelsestiltak, uavhengig av metode, består av repeterte kjemiske behandlinger, et opplegg som antas å øke sannsynligheten for vellykket utryddelse (Finlayson mfl. 2000). I forbindelse med repeterte AIS-behandlinger har hypotesen om resistensutvikling hos *G. salaris* mot AIS blitt fremmet. En forutsetning for utvikling av resistens er ulike toleranse for Al i parasittpopulasjonen. Resultatet som fremkom i forsøket gir ingen indikasjoner på økning i toleranse for giftig Al ved gjentatt Al-eksponering. Al-sensitiviteten i en populasjon med avkom fra *G. salaris* som har overlevd Al-eksponering var ikke forskjellig fra følsomheten til en populasjon med naive parasitter. Når toleransen for Al ikke blir større i parasittpopulasjonen ved gjentatt behandling, er det heller ikke grunn til å anta en resistensutvikling over tid. Tatt i betraktning de suboptimale forholdene under Eksponering 2 i forsøkene, må imidlertid disse resultatene tolkes med forsiktighet. Forsøket var planlagt med en tredje Al-eksponering, der følsomheten til avkom fra populasjonen eksponert to ganger for Al skulle testes mot en naiv populasjon med *G. salaris*. I forberedelsesfasen til denne testen forsvant imidlertid all *G. salaris* fra laksunger i forsøksdyravdelingen (beskrevet tidligere som uheldige omstendigheter). Resultatene må derfor tolkes i mangel av en god miljøkontroll, som viser naturlig vekst i en populasjon med *G. salaris* eksponert for vann uten Al-tilsetning. På grunn av generelle problemer med å holde infeksjoner med *G. salaris* i forsøksdyravdelingen var det ikke mulig å undersøke om toleransen for Al i en populasjon med *G. salaris* øker ved tredje gangs eksponering for Al.

Resultater fra dette forsøket indikerer at eksponering for subletale doser av Al ikke påvirker parasittens følsomhet for Al ved gjentatt behandling.

## 4. Virkningsmekanismer på *G. salaris* ved eksponering for surt Al-holdig vann; overflateeffekt vs internalisering

### 4.1. Problemstilling

Basert på kunnskap om de kjemiske egenskapene til Al i vann, herunder løselighet, evne til å opptre på ulike tilstandsformer samt potensialet det har for å binde seg til biologiske overflater, ble det gjennomført et forsøk for å undersøke virkningsmekanismer til Al på *G. salaris*. Det har vært et mål å finne ut om Al binder seg til overflaten til parasitten, eventuelt om bundet Al i tillegg tas opp i organismen. Basert på kunnskap om effekter av Al på fisk i surt Al-holdig vann, har arbeidshypotesen vært at metallionet binder seg til overflaten hos *G. salaris* og påfører fysiologiske forstyrrelser. Påvisning av Al på parasitten forutsetter imidlertid at Al har en direkte effekt på *G. salaris* og ikke en indirekte effekt gjennom vertens immunrespons. Hensikten med forsøket har vært å belyse mekanismene for hvordan Al virker på *G. salaris* og om mulig forklaring hvorfor *G. salaris* fjernes fra laks ved Al-tilsetning.

### 4.2. Metodikk

For å vurdere hvorvidt Al binder til overflaten på *G. salaris* og/eller tas opp i organismen ble det benyttet en metode kjent fra studier av Al på fiskegjeller hvor metallet farges med Solochrom azurine. Ved farging med Solochrom azurine fremkommer bundet Al med blå farge, mens vev blir farget rød/rosa.

Som en pilotstudie ble fargemetoden testet på parasitter isolert fra laksunger eksponert for Al under AIS-behandling av Lærdalselva 2008. Fisk fanget i elva under AIS-behandlingen var fiksert på formalin med dette forsøket som formål.

