

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Fordypningsoppgave 2019
Veterinærhøgskolen

Isolater av *Saprolegnia* sp. fra villaks og oppdrettslaks – sammenligning av vekstegenskaper og følsomhet for borsyre.

Isolates of *Saprolegnia* sp. from wild salmon and farmed salmon – comparison of growth abilities and sensitivity to boric acid.

Marius Steen Dobloug
Kull 2014

Veiledere: Øystein Evensen, Håkon Torsvik, Ida Skaar

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Definisjoner og forkortelser	4
Innledning	5
Akvakultur i Norge	5
<i>Saprolegnia</i> sp.	6
Produksjonssyklus	12
Villaks i Norge.....	14
Kultivering	16
Mål for oppgaven.....	23
Materiale og metoder	25
Materiale	25
Metoder.....	28
Resultater	33
Vekstegenskaper ved overflateutsæd.....	33
Hemming av Vekstegenskaper ved overflateutsæd.....	34
Hemming av mycelvekst i tidlig fase	35
Hemming av mycelvekst i sen fase	36
Diskusjon	38
Vekstegenskaper ved overflateutsæd.....	38
Hemming av vekstegenskaper ved overflateutsæd.....	38
Hemming av mycelvekst i tidlig fase	39
Hemming av mycelvekst i sen fase	39
Konklusjon	41
Takk til bidragsytere	42
Summary	43
Referanser/kilder	44

Sammendrag

Saprolegnia sp. er en eggsporesopp (oomycet) som infiserer atlantisk laks og egg av atlantisk laks, samt en rekke andre fiskearter. Den kan gjøre skade på alle livsstadier i ferskvann.

Saprolegnia sp. er en ubikvitær og endemisk forekommende oomycet i ferskvann over hele kloden og det utgjør et betydelig økonomisk problem for lakseoppdrettsindustrien. Det utgjør også et problem for villaksen som er en truet populasjon som har blitt kontinuerlig mindre siden 1980.

Behandlingen av saprolegnia-infeksjoner hos infiserte egg eller laksefisk er i dag basert på bruk av formalin. Formalin er et potensielt karsinogen og bruken bør begrenses til et minimum. Det er et behov for å finne andre måter å forebygge og behandle saprolegnia-infeksjoner på. Borsyre har et potensiale som forebyggende middel, mens den behandlende effekten av borsyre er mer usikker. Effekten av borsyre har hovedsakelig vært testet ut på saprolegnia-isolater fra oppdrettslaks, mens isolater fra villfisk ikke har vært undersøkt for følsomhet ovenfor borsyre. I denne studien har vekstevenskaper og sensitiviteten overfor borsyre blitt undersøkt og sammenlignet for saprolegnia-isolater med opprinnelse fra villaks og fra oppdrettslaks.

I denne oppgaven er det vist at ulike isolater har ulike vekstegenskaper *in vitro*. Borsyre har også vist seg å være effektivt mot *Saprolegnia* sp. i høye konsentrasjoner, både når det gjelder vekst ved overflateutsæd og på hampefrø i tidlig og sen fase. Det er også vist forskjeller i følsomhet for borsyre mellom isolater fra villaks og oppdrettslaks.

Definisjoner og forkortelser

BNP – Brutto Nasjonalprodukt

FAO – Food and Agriculture Organisation

FN – Forente Nasjoner

PD – Pancreas disease

CMS – Cardio myopati syndrome

HSMB – Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse

UDN – Ulcerativ dermal nekrose

Sp – Species

S – Saprolegnia

Mg – Milligram

ml – Milliliter

UV – Ultraviolet

BKD – Bacterial kidney disease

IPN – Infeksiøs pankreasnekrose

PCR – Polymerase chain reaction

EU – Den europeiske union

EØS – Europeisk økonomisk samarbeid

GY – Glukose yeast

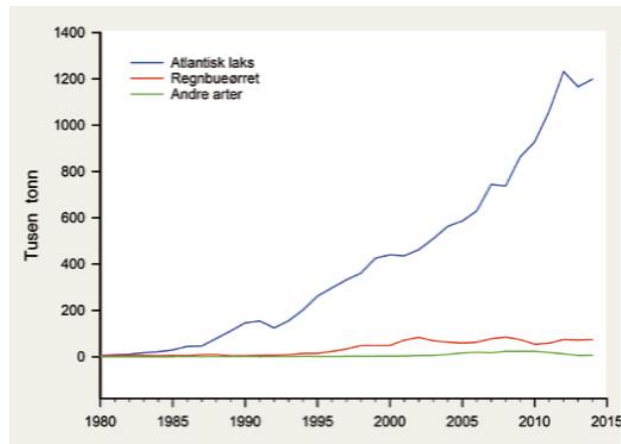
SAB – Sabourad dextrose agar

Innledning

Akvakultur i Norge

Norge er et rikt land med høy levestandard og et godt velferdssystem (8). Mye av dette skyldes oljen som er forvaltet på en særdeles god måte som har gjort at vår BNP per innbygger ligger i verdenstoppen (9). Landet består av en kystlinje på over 250 mil, med trange fjorder dannet under siste istid. Det tilsvarer verdens nest lengste kystlinje med store havområder til vår disposisjon når det gjelder havbruk (10). Golfstrømmen bidrar til et klima som er varmere enn den geografiske plasseringen skulle tilsi, og gir Norge et unikt miljø tilpasset mange ulike fiskeslag. Særlig den atlantiske laksen trives godt i Norske farvann.

