



**Faglig sluttrapport i prosjekt 901454 Strategi lakselus
2017: “Validering av Blue Lice systemet som en
forebyggende metode mot lakselus gjennom en unik
kombinasjon av tiltrekningsfaktorer og smart design
av feller”.**

Dato: 06.07.2018

Av: Karoline Sjødal Olsen (Blue Lice) og Tor Atle Mo (NINA)

Blue Lice AS

Siriskjeret 31, 4014 Stavanger

+47 922 53 542

post@bluelice.no

bluelice.no

1. Sammendrag

Blue Lice gjennomførte et prosjekt i samarbeid med Bremnes Seashore for å teste et forebyggende fellesystem mot lakselus i fullskala. Analysene av resultatene ble utført av Norsk Institutt for Naturforskning. Test av Blue Lice sine lusefeller ble utført ved Bremnes Seashore sin avdeling Jørstadskjera i perioden fra 14. til 16. desember 2017. Formålet var å validere Blue Lice sin forebyggende metode mot lakselus basert på en kombinasjon av tiltrekningsfaktorer og egenutviklede feller ved et operasjonelt oppdrettsanlegg. Prosjektet er delfinansiert av FHF med prosjektnummer 901454.

Lusefellene ble plassert i seks forskjellige områder inne i merden, slik at de tilsammen dekket størsteparten av merdens overflate. For hvert av de seks områdene ble det satt ut tre feller fordelt på én, tre og seks meters dybde. I hvert område var de tre lusefellene enten betegnet som aktive, det vil si med lukt- og lysstimuli, eller passive, det vil si uten lukt- og lysstimuli. For å kunne validere lusefellenes effektivitet var det nødvendig å kjenne til forekomst av lakseluslarver i merden. Vi brukte elektriske planktonpumper for filtrering av store mengder vann i samme testmerd. Tre planktonpumper ble plassert rett over hverandre ved ca. én, tre og seks meters dybde. Basert på totalt antall kopier av lakselus-DNA kan antallet lakseluslarver (sum av naupliier og kopepoditter) estimeres i hver av planktonprøvene. Lusefellene og planktonpumpene var plassert slik at alle strømrørninger og -styrker inne i merden ble dekket, og de var funksjonelle samtidig i 12 timers sykluser. Alle prøver ble lagret i beholderne fraktet til NINAs genetikklaboratorium for DNA-analyser for å finne antall lakselus i fellene og planktonpumpene.

DNA-analyser av innholdet i lusefellene viste liten forekomst av lakseluslarver. I og med at det ble påvist få lakseluslarver i lusefellene, og de to lakseluslarvene som ble påvist, var i henholdsvis en aktiv og en passiv lusefelle, er det ikke tilstrekkelig grunnlag for å gi en god vurdering av lusefellenes effektivitet. Resultatet kan indikere at lusefellene ikke tiltrekker seg



lakseluslaver i vesentlig grad, men i og med at lusefellenes to stimuli (lukt og lys) ikke fungerte som de skulle, gir ikke dette studiet grunnlag for en evaluering av virkningen til stimuliene. Det vil være nødvendig med grundigere testing over tid, gjerne i sommerhalvåret, for å kunne dokumentere effektiviteten av et slikt forebyggende fellesystem mot lakselus.

(English version)

Blue Lice conducted a pilot project in collaboration with Bremnes Seashore to test a preventive sea lice trap system in full scale. The analyzes of the results were carried out by the Norwegian Institute for Nature Research. Testing of Blue Lice's lice traps was carried out at Bremnes Seashore's Jørstadskjera department in the period from 14. to 16. December 2017. The purpose was to validate Blue Lice's preventive method against sea lice based on a combination of attracting factors and self-developed traps at an operational fish farm.