Under selve hovedforsøket som ble gjennomført i laboratorium ble levende *G. salaris*, eksponert for Al-holdig vann, 400 µg Al/l, pH 5,70 ved 0-2°C i 19 timer. Parasitten ble eksponert i petriskåler med stillestående vann. Etter eksponering ble grupper bestående av enkeltindivider *G. salaris* isolert ved hjelp av mikropipette og fiksert på formalin. Følgende utvalgt ble gjort:

- 10 enkeltindivider med levende *G. salaris* festet til bunnen av petriskålen
- Et større antall døde parasitter fra bunnen av petriskålen
- 3 biter av fiskefinne med flere levende *G. salaris* på hver finne

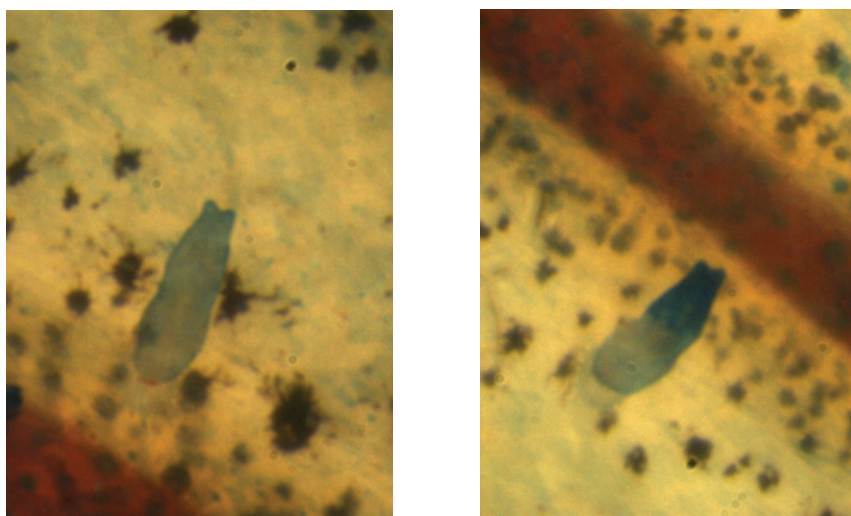
Samme prosedyre ble gjentatt for *G. salaris* eksponert for ubehandlet driftsvann fra forsøksdyravdelingen, pH 7,90 ved 0-2°C i 19 timer. Dette materialet fungerte som kontroll i forsøket.

Hele dyr innsamlet under AIS-behandling i Lærdalselva 2008 og histologiske snitt av *G. salaris* eksponert for Al i laboratorieforsøk ble farget og studert i henholdsvis lupe og mikroskop. På grunn av metodiske utfordringer ble det kun laget vellykkede snitt fra levende *G. salaris* eksponert for Al mens de var festet på en fiskefinne. Tilsvarende snitt ble laget fra en gruppe parasitter eksponert for driftsvann og fungerte som kontroll. Et preparat av en Al-eksponert gjelle fra Atlantisk laks ble brukt som referanse til sammenlikning.

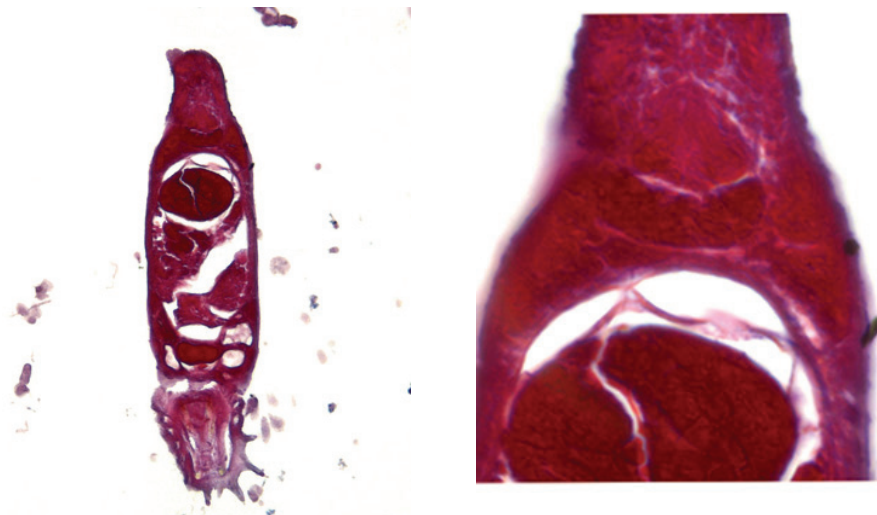
### 4.3. Resultater

Figur 7 viser to individer av *G. salaris* festet til huden på laksunger som var eksponert til Al i forbindelse med AIS-behandling av Lærdalselva 2008. Bildene viser at tilnærmet hele overflaten til parasitten er farget blå, mens fiskens hud har en annen farge.