Akvakultur har i dag blitt en av Norges største eksportvarer som mange mener kan ta over for oljen når den fases ut. Det er få nasjoner som produserer mer fisk enn oss og vi er verdens største produsent av atlantisk laks (11). Det hele startet på Hitra på 60-tallet når villaks fra 41 norske elver ble fanget og brukt til kultivering. I 1970 ble det omsider satt ut 20 000 smolt i verdens første akvakulturanlegg, drevet av Ove og Sivert Grøntvedt (12). Siden den gang har både biologisk kunnskap og teknologi utviklet seg i et voldsomt tempo og i dag finnes det over 1000 oppdrettslokaliteter i Norge. Det produseres over 1,2 millioner tonn laks per år i Norge og utviklingen har gått i et raskt tempo, illustrert på grafen til høyre (6). I 2018 ble det omsatt for 64,6 milliarder kroner på atlantisk laks i Norge (13) og regjeringens plan er å øke dette ytterligere, potensielt en femdobling av produksjonen innen 2050 (14, 15).



Figur 1: Akvakulturproduksjon av atlantisk laks, regnbueørret og andre fiskearter i Norge fra 1980-2014 (6)

Innen 2030 er det anslått at verden vil ha økt med ytterligere to milliarder mennesker. FAO, som er en organisasjon underlagt FN med hovedmål om å bekjempe sult, mener av den grunn at

moderne akvakultur er nødvendig for verdens folkehelse. Fiskeoppdrett er nemlig en svært energieffektiv form produksjon av animalsk protein og i den sammenheng bærekraftig. Det trengs bare 1,04 kilo fôr for å lage 1 kilo laks som er mye mer energigjerrig enn f.eks. storfeproduksjon som trenger 15 kilo fôr per kilo storfe (16). Men vekst i næringen kommer ikke uten sine utfordringer. PD, CMS, HSMB, alger og ikke minst lakselus er eksempler på aktuelle infeksjøs lidelser som begrenser produktiviteten i norsk akvakultur. Derfor har man for eksempel utviklet trafikklyssystemet som skal sikre forutsigbar og bærekraftig vekst fremover (17). Andre utfordringer i næringen er rømming av laks (18), samt etiske forhold rundt bruk av rensefisk (19). En annen utfordring er *Saprolegnia* sp. som tar livet av store mengder egg og ungfisk hvor bruk av de mest effektive medikamentene enten er ulovlig eller kan bli det.

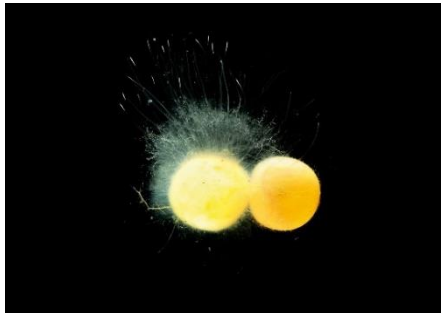
***Saprolegnia* sp.**

Generelt

Saprolegnia sp. er en eggsporesopp (oomycet) som forårsaker både primær og sekundær sykdom hos både oppdretts- og villaks (20). Oomyceten er ubikvitær i ferskvann, altså finnes den mer eller mindre overalt og særlig i jord. Dette er en oomycet med global utbredelse og uten rapportplikt ved sykdomsutbrudd. Den er hardfør og framkaller sykdom og død hos fisk og rogn. Mye av utfordringene stammer fra at selv om denne eggsporesoppen er lett å diagnostisere, forårsaker den store tap. Tapene kommer i alle produksjonsstadier som foregår i ferskvann (20). Man estimerer tapene av egg grunnet *Saprolegnia* sp. til å ligge mellom 10% og 20% (21, 22). Dette betyr at siden det produseres omtrent 500 000 000 egg av atlantisk laks per år kan man miste opp mot 100 000 000 egg. Da hvert egg koster minst 1,25 kroner står altså *Saprolegnia* sp. for et direkte tap som kan estimeres til opp mot 125 000 000 kroner.

Det finnes mange arter av *Saprolegnia* sp., men de to mest aktuelle patogene artene er *S. diclina* og *S. parasitica*. *Saprolegnia diclina* infiserer primært egg og *Saprolegnia parasitica* infiserer fisk, men det har vist seg å være en del overlapp og ikke et klart skille som tidligere antatt. Som nevnt tidligere er en *saprolegnia*-infeksjon lett å diagnostisere, noe som kan gjøres makroskopisk. Man kan også lage våtpreparater og se hyfene i mikroskop. Uavhengig av fisk, egg og

saprolegnia-art vil primærsymptomet være hvit «bomullslignende» vekst på huden og/eller gjellene til verten. I Norge er det kun *Saprolegnia* sp. som gir slik filamentøs bomullslignende vekst, som er grunnen til at denne diagnosen kan stilles makroskopisk. Hos voksen fisk er det typisk hud, hode eller gjeller som angripes, mens på egg starter det på døde egg før det sprer seg radially til nærliggende levende egg (23). Det er antatt at levende egg er motstandsdyktige mot sporer, men ikke hyfer (24). Man har også sett at *S. parasitica* benytter seg av flere ulike strategier for å infiserer egg (25). Infeksjoner opptrer også på yngel, men som regel sekundært til gjellebetennelse eller finneslitasje. Hos voksen fisk kommer det sekundært til hormonelle forandringer i kombinasjon med sår etter kamp om gyteplass (26).