The sea lice trap system was placed in six different areas inside the cage, so that they collectively covered most of the surface of the cage. For each of the six areas three traps were put at one, three and six meters depth. In each area, every other sea lice trap were either termed as active, that is, with odor and light stimuli, or passive, that is, without odor and light stimuli. In order to validate the effectiveness of the sea lice traps, it was necessary to know the occurrence of sea lice larvae in the salmon pen. We used electric plankton pumps for filtering large quantities of water during the test. Three plankton pumps were placed directly above each other at approx. one, three and six meters depth. Based on the total number of copies of salmon lice DNA, the number of salmon lice larvae (sum of naupliier and kopepodites) can be estimated in each of the plankton samples. The sea lice traps and plankton pumps were positioned so that all flow directions and forces inside the cage were covered, and they were functional at the same time for 12 hours cycles. All samples were stored small containers and shipped to the NINA Genetic Laboratory for DNA Assays to find the number of salmon lice in the traps and plankton pumps.



DNA analyzes of the contents showed a insignificantly small incidence of salmon lice larvae. As so few salmon lice were detected in the sea lice traps, and the detected results were found both in an active and passive lice trap, there is no sufficient basis for giving a good assessment of the sea lice traps efficiency. The result may indicate that the sea lice traps does not attract sea lice to a significant extent, but because the two stimuli (odor and light) of the sea lice traps did not function properly, this study does not provide a basis for an evaluation of the effect on the stimuli. There will be a need for more thorough testing over time, preferably in the summer, to document the effectiveness of such a preventive sea lice trap system.

2. Innledning

Lakselus er den største utfordringen for havbruksnæringen i dag. En hel rekke metoder for medikamentfri bekjempelse av lakselus eksisterer eller er under utvikling knyttet til forebyggende biologiske tiltak, unnvikelse, rapportering eller undertrykkelse. Et nylig publisert estimat viser at lakselus koster norske oppdrettere minst 15 milliarder kroner per år. Skadeberegninger så sent som i 2016 har vært i området 5-10 milliarder kroner per år. Markedet for ulike typer løsninger er estimert til 5 milliarder kroner per år basert på en beregning der operatørselskap bruker tre til fem kroner kiloen på kontroll av lakselus. Det har blitt anslått at den norske oppdrettsnæringen har mulighet til å femdoble omsetningsverdien i marin produksjon innen 2050. Blue Lice sin teknologi vil, forutsatt en vellykket demonstrasjons- og kommersialiseringsinnsats, kunne bidra til å tilrettelegge for økt vekst ved å sikre lave nivå av lakselus uten resistensdrivende medisinsbruk.

Eksisterende forebyggende metoder mot lakselus (unnvike påslag eller hindre lus som finnes i anlegget til å utvikle levedyktige larver) har svakheter knyttet til effekt, kostnad, fiskevelferd og potensielle konsekvenser på lang sikt. I tråd med utlysningsteksten, har vi holdt reaktive

metoder knyttet til å fjerne eksisterende lus på fisk (behandling) utenfor nedenstående oversikt. Blue Lice har til hensikt å avhjelpe eller redusere ulempene ved kjent teknologi, eller i det minste å validere selskapets innovasjon som et supplement til kjente metoder:

- **Forebyggende biologiske tiltak:** Initiativ knyttet til avl på laks, fôr og vaksiner som kan gi økt resistens mot lakselus. Lakselus kan imidlertid bli motstandsdyktig mot metodene som brukes.
- **Luseskjørt:** Vesentlig arbeide og kostnader forbundet med montering og vedlikehold, påkjenninger på anlegget og behov for overvåkning (oksygenmetning innenfor skjørtet, fiskens adferd mm.)
- **Snorkelmerd/nedsenkbare merder:** Betydelige kostnader, og flere av de samme argumentene som for luseskjørt. Det er mulighet for oksygenmetning i snorkelen
- **Semi-lukkede anlegg i sjø:** Slik anlegg hindrer fysisk kontakt mellom lusekopepoditter og laks. Store kostnader er forbundet med installering og drift, med behov for kontroll av filtre og vannkvalitet
- **Strømgjerde:** Metoden er under uttesting. Det synes fortsatt å være åpne spørsmål knyttet til fiskens adferd og plassering i merden, fiskevelferd og kostnader
- **Ultralyd:** Forskningsmiljø har konkludert med at selv om det ikke er mulig å utelukke at ultralyd kan ha effekt overfor lakselus, er det lite sannsynlig.