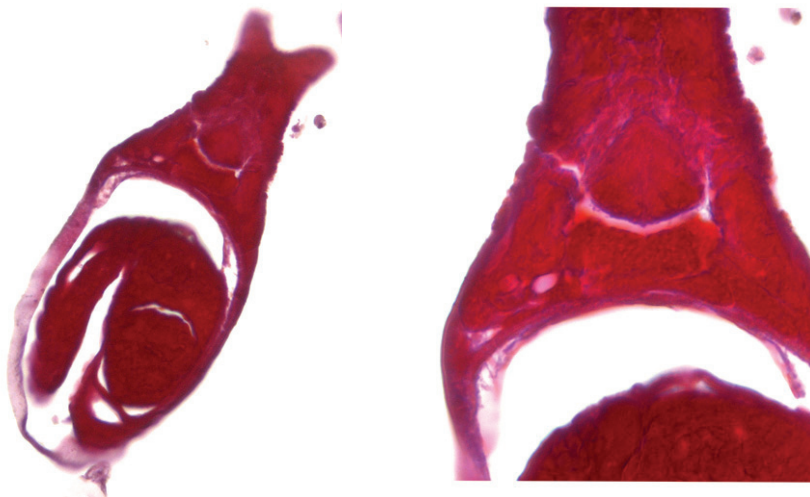
Figur 8 viser histologisk snitt av *G. salaris* farget med Solochrom azurine etter eksponering for Al i 19 timer ved 0-2°C. Det er ingen indikasjoner på at Al er tatt opp i organismen. Eventuelt overfaltebundet Al vil være svært vanskelig å påvise på denne typen snitt som i hovedsak illustrerer miljøet inne i parasitten. Figur 9 viser snitt av parasitter farget med Solochrom azurine etter eksponering for driftsvann uten tilsetning av Al. Det er, som forventet ingen tegn på tilstedeværelse av Al innvendig i disse individene.



**Figur 7:** To individer av *G. salaris* farget med Solochrom azurine. Begge er festet til huden på laksunger som var eksponert til Al i forbindelse med AIS-behandling av Lærdalselva 2008.



**Figur 8:** Histologisk snitt av *G. salaris* farget med Solochrome azurine etter eksponering for Al i 19 timer ved 0-2 °C. Venstre: Bilde tatt ved 100x forstørrelse. Høyre: Utsnitt av foregående ved 400x forstørrelse.



**Figur 9:** Histologisk snitt av *G. salaris* farget med Solochrome azurine etter eksponering for Al i 19 timer ved 0-2 °C. Venstre: Bilde tatt ved 200x forstørrelse. Høyre: Utsnitt av foregående ved 400x forstørrelse.

#### 4.4. Diskusjon

Overflateeffekt eller opptak av Al i organismen?

Farging av hele *G. salaris* med Solochrome azurine ga indikasjon på at Al binder seg til overflaten på parasitten. Resultatet må imidlertid tolkes med forsiktighet da denne delen av forsøket ble betraktet som en pilot. Det mangler blant annet kontrollgruppe i form av bilder fra hele parasitter eksponert for vann uten innhold av Al. Det bli ikke samlet inn materiale med mulighet for slike undersøkelser i forbindelse med AIS-behandlingen i 2008. I resultatene fra laboratorieforsøket der histologiske snitt fra *G. salaris* eksponert for Al ble farget med Solochrome azurine, er det ingen tegn til at Al tas opp i organismen. Bildene gir heller ingen indikasjon på at Al er bundet til overflaten på parasitten. De histologiske snittene illustrerer imidlertid i all hovedsak parasitten sett fra innsiden, og bildene egner seg derfor dårlig til å påvise overflatebundet Al. Farging med Solochrome azurine gir altså indikasjoner som kan tolkes i retning av at Al bindes til overflaten på *G. salaris*, men tas ikke opp i organismen. Det knytter seg imidlertid noe usikkerhet til fargemetoden, blant annet i hvilken grad Al vaskes bort i løpet av prosedyren (Ole Bendik Dale, pers. medd.).