Figur 2: *Saprolegnia* sp. på rogn (1).



Figur 3: *Saprolegnia* sp. på yngel (4).



Figur 4: *Saprolegnia* sp. på voksen fisk (5).

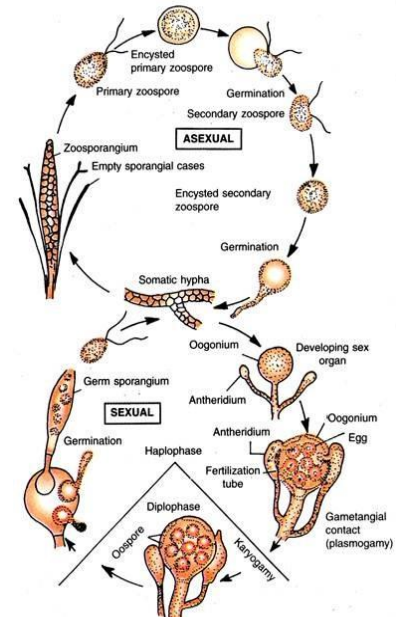
Taksonomi

Det taksonomiske navnet oomycet som gjerne brukes i litteraturen stammer fra de greske betegnelsene oo som er et prefiks for oion, som betyr egg, og mykes som betyr sopp (fungi). Molekylær sekvensering har gjort at man nå har taksonomisk plassert oomycetene nærmere algene enn soppene, men de omtales fortsatt av svært mange som en sopp eller som en sopp-lignende mikroorganisme (20). Det skyldes flere likheter med soppene. Både fungi og oomyceter har filamentøs (trådformet) hyfevekst som danner nettverk kjent som myceler (22). Det finnes to typer saprolegnia-hyfer; intramatrikale og ekstramatrikale. De intramatrikale hyfene er korte og forankrer organismen til underlaget det vokser på. Her foregår blant annet enzymproduksjon som står for næringsopptaket via nedbrytning av cellulose, lipider og proteiner som så absorberes. Den andre typen er de ekstramatrikale hyfene som er mye lenger og primært septumløse (med få unntak) med vekst vekk fra underlaget og ut i alle retninger. Dette er den synlige delen av oomyceten og det er i disse hyfene reproduksjonsorganene dannes (3). Mycelene til både oomyceter og fungi er også i stand til å reprodusere både kjønnnet og ukjønnnet. Men det er det er

også mange ulikheter som reflekterer det genetiske skille mellom oomyceter og fungi. Oomyceter er diploide, fungi er haploid eller dikaryote. Celleveggen til oomyceter består av beta-glukaner og cellulose, mens fungi består primært av kitin. Kun Oomyceter er bevegelige og den kjønnede formeringen foregår på ulike måter. Det finnes også flere andre ulikheter (22).

Reproduksjon

Reproduksjonen til *Saprolegnia* sp. begynner etter en periode med vekst ved god næringstilgang. Dette gjøres kjønnet eller ukjønnet via vegetativ vekst og sporulering. Den vegetative veksten kan gjøres på to måter, fragmentering og gemmae-dannelse. Ved fragmentering vil hyfene deles i mange ulike segmenter og hvert fragment vil vokse og danne egne hyfer via celledeling. Ved gemmae-dannelse vil enden av en hyfe akkumulere næring og svulle opp. Den vil så løsne og germinere som gir egen hyfe-vekst. Etter fragmentering eller gemmae-dannelsen vil hyfe-endene som dannes sporulere i en prosess som kalles zoosporogenese. Da øker de noe i diameter og fylles av migrerte cellekjerner. Denne sigar-formede strukturen avgrenses så av en septum og kalles da et zoosporangium. Cellekjernene vil



Figur 5: Reproduksjonssyklus (3).

så videreutvikle seg til primære zoosporer med pæreform og to flageller. De frigis i vannet via en apikal pore i zoosporangiet og de primære zoosporene svømmer av gårde og sprer seg rundt i vannet rundt mycelet. De vil etter en kort periode lukke seg inne i cyster hvor blant annet flagellene endrer seg, før de frigjøres igjen og har en lengre svømmeperiode som sekundære zoosporer. Cystedannelse og zoospore-frigjøring kan de gjøre flere ganger, helt til de finner en passende vert. Dette heter polyplanetisme og øker infeksjonspotensialet til oomyceten (27). Når zoosporene har funnet et passende sted danner de en ny cyste som germinerer og lager egne hyfer som danner et mycel; en ny saprolegnia-koloni (3).

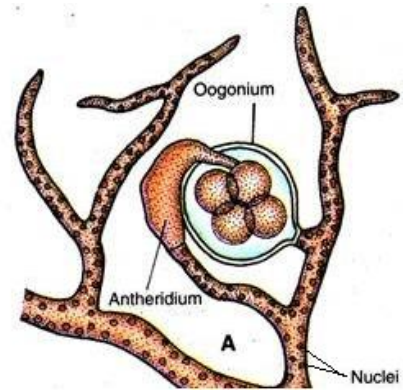
Ved den kjønnede formeringen vil hyfer i et mycel gjennomgå oosporogenese. Først danner endene på ekstramatrikale hyfer kjønnsorganene; hunnkjønnskomponenten oogonium og hankjønnskomponenten anteridium. Deretter dannes kjønnsceller via meiose, som ved annen

Marius Steen Dobloug – Kultivering av villaks, *Saprolegnia* sp. og borsyre.

kjønnet formering. Da produseres hunncellen inne i oogoniumet og hancellen inne i anteridiumet. Anteridiumet vil så vokse rundt Oogoniumet og penetrerer det med et befruktningsrør, som illustreres i figur 5. Deretter vil anteridiumet pumpe sædcellene in i eggcellene som da befruktes. Disse befruktede eggcellene kalles da oosporer.