Prosjektet er gjennomført fra oktober 2017 - mai 2018, hvor selve feltforsøket ble gjennomført i en uke i desember 2017 på anlegget Jørstadskjera på Ombo hos Bremnes Seashore. Selve feltforsøket ble gjennomført av prosjektleder Karoline Sjødal Olsen (Blue Lice), operasjonssjef Lars-Kristian Opstad (Blue Lice), Rolf Sivertsgård (NINA) og Oscar Pettersen (NINA).



Analysene er gjort på laboratoriet hos NINA de påfølgende to månedene etter feltforsøket. Prosjektet er delfinansiert av FHF med prosjektnummer 901454.

Referansegruppe:

Marit Stormoen (Marine Harvest)

Geir Magne Knutsen (Bremnes Seashore)

FHF-ansvarlig:

Kjell Maroni

3. Problemstilling og formål

Prosjektets hovedmål (HM):

Validere PoC for Blue Lice sin forebyggende metode mot lakselus basert på en kombinasjon av tiltrekningsfaktorer og egenutviklede feller ved et operasjonelt oppdrettsanlegg

Prosjektets delmål (DM):

- DM1: Objektiv presentasjon av funn vedrørende Blue Lice sin evne til å fange lakselus, sammenlignet med det totale antall lus som går gjennom en merd i løpet av en tidevannssyklus.
- DM2: Optimalisere designet på fellene og oppsettet av tiltrekningsfaktorene i fellene for å oppnå størst mulig fangst av lakselus, og dermed begrense påslag på fisk.

4. Prosjektgjennomføring

Feltarbeid

Test av Blue Lice sine lusefeller ble utført ved Bremnes Seashore sin avdeling Jørstadskjera i perioden fra 14. til 16. desember 2017. Lusefellene ble utplassert i testmerd nr. 5 og driftet av Blue Lice, slik at fellene opererte slik Blue Lice ønsket det. Det var 149 105 individer laks i oppdrettsmerden under testperioden. Lakselusnivået i uke 50 var på 0,34 voksne hunnlus, 0,8 bevegelige lus og Lusefellene ble plassert i seks forskjellige områder inne i merden, slik at de til sammen dekket størsteparten av merdens overflate. For hvert av de seks områdene ble det satt ut tre feller fordelt på én, tre og seks meters dybde. Felles for alle fellene var at de var plassert ca. 2 til 3 meter ut fra notveggen for å unngå gnag på nota. I hvert område var de tre lusefellene enten betegnet som aktive, det vil si med lukt- og lysstimuli, eller passive, det vil si uten lukt- og lysstimuli. Dette oppsettet ble valgt for å kunne teste effektiviteten til lukt- og lysstimuli i lusefellene, det vil si om lakseluslarver vandret inn i Lusefellene. For å kunne validere lusefellenes effektivitet var det nødvendig å kjenne til forekomst av lakseluslarver i merden. Vi brukte elektriske planktonpumper for filtrering av store mengder vann i samme testmerd. Planktonpumpene ble satt ut ca. seks meter fra notveggen for å unngå at pumpene kom i kontakt med nota. Pumpene ble også plassert slik at pumpene ikke kunne påvirke fangsteffektiviteten til lusefellene. På samme posisjon i merden ble tre planktonpumper plassert rett over hverandre ved ca. én, tre og seks meters dybde. Disse dybdene sammenfaller med dybdene til Blue Lice sine lusefeller. Vi benyttet et forfilter for å hindre at partikler større enn 1000 μm ble med i prøven og deretter ble partikler større enn 125 μm filtrert fra vannet. Til hver planktonpumpe var det koplet opp et flowmeter som registrerte filtrert vannvolum. Basert på totalt antall kopier av lakselus-DNA kan antallet lakseluslarver (sum

av naupliier og kopepoditter) estimeres i hver av planktonprøvene. Lakseluslarver ble samlet inn kontinuerlig av pumpene i samme periode som lusefellene til Blue Lice stod i merden.