## Mekanismer for binding av Al

Overflatebinding av Al på *G. salaris* er ikke usannsynlig sett i forhold til metallens fysiske og kjemiske egenskaper i vann. I forsøk på å forklare disse prosessene er det naturlig å ta utgangspunkt i mekanismene bak virkningen av Al på fisk, som er godt beskrevet i litteraturen (Gensemer & Playle 1999). Årsaken til at Al kan binde seg til, og forårsake skader på fiskegjeller er at gjelleoverflaten har en rekke negativt ladde bindingssteder; fosfolipider i cellemembranen og glykoproteiner i slimlaget som dekker gjelleoverflaten (Wold & Selset 1977). Positivt ladde forbindelser som  $Al^{3+}$  og små Al-polymerer kan derfor lett binde seg til disse setene (Exley mfl. 1996).

Oppbygningen av tegumentet (hudoverflaten) til *Gyrodactylus derjavinoides*, som er nært beslektet med *G. salaris*, er beskrevet i forbindelse med studier av immunresponser hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Buchmann 1998). I forbindelse med disse studiene foreslås det at galaktosederivater er viktige komponenter i tegumentalt glycoalyx hos denne parasitten. Tegumentet samt deler av fordøyelsessystemet er også beskrevet å inneholde glykoproteiner (Buchmann 1998). Det er derfor grunn til å anta at hudoverflaten til *G. salaris* inneholder negative bindingssteder der positivt ladde Al-forbindelser kan feste seg på grunn av ladningsmotsetninger.

## Fysiologiske effekter som en konsekvens av Al-binding

Når Al binder seg til fiskegjeller kan dette irritere gjelleepitelet og føre til utskillelse av katekolaminer (adrenalin og noradrenalin) (Huges 1981). Katekolaminer stimulerer utskillelsen av slim fra slimceller i gjelleepitelet. I tillegg kan binding av Al føre til morfologiske forandringer i gjellens primær og sekundærepitelet (Poléo & Bjerkely 2000). Dette fører til at den respiratoriske overflaten reduseres samtidig som økt slimlag øker diffusjonsavstanden mellom vann og blod og påfører fisken hypoksi. Basert på anatomi og størrelse er det grunn til å anta at gassutveksling mellom *G. salaris* og omgivelsene (vannet) foregår ved diffusjon gjennom kroppsoverflaten hos parasitten. Binding av Al med påfølgende immunologiske reaksjoner kan tenkes å påvirke gassutvekslingen. Dette bør undersøkes nærmere ved ytterligere mekanismestudier der det legges vekt på fysiologiske effekter hos *G. salaris* etter eksponering for giftig Al.

## 5. Forsøkens relevans for kjemisk behandling mot *G. salaris* i norske laksevasdrag

Resultater fra de tre arbeidspakkene som presenteres i denne rapporten har relevans for utviklingen av AIS som behandlingsmetode mot *G. salaris* i norske laksevasdrag. Foreløpig har utvikling av AIS-metoden vært dominert av kjemikalietilpasning, doseringsteknologi og andre logistiske forbedringer. Når det gjelder selve effekten av Al-eksponering på *G. salaris* er kunnskapen begrenset til observasjoner av at parasitten forsvinner fra fisken. Ved behandling i kaldt vann, det vil si ved temperatur på 1 - 4 °C, jamfør behandlinger i Lærdalselva, 2005, 2006 og 2008 (Pettersen mfl. 2006, Hagen mfl. 2009) er en eksponeringstid på 10-14 dager for kort til å kunne forvente dødelighet hos *G. salaris* som følge av fravær av vert (Olstad mfl. 2006). Resultater fra Grimsmo (2001) antyder imidlertid at parasitten faktisk dør som en direkte effekt av eksponering. Dette støttes av resultater fra forsøket i arbeidspakke 1 i denne rapporten, og anses som avgjørende for AIS-metodens egnethet i forhold til målsetning om utryddelse av *G. salaris*.