Etter hvert vil disse frigjøres fra oogoniumet og når de kommer i kontakt med et passende miljø vil de germinere. Da danner de et sporangium med bevegelige zoosporer som etter hvert frigis.

Disse zoosporene videreutvikles gjennom zoosporogenese på samme måte som ved ukjønnert formering. Hele reproduksjonssyklusen er illustrert i figur 6 (3). Det er den ukjønnerte formeringen som er vanligst, spesielt *in vitro*. Dette skyldes at den kjønnerte formeringen først og fremst benyttes ved dårlige forhold når organismen trenger mer genetisk materiale (28). Det er av betydning å kjenne til reproduksjonen til *Saprolegnia* sp., da det har betydning for patogeniteten. Særlig dette med at hyfer kan infisere både døde og levende egg, mens zoosporer bare kan infisere døde egg (24).



Figur 6: kjønnert formering (3).

Behandling av *Saprolegnia* sp. i dag

Saprolegnia-infeksjoner kan medføre tap på opp til 125 000 000 kroner årlig. Det var ikke noe problem frem til år 2002 fordi man da kunne behandle saprolegnia-infeksjoner med malakittgrønt. Men det ble da forbudt på grunn av stor toksisitet med mutagene, karsinogene og teratogene egenskaper (27, 29). Malakittgrønt skilles ekstremt langsomt ut av fisken og kan være toksisk for de som spiser fisk. I 2002 når malakittgrønt ble forbudt var kunnskapsnivået om *Saprolegnia* sp. lavt. Dette skyldtes av malakittgrønt hadde fungert så bra at man ikke trengte å vite noe mer om oomyceten. Først etter forbudet måtte man begynne å forske på *Saprolegnia* sp. for å finne alternative behandlingsmåter.



Figur 7: Malakittgrønt.
Foto: Marius Steen Dobloug.

Etter malakittgrønt begynte man å bruke formalin. Det gjør man fortsatt den dag i dag på godkjenningsskritak, selv om det er teratogent og karsinogent. Man kan også behandle

Saprolegnia sp. med bronopol, som ikke er fostermisdannende eller kreftfremkallende, men det er mindre effektivt og mer kostbart enn formalin. Som EØS land må vi forholde oss til EU-lovverk og det er antatt at det vil kunne komme et forbud mot formalin gjennom EU før eller siden, da det allerede har blitt forbudt i flere land (30). Derfor er det ønskelig å finne et alternativ til formalin som både er effektivt, trygt og økonomisk gunstig før et forbud kommer. Dette alternativet kan potensielt være borsyre.

Formaldehyd løst i vann heter formalin. Det har den kjemiske formelen $\text{CH}_3\text{-CHO}$ og er det mest vanlige antiseptikumet til fisk og egg. Det har vært brukt siden 1930-tallet med god effekt mot encellede parasitter som *Ichthyobodo necator* (også kjent som Costia) og *Trichodina* sp. Formalin har noe effekt på *Gyrodactylus salaris* og flere bakterielle infeksjoner. Det har også effekt mot *Saprolegnia* sp., men er ikke like effektiv som forgjengeren malakittgrønt. Likevel anses formalin som bedre enn dagens andre alternativ, bronopol. Formalin kan irritere slimhinner, skade gjelleepitel og muligens gi myokarddegenerasjon (29). Men dette er primært ved høye doser, da formalin har god sikkerhetsmargin så lenge man følger anbefalte doser. I dag finnes ikke noe preparat som er markedsført i Norge, men man tar inn *Aquacen* på godkjenningfritak (31). Dette er et formalinpreparat som er markedsført i Spania og bruk er tillatt etter forskrivningskaskaden. Merk at dette fritaket kun gjelder for bruk i ferskvann. Det har vært brukt til å vært brukt til behandling av luseinfestasjon i sjøfør det ble avklart at *Aquacen* kun kan benyttes i ferskvann (32). Skal man bruke formalin i ferskvann gjelder det å blande ut *Aquacen*, som består av 37% formaldehyd, i fortykning 1:4000 grader fortykning. Enkelt omregnet gir dette 100 mg formaldehyd per liter vann og anbefalt behandlingstid er 30-45 minutter. Fisken skal aldri behandles i over 60 minutter. For at formalinen skal ha ønsket effekt er det viktig at det lagres i mørke omgivelser og i romtemperatur. Hvis det kjøles ned eller eksponeres for lys kan løsningen polymerisere til paraformaldehyd som er svært toksisk og kan drepe fisken (29). Grunnen til at man ønsker å gå vekk fra formalin er at det har vist seg å være mutagent og/eller karsinogent, som har ført til forbud mot bruk i flere land. Mange tror at EU også vil følge etter som da kan ha betydning for bruken i Norge som er et EØS-land.