Lusefellene og planktonpumpene var plassert slik at alle strømretninger og -styrker inne i merden ble dekket, og de var funksjonelle samtidig i 12 timers sykluser. 12- timersperioden fra kl. 06:00 til kl. 18:00 ble definert som dagsyklus og perioden fra kl. 18:00 til kl. 06:00 som nattsyklus. På denne måten kunne effekten av tiltreknings-stimuliene i lusefellene kombinert med dagslys og mørke, bli validert. Når det skulle tas prøver fra lusefellen, ble først halvparten av lusefellene tatt opp fra merden, så ble planktonpumpene slått av, og deretter ble resten av lusefellene tatt opp av merden. På denne måten representerte data fra planktonpumpene den gjennomsnittlige innsamlingstiden til lusefellene. Når lusefellene skulle settes tilbake i merden ble dette gjort etter samme prinsipp. Filterduken tatt av hver enkelt lusefelle, brettet sammen med fangstsiden inn, og lagt enkeltvis i en egnet beholder med 96 % etanol. Fra hvert oppsamlingskammer knyttet til NINAs planktonpumper, ble saltvannet silt fra planktonet og planktonprøven overført til en egen prøveflaske med 96 % etanol. Alle prøver ble lagret i beholderne og flaskene og fraktet til NINAs genetikklaboratorium for analyser.

Det ble samlet inn planktonprøver i tre sykluser. Under tredje syklus måtte imidlertid forsøket avbrytes tidligere enn planlagt fordi Bremnes Seashore hadde besluttet at testmerden skulle avluses.

Laboratorieanalyser

Følgende prosedyre ble brukt for å frigjøre eventuell luselarver fra filterdukene til Blue Lice sine lusefeller. Filterduken ble tatt forsiktig ut av beholderen med en steril pinsett og overført til en stor trakt. Etanolen i beholderen ble så filtrert gjennom et 100 µm Spectra/Mesh filter (47 mm diameter) ved hjelp av en Pall filterholder og en Sartorius membranpumpe. Beholderen ble så fylt med springvann, korken satt på og ristet kraftig, før springvannet ble filtrert på samme filter som etanolen. Dette ble gjentatt to ganger for å sikre at ingen luselarver ble igjen i beholderen. I trakten ble filterduken brettet varsomt ut med en pinsett slik at fangstsiden av filteret pekte ned