Repeterte behandlinger antas å øke sannsynligheten for å lykkes med utryddelse av uønskede organismer, en strategi som gjelder flere typer kjemisk behandling (Finlayson mfl. 2000). I forbindelse med repeterte AIS-behandlinger har hypotesen om resistensutvikling hos *G. salaris* mot Al blitt fremmet. Resultatene fra Arbeidspakke 2 støtter ikke denne hypotesen. I dette forsøket er imidlertid resultatene noe mangelfulle i forhold til å forkaste hypotesen. Mekanismestudiene i Arbeidspakke 3 som indikerer at Al binder seg til overflaten på *G. salaris* gir grunn til å tro at Al påvirker fysiologiske prosesser hos parasitten. Antagelsen er basert på dokumenterte Al-induserte effekter på andre akvatiske organismer. Dette er effekter som er lite assosiert med utvikling av resistens og er dermed et resultat som svekker hypotesen om resistensutvikling. Det er derfor grunn til å opprettholde strategien med repeterte behandlinger i forsøk på å utrydde *G. salaris* med AIS-metoden. Varigheten til hver enkelt behandling, samt frekvensen og antall på behandlingene er imidlertid strategiske vurderinger som bør utredes nærmere.



Selve mekanismene for hvordan Al virker på *G. salaris* er spesielt interessante i forhold til hva slags vannkjemi som bør etterstribes å produsere under en behandling med AIS-metoden. Resultater fra Arbeidspakke 3 indikerer at Al binder seg til overflaten på parasitten men at metallionet ikke tas opp i organismen. Konklusjonsgrunnlaget er imidlertid noe begrenset blant annet på grunn av usikkerhet rundt fargemetodikken. Det kan ikke utelukkes at Al tas opp i celler og/eller i indre organer, og skader parasitten innenfra. Mangelfull kunnskap om fysiologien til *G. salaris* gjør det vanskelig å forklare virkningsmekanismer ved binding av Al til parasittens hudoverflate. Al-induserte effekter beskrevet på andre akvatiske organismer gir imidlertid grunn til å tro at Al påvirker respirasjon og ioneregulering hos *G. salaris*. Forutsatt at Al som er bundet til overflaten på *G. salaris* forårsaker fysiologiske forstyrrelser, bør behandling med AIS gjennomføres med vannkjemi som gir gode forhold for binding av Al til organismen. Slike forhold oppnås når pH og temperatur i vannet favoriserer dannelsen av positivt ladde tilstandsformer av Al.

## 6. Referanser

Buchmann, K. 1998: Binding and lethal effect of complement from *Onchorynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms* 32, 195-200.

Driscoll, C.T., Baker, J.P., Bisogni, J.J. & Schofield, C.L. 1980: Effect of aluminiumspeciation on fish in delute acidified waters. *Nature* 284, 161-164.

Exley, C., Wicks, A.J., Hubert, R.B. & Birchall, J.D. 1996: Kinetic Constraints in Acute Aluminium Toxicity in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Theoretical Biology* 179, 25-31.

Finlayson, B.J., Schnick, R.A., Cailteux, R.L., DeMong, L., Horton, W.D., McClay, W., Thompson, C.W. & Tichacek, G.J. 2000: Rotenone use in fisheries management: administrative and technical guidelines manual. *American Fisheries Society*, 212 s.

Gensemer, R.W. & Playle, R.C. 1999: The bioavailability and toxicity of aluminium in aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29, 315-450.

Grimsmo, H. 2001: Aluminiums virkning på *Gyrodactylus salaris* infeksjon hos laks (*Salmo salar*): En direkte eller indirekte effekt? Cand. scient. oppgave i fysiologi. Avdeling for Generell fysiologi, Biologisk Institutt, Universitetet i Oslo, 46s.

Hagen, A., Kjøsnes, A.J., Høgberget, R., Hytterød, S., Olstad, K. & Hindar, A. 2009: Smittebegrensende behandling med aluminiumsulfat (AIS) mot lakseparasitten *Gyrodactylus salaris* i Lærdalselva 2008. NIVA-rapport 5762, 40s.