I dag er det kun et preparat med markedsføringstillatelse i Norge til behandling mot saprolegnia-infeksjoner. Dette er Pyceze vet. 50%, som inneholder bronopol og kan brukes på rogn og yngel.

Det er et mildt antiseptikum med fungicid effekt som kan brukes mot *Saprolegnia* sp. (33). Det har god sikkerhetsmargin på rogn, middels på yngel og er toksisk for smolt. Det er omtalt at omdanningsproduktene til bronopol i vann er mer toksiske og akkumulerende i vannmassene som kan ha negative miljøeffekter (34). Virkningsmekanismen er blokkering av thiolholdige enzymer i mikrobens cellemembranen som gir lekkasje og celledød (35). Ved behandling faller *Saprolegnia* sp. av i flak og kan manuelt fjernes fra tanken. Riktignok er bronopol gjerne brukt til forebygging (36) da det har best effekt før man makroskopisk kan se soppen. Pyceze (bronopol) er både dyrere og har dårligere effekt etter utbrudd enn Aquacen (formalin). Dette gjør at de fleste oppdrettere velger formalin fremfor bronopol (29). Riktignok er det også oppdrettere som bruker begge deler; bronopol til forebygging og formalin ved utbrudd.



Figur 8: Pyceze vet.
Foto: Marius Steen Dobloug.

Borsyre og dets salter har lang historie som virkemiddel i både matvareindustrien og legemiddelindustrien. Det produseres ved å blande boraks i syre (gjerne saltsyre). Dette gir utfelling som kan utvinnes og selges i pulverform. Pulveret kan man blande ut i vann til ønsket konsentrasjon. Tidligere ble borsyre brukt som konserveringsmiddel, men er nå forbudt da man oppdaget at det var giftig ved direkte konsum (37). Det har også blitt benyttet som både baktericid, fungicid og antiseptika siden 1860. Det er nå omtrent 200 registrerte pesticider alene med borsyre eller dets salter som aktiv ingrediens. Det brukes også mot enkelte soppinfeksjoner på mennesker og har vist seg å ha stor sikkerhetsmargin ved bruk på øyerogn og plommesekeyngel. Det viser også lovende resultater ved kontroll av *Saprolegnia* sp. *in vitro*. Ved en konsentrasjon på 0,2 mg/ml er det observert nedsatt mycelvekst og sporeaktivitet. Ved 0,8 mg/ml hemmes germinering og vekst fullstendig. *In vivo* viser det også gode resultater ved noe høyere doser (30).

En utfordring ved bekjempelse av *Saprolegnia* sp. er at denne eggsporesoppen kan danne biofilm (38). Dette er en virulensfaktor som man også ser hos mange andre mikrober, særlig bakterier. Et eksempel på dette er Stafylokokker som kan gi problemer innen humanmedisin på grunn av bakteriens evne til å danne biofilm på katetre og implantater (39). Biofilm er strukturerte samfunn som dannes av mikrober og gir feste seg imellom og til en overflate. De består av en

egenprodusert, slimlignende matriks hvor bestanddelene gjerne er polysakkarider, proteiner og mikrobens eget ekstracellulære genmateriale. Sammensetningen varierer basert på miljøet, men består som regel av 80% matriks og 20% mikrober. *Saprolegnia* sp. anses særlig som godt egnet til å danne biofilm da oomyceten secernerer enzymer i kombinasjon med apikal hyfevekst som gir godt feste til overflater (38). Hensikten er økt overlevelse og økt reproduksjon som kan gjøre *Saprolegnia* sp. vanskelig å bekjempe (39). Dette utgjør et problem i norske stamfiskanlegg, som bekreftes av at det er mer *Saprolegnia* sp. i utløpsvann enn innløpsvann i de fleste norske klekkerier (40) og man mener at kilden kan være biofilm (38). Man ser at hyfer i biofilm, særlig i de indre lagene, kan overleve behandling og deretter vokse og reprodusere. Konsekvensen av at *Saprolegnia* sp. kan danne biofilm er at den derfor mest sannsynlig er mye vanskeligere å bli kvitt hvis den først får etablert seg i et akvakulturanlegg (38).

På grunn av utfordringene rundt både biofilmproduksjon og nåværende, samt potensielle fremtidige, begrensninger på legemiddelbruk ved bekjempelse av *Saprolegnia* sp., går dagens kontroll primært ut på forebygging. Det viktigste er trolig å plukke døde egg så zoosporene ikke får dannet hyfer og infisert levende egg. I tillegg er det viktig å ikke ha for mye fôrrester eller annen organisk forurensning i karene, da dette gir gode vekstmuligheter for oomyceten (41). Anlegg med mye humus i inntaksvannet bør filtrere ut så mye de kan av dette, for eksempel gjennom en mikrofibersvamp eller skumplast (26). Andre tiltak som kan benyttes er ozonering eller UV-behandling av inntaksvannet som kan redusere mengden infektive saprolegnia-zoosporer (27, 42). Et siste forebyggende tiltak som noen benytter seg av er å tilsette små mengder salt i ferskvannet som hindrer oppveksten av oomyceten (43, 44). Det er ikke uvanlig å ha mellom 2 og 2,5 promille salinitet i settefiskanlegg (41).