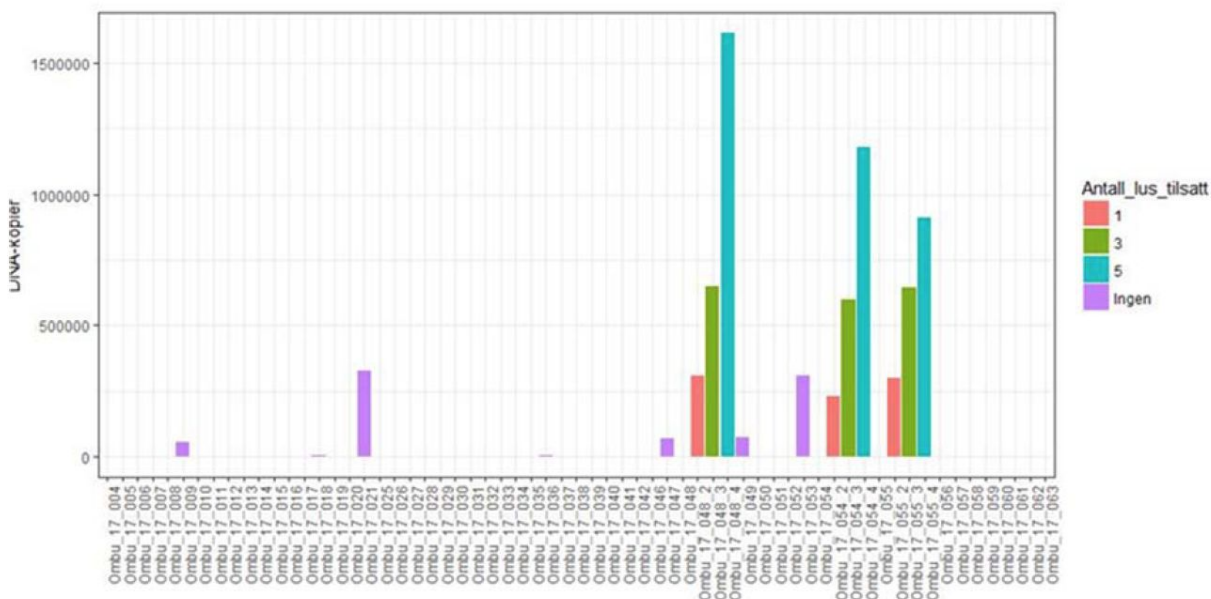
i trakta. Filterduken ble nå tilbakespylt med rikelig mengde springvann med trykk, og dette vannet ble filtrert gjennom det samme filteret som etanolen i beholderen. Deretter ble filterduken vrent nede i trakta slik at motsatt overflate også ble tilbakespylt. Så ble filterduken vrent en tredje gang slik at fangstsiden igjen pekte ned i trakta. Nå ble filterduken spendt stramt over trakta og tilbakespylt for andre gang. Alt vann som ble spylt ned i trakten ble filtrert gjennom det samme 100 µm filteret. Dette filteret ble så tatt ut av filterbeholderen og lagt ned i en egen skål med lokk. Filteret ble fotografert og undersøkt i en Olympus SZX 16 stereolupe med forstørrelse for å påvise eventuelle luselarver før DNA-analysen. Etter fotografering ble filteret brettet forsiktig sammen og lagt ned i et 2,0 ml Lysing Matrix E rør (MP Biomedicals) og tilsatt ATL buffer. For hvert filter ble utstyret klorert for å unngå DNA-kontaminering mellom prøvene. Prøvene fra NINAs pumper ble opparbeidet på en lignende måte. For å få kunnskap om antall DNA-kopier i en lakseluskoepoditt, ble et kjent antall koepoditter tilsatt enkelte prøver. Til dette ble det benyttet en filterduk fra en lusefelle som var spent opp over en trakt og allerede tilbakespylt tre ganger. Filterduken ble spylt på nytt over et nytt 100 µm filter. Deretter ble dette 100 µm filteret tilsatt et kjent antall koepoditter av lakselus før det ble mikroskopert og brettet sammen ned i en 2,0 ml Lysing Matrix E-rør tilsatt ATL-buffer. Matrix E-rørene med filter og ATL-buffer ble videre homogenisert ved hjelp av FastPrep 24 classic instrument (MP biomedical). Etter homogenisering ble proteinase-K tilsatt for å frigjøre DNA. Deretter ble DNA isolert fra lysatet ved hjelp av DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), hvor en modifisert protokoll ble benyttet. Kvantifisering av antall DNA-kopier av lakselus ble utført med en dråpe-digital-PCR (ddPCR)(Biorad) ved hjelp av en artsspesifikk markør.

5. Oppnådde resultater, konklusjon og diskusjon

Resultater og kommentarer

DNA-analyser av innholdet i lusefellene viste liten forekomst av lakseluslarver. Basert på en sammenligning med antall DNA-kopier i prøvene som var tilsatt henholdsvis én, tre og fem lakseluslarver på lab, konkluderer vi med at prøve 21 og prøve 53 inneholdt én lakseluslarve hver, og at de andre fellene ikke inneholdt noen lakseluslarver (figur 1). Prøve 21 ble tatt fra en aktiv lusefelle som stod på én meters dyp om natten mellom 14. og 15. desember, mens prøve 53 ble tatt fra en passiv lusefelle som stod på seks meters dyp om natten mellom 15. og 16. desember (vedlegg 1). I og med at naupliier og kopepoditter har omtrent like mange DNA-kopier (Ingebrigtsen 2017), kan vi ikke med sikkerhet avgjøre hvilket larvestadium som ble påvist i de to fellene, men det er grunn til å anta at det var kopepoditter i og med lusefellene er designet for å fange dette lakselusstadiet.