Hansen, H., Bachmann, L. & Bakke, T. A. 2003: Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* Spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *International Journal for Parasitology* 33, 1471-1478.

Huges, G.M. 1981: Effects of low oxygen and pollution on the respiratory system of fish. In Pickering, A.D. (Ed). *Stress and Fish*. Academic Press, London, 121-146.

Johansen, B.O., Brabrand, Å., Jansen, P., Teien, H.C. & Bremset, G. 2008: Evaluering av bekjempelsesmetoder for *Gyrodactylus salaris*. Rapport fra ekspertgruppe. Utredning for DN 2008-7, 140s.

Lydersen, E., Salbu, B., Poléo, A.B.S. & Muniz, P.I. 1990: The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water, Air and Soil Pollution* 51, 203-215.

Lydersen, E. 1991: Aluminium in dilute acidic freshwaters - chemical, analytical and biological relevance. Dr philos thesis, University of Oslo, 133s.

Olstad, K., Cable, J., Robertsen, G. & Bakke, T.A. 2006: Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology* 133, 33-41.

Pettersen, R.A., Hytterød, S., Mo, T. A., Hagen, A.G., Flodmark, L.E.W., Høgberget, R., Olsen, N., Kjøsnes, A.J., Øxnevad, S., Håvardstun, J., Kristensen, T., Sandodden, R., Moen, A. & Lydersen, E. 2006: Kjemisk behandling mot *Gyrodactylus salaris* i Lærdalselva 2005/2006 - Sluttrapport. NIVA-rapport 5349, 27s.

Poléo, A.B.S. 1995: Aluminium polymerisation - A mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology* 31, 437-456.

Poléo, A.B.S. & Bjerkely, F. 2000: Effect of unstable aluminium chemistry on Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1423-1433.

Poléo, A.B.S., Schjolden, J., Hansen, H., Bakke, T.A., Mo, T.A., Rosseland, B.O. & Lydersen, E. 2004: The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology* 128, 169-177.

Soleng, A., Poléo, A.B.S., Alstad, N.E.W. & Bakke, T.A. 1999: Aqueous aluminium eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. *Parasitology* 119, 19-25.

Wold, J.K. & Selset, R. 1977: Glycoproteins in the skin mucus of the char (*Salmo alpinus* L.) *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 56, 215-218.







Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og dyrevelferd med uavhengig forvaltningsstøtte til departementer og myndigheter som primæroppgave. Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium i Oslo og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø, med til sammen ca. 350 ansatte.

[www.vetinst.no](http://www.vetinst.no)

#### Tromsø

Stakkevollvn. 23 b · 9010 Tromsø  
9010 Tromsø  
t 77 61 92 30 · f 77 69 49 11  
[vitr@vetinst.no](mailto:vitr@vetinst.no)

#### Harstad

Havnegata 4 · 9404 Harstad  
9480 Harstad  
t 77 04 15 50 · f 77 04 15 51  
[vih@vetinst.no](mailto:vih@vetinst.no)

#### Bergen

Bontelabo 8 b · 5003 Bergen  
Pb 1263 Sentrum · 5811 Bergen  
t 55 36 38 38 · f 55 32 18 80  
[post.vib@vetinst.no](mailto:post.vib@vetinst.no)

#### Sandnes

Kyrkjev. 334 · 4325 Sandnes  
Pb 295 · 4303 Sandnes  
t 51 60 35 40 · f 51 60 35 41  
[vis@vetinst.no](mailto:vis@vetinst.no)

#### Trondheim

Tungasletta 2 · 7047 Trondheim  
Postboks 5695 Sluppen · 7485 Tr.heim  
t 73 58 07 27 · f 73 58 07 88  
[vit@vetinst.no](mailto:vit@vetinst.no)

#### Oslo

Ullevålsveien 68 · 0454 Oslo  
Pb 750 Semtrum · 0106 Oslo  
t 23 21 60 00 · f 23 21 60 01  
[post@vetinst.no](mailto:post@vetinst.no)