Produksjonssyklus

Det er viktig å kjenne til dagens produksjonssyklus for laks i akvakultur, samt i naturen, da saprolegnia-infeksjoner kun gir sykdom i enkelte utviklingsstadier. Stamfisk strykes for rogn og melke på høsten. Dette blandes i en bønne og vann tilsettes for å gjøre sædcellene motile slik at de kan befrukte rognen. Dette gjøres vanligvis av stamfisk-produsenter (som Aquagen eller Benchmark Genetics) som deretter selger befruktet rogn til ulike oppdretterselskaper. Den

befruktede rognen legges på is og transporteres til kjøperen sitt settefiskanlegg. Når de ankommer anlegget legges de i klekkekar og etter ca. 250 døgngrader vil rognen klekke. Dette gjør at man basert på temperaturen i klekkekarene kan styre når klekkingen skjer og sikre jevn tilgang på fisk gjennom året, samt at kjønnsmodningen hos stamfisken styres med lys og vanntemperatur (45). Plommeseekyngelen klekkes uten fordøyelsessystem og lever på næring fra plommesekken i ca. 250 nye døgngrader. De er nå yngel som begynner å søke mot vannoverflaten etter næring og dette er tidspunktet for startfôring. Avhengig av vanntemperaturen vil de etter ca. 2 måneder nå parrstadiet som har størst variasjon i tidslengde. Lysstyrt parr kan utvikles til sjøsettingsklar smolt ca. 9-10 måneder etter klekking. Ved smoltifisering har fisken en kroppslengde mellom 10 og 24 cm. Å smoltifiseres betyr at de blir sjøsettingsklare ved at de utvikler økt aktivitet av enzymet Na-K-ATPasene i kloridcellene som ligger basalt i sekundærlamellene i gjellene. Da kan de pumpe ut salt som tas opp passivt og via vann/fôr og dermed overleve i saltvann. Det tar som regel 2-3 måneder og det er vanlig med nøye lysstyring i denne perioden (som regel om våren/førsommer for 0-åringen). Første måned er det 12 timer lys og 12 timer mørke, mens den andre måneden har man lys på 24 timer i døgnet. Dette simulerer lysmengden på våren som er da villaks smoltifiseres. Man måler nivå av Na-K-ATPasen og når det når et ønsket nivå er fisken klar for sjøsetting. Vanligvis settes 0-åringen på sjøen om høsten og 1-åringssmolt settes ut neste vår når de er blitt litt over 1 år gamle. Forskjellen mellom 0- og 1-åring er perioden de tilbringer som parr i anlegget. Etter sjøsetting brukes betegnelsen post-smolt. Påvekst-perioden er fra 12-18 måneder og ved slakt vil en norsk laks ha gjennomsnittsvekt på 5,2 kilo. Slakting skjer før fisken har blitt kjønnsmoden siden det vil gi utvendig karakteristika som gir nedgradering av kjøttkvaliteten.

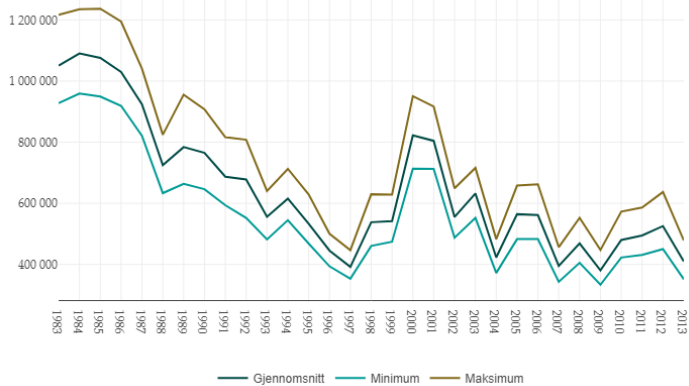
Den mest utfordrende delen av produksjonssyklusen når det gjelder saprolegnia-infeksjoner, er perioden i settefisk- og settefiskanlegget. Det er fra rognen er befruktet og satt i klekkekar til de smoltifiseres. Det er fordi *Saprolegnia* sp. kun lever i ferskvann og det er her rogn og fisk kan infiseres. I et settefiskanlegg har man gjerne flere avdelinger; klekkeri, yngelbrett, yngelkar, parrkar og smoltkar. Saprolegnia-sporer kommer inn via vannkilden til stamfiskanlegget og infiserer døde egg. Det er derfor viktig å plukke død rogn før det gir saprolegniose med dannelse av hyfer, siden hyfer kan infisere friske/levende egg (24).

Villaks i Norge

Det er ikke bare oppdrettslaksen som trives i norske fjorder. Vill atlantisk laks lever i farvannet utenfor kysten vår og kommer opp i flere hundre norske vassdrag hver sommer/høst for å gyte. Villaks er en del av norsk kultur som strekker seg langt tilbake i historien. Man finner flere historier om villaks i Norrøn mytologi, for eksempel i Snorre Sturlassons Edda fra 1200-tallet om Loke som gjemte seg fra gudene ved å gjøre seg om til en villaks. Et annet eksempel er de utallige stedsnavn i Norge oppkalt etter laksen og minst 4 kommuner med laksen på byvåpenet (Mandal, Vikna, Grane og Nordreisa). På 1800-tallet begynte sportsfiske i norske elver og i dag fisker omtrent 100 000 mennesker laks hver sommer. Laksen kan bli 1,5 meter lang, veie 40 kilo og det er Norges desidert mest populære fisk. Før i tiden var laks en viktig næringskilde for norske populasjon, mens den i dag har en større sosialkulturell verdi. Men laksefiske har også økonomisk verdi, da det anslås at lakseturisme gir ringvirkninger med omsetning på omtrent 1 milliard kroner årlig, som tilsvarer mange årsverk (46).