Det ble også påvist DNA-kopier fra lakselus i prøvene 9, 18, 36, 47 og 49. Disse prøvene kom fra både aktive og passive lusefeller og representerte alle tre dyp. Antall DNA-kopier er ikke stort nok til å konkludere med at de representerer lakseluslarver. Mest sannsynlig er det DNA fra fragmenter av lakselus.



DNA-analyser av filtratene fra NINAs pumper viser at det under feltforsøket var omtrent 0,2 lakseluslarver per m³ tilsvarende 20 lakseluslarver per 100 m³. Disse DNA-analysene skiller ikke mellom de tre ulike frittlevende larvestadiene til lakselus, og antall kopepoditter per vannvolum er derfor ukjent. I andre studer er det vist at andelen kopepoditter i en oppdrettsmerd kan være mellom 5-15 %. Dersom dette kan brukes generelt, har det trolig vært rundt 20 kopepoditter per 100 m³ vann i forsøksmerden.

Lusefellene som Blue Lice har under utvikling, fungerte ikke optimalt under feltforsøket. Frigjøringen av luktstoffet (et såkalt kairomon) som skal virke tiltrekkende på kopepodittene, ble ikke frigjort i like stor grad som ønskelig, og lyset som også virker tiltrekkende på kopepodittene fungerte ikke like godt i alle de aktive lusefellene. Dersom ikke stimuli i lusefeller virker sterkt nok er det grunn til å anta at kopepoditter vil feste seg til laks fremfor å vandre mot lusefellene. I og med at det ble påvist få lakseluslarver i lusefellene, og de to lakseluslarvene som ble påvist, var i henholdsvis en aktiv og en passiv lusefelle, er det ikke tilstrekkelig grunnlag for å gi en god vurdering av lusefellenes effektivitet. Resultatet kan indikere at lusefellene ikke tiltrekker seg lakseluslarver i vesentlig grad, men i og med at

lusefellenes to stimuli (lukt og lys) ikke fungerte som de skulle, gir ikke dette studiet grunnlag for en evaluering av virkningen til stimuliene.

For å konkludere er denne valideringstesten gjennomført over et for kort tidsrom til å kunne konkludere med virkningen av system. For at næringen skal dra nytte av informasjon om systemets virkning foreslås det at det gjennomføres en lengre test med flere filteropptak for å sjekke virkningen over tid (helst i sommerhalvåret).

6. Hovedfunn

Tre til fem kulepunkter som oppsummerer hovedfunnene i oppnådde resultater

- DNA-analyser av innholdet i lusefellene viste liten forekomst av lakseluslarver.
- Ved kvantifisering av resultatene til planktonpumpene har det trolig vært rundt 20 kopepoditter per 100 m³ vann i forsøksmerden.
- Lusefellene som Blue Lice har under utvikling, fungerte ikke optimalt under feltforsøket. Frigjøringen av lukstoffet (et såkalt kairomon) som skal virke tiltrekkende på kopepodittene, ble ikke frigjort i like stor grad som ønskelig, og lyset som også virker tiltrekkende på kopepodittene fungerte ikke like godt i alle de aktive lusefellene.
- Resultatet kan indikere at lusefellene ikke tiltrekker seg lakseluslaver i vesentlig grad, men i og med at lusefellenes to stimuli (lukt og lys) ikke fungerte som de skulle, gir ikke dette studiet grunnlag for en evaluering av virkningen til stimuliene.

7. Leveranser

- Referat fra møter i referansegruppen
- Faglige delrapporter. NINA vil levere en rapport i form av et NINA-notat etter at valideringen er avsluttet.



- Sluttrapport
- Faktaark

Kilde:

Ingebrigtsen, H. 2017. Molecular quantification of sea lice in around sea cages. A study comparing the molecular quantification method qPCR against a conventional method. Master of Science, NTNU.