Dessverre er dagens populasjon av norsk villaks på vei ned. Av totalt 600 norske lakseelver har kun 426 produksjon av egen fisk. Av disse er 108 stengt for beskatning på grunn av for små bestander (47). Totalt kommer omtrent 500 000 fisk tilbake til norske vassdrag for å gyte hvert år, noe som er en halvering siden 1980 (48), illustrert i figur 9 (2). Dette er på tross av at beskatningen også er halvert. Det fanges nå mindre villaks enn noen gang, under 100 000 per år (48). Det er trolig mange årsaker til dette; overfiske, lakselus, *Gyrodactylus salaris*, forsuring, overgjødning, miljøgifter, rømt

oppdrettsfisk, fremmede arter, redusert næring i åpne havområder, utbygging og dårlig vannføring på grunn av vannkraft er noen av hovedtruslene for villaksens overlevelse (2, 49, 50). En av de mest sentrale temaene er oppdrettslaksen sin innvirkning på villaksen. Man ser at oppdrettsnæringen sin påvirkning på villaksen er omtrent bare negativ og det er



Figur 9: Antall laks som har gått opp i norske elver fra 1983-2013 (2).

liten tvil om at oppdrettslaks er bidragsyter til villaksens svekkelse. Disse negative effektene gjelder næringsliv, fritidsfiske, genetikken, symbolverdien, rekreasjonsverdi og habitatsutbredelse (50). I dag er hovedproblemet lakselus som får unaturlig gode reproduksjonsmuligheter i oppdrettsmerder og deretter kan forårsake sykdom og død hos villaks, hvor særlig utvandrende smolt er utsatt. Det er anslått at mellom 80-98% av all utvandrende villakssmolt dør i havet uten å returnere til ferskvann og at dødeligheten er særlig stor det første året hvor mange aldri en gang når det åpne havet (7, 50). Dette tapet skyldes fysiologiske utfordringer (ved overgang fra ferskvann til saltvann), predasjon og lakselus.

Havforskningsinstituttet beregner årlig tap av villaks til lakselus til å ligge på omtrent 50 000 fisk, som utgjør 10% av den tilbakevendende villaksen per år. Disse 50 000 villaksene dør primært mellom Hordaland og Helgeland, hvor lusepresset er størst, mens lusedødeligheten var liten eller fraværende i resten av landet (51). Det kan for øvrig nevnes at oppdrettsnæringen også har en positiv effekt på villfisk ved at det bevilges en del midler til forskning som også kan komme villaksen til gode (50).

Villaksen er en anadrom fisk. Reproduksjonen foregår ved at voksen laks som har påvekstperiode i åpne havområder kommer tilbake til elven de ble klekket i for å gyte. Tilbakevandringen skjer hovedsakelig ved sommer og høst, men enkeltfisk vandrer også tilbake på våren. Som hovedregel kan man si at størst fisk går opp i elven først. Noen vandrer også tilbake til akkurat samme strekke i elva som de selv vokste opp i. Dette gjøres via en ufullstendig forstått mekanisme som kalles «homing» som fører til genetiske adskilte bestander av laks som er oppdelt etter vassdrag (50). Dermed har det gjennom evolusjon skjedd en tilpasning til det vassdragets spesifikke miljø som igjen gir avkom økt overlevelse. Noe feilvandring foregår likevel, som bidrar til en viss gunstig genetisk utveksling mellom vassdrag og mulighet til å kolonisere nye elver, samt en reduksjon i innavl. Når en laks ankommer elven begynner søket etter en laks av motsatt kjønn for å pare seg. Ved parringen legger hunnen først 1000-2000 egg per kg kroppsvekt i en gytegrep, etterfulgt av at hannen deponerer melken over dem. Dette foregår på grus over steinbunn i strømførende områder (50). Gytegruppen lager hun ved å slå med halefinne i grusen. De befruktete eggene dekkes så av grus som hunnfisken virvler opp med halen og da blir eggene som regel liggende trygt og tildekket på elvebunnen over vinteren. I løpet av vinteren vil omtrent 80% av hannfisken og 50% av hunnfisken dø, mye grunnet mangel på næring og skader etter

kampen for de gode gytegrøpene. På våren klekker eggene og ut kommer plommeseekkyngel. Den blir til yngel etter 5-6 uker måneder og så til parr ved 1 års alder. Etter 2-6 år til (avhengig av næringstilgang) er parren 10-20 cm og klar til å smoltifiseres. Noen parr kan også smoltifisere ved 1 års alder (50). Dette skjer over 3 måneder og når den er tilpasset saltvann vil den forlate elven om våren. Her lever de som regel i 1-5 år før de blir kjønnsmodne og returnerer til elven for å gyte (47). På grunn av store forskjeller når det gjelder genetikk, gytetid, veksthastighet og vandringsmønster i hver elv forvaltes villaks i Norge på elvebestandsnivå. Man vet i dag også at mesteparten av laksen som faktisk kommer tilbake til elven for å gyte ikke overlever høsten. Dette er blant annet på grunn av sår etter kamp om gyteplasser som deretter infiseres av *Saprolegnia* sp., som forekommer endemisk i alle ferskvannsmiljøer (27).

Fra om med 80-tallet har det vært registrert soppangrep på gytefisk i elv og har medført omfattende dødelighet. Særlig laks, ørret, sik og røye er utsatt, men det har også vært rapportert enkelttilfeller hos krøkle og harr. Registreringene økte i løpet av 90-tallet og i dag er det så utbredt at det ikke finnes noen oversikt. Det forekommer trolig mest hyppig hos kjønnsmoden fisk og kan da opptre som primæragens. Ellers er sykdomsutbrudd med *Saprolegnia* sp. på villfisk primært sekundært til sår, stress, forurensning og andre infeksjoner. Sår svekker hudbarrieren og gir en inngangsport for infeksjon. Stress i sammenheng med kjønnsmodning vil hos ørret føre til en reduksjon av slimceller i huden, noe som også trolig skjer hos laks. Dette svekker den mekaniske barrieren som huden utgjør, siden slimet bidrar til å fjerne infektive sporer. Forsøk hvor man har tilført stresshormonet kortisol i vannet ga økt mottakelighet for saprolegnia-infeksjoner (52). Et eksempel på primære infeksjoner som kan øke mottakeligheten er Ulcerativ Dermal Nekrose (UDN). Man vet riktignok ikke hva som forårsaker UDN, men primærmistanken er et hudvirus. Her ser man karakteristiske runde lesjoner med døde hudceller, vanligvis dorsalt på hodet, som gir grobunn for *Saprolegnia* sp. Dette er forøvrig en sykdom som har fått økt oppmerksomhet i år grunnet sykdomsutbrudd på villaks sommeren 2019 hvor UDN er en differensialdiagnose (53).

Kultivering

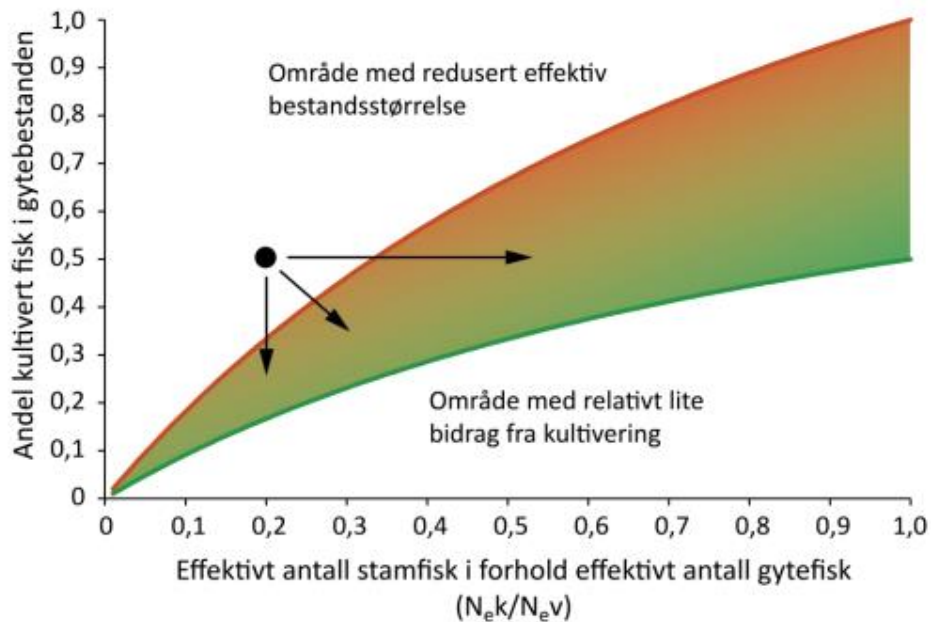
På grunn av villaksens stadig synkende populasjonsstørrelse har man begynt å kultivere villaks.

Det vil si at man lar fisk vokse opp i et beskyttet klekkerimiljø som gir økt overlevelse. Før kultiverte man for å øke bestanden, men i dag er det primært for å gjøre opp for menneskeskapt påvirkning. I mange vassdrag har dette blitt et helt nødvendig tiltak for å bevare den stedege stammen. Bak et kultiveringsanlegg ligger gjerne et pålegg om kultivering fra myndighetene til energiselskaper med konsesjon til å utvinne vannkraft i et vassdrag. Et visst antall individer av vill laks (og ørret) må da settes ut som kompensasjon for skaden en demning gjør på villfiskpopulasjonen. Da bruker energiselskapene ressurser på å engasjere grunneierlag og andre interesseorganisasjoner til å kultivere frem fisken for seg. Et eksempel på dette er Lågens Framtid i Numedalslågen som utfører kultivering for grunneierlaget som blir bevilget midler fra kraftselskapet som har en demning i Hvittingfoss (54). Det er nå stor yngelproduksjon nedstrøms Hvittingfoss, og da kan man vurdere å avbryte kultivering. Likevel fortsettes kultivering i Numedalslågen grunnet risikoen for smitte med *Gyrodactylus salaris* fra Drammensvassdraget. Når Drammensvassdraget omsider behandles, og friskmeldes, vil trolig kultiveringsarbeidet i Numedalslågen opphøre (55).

Kultiveringen følger en produksjonssyklus i kar som ligner mye på hvordan det gjøres i settefiskanlegg i oppdrett, bare at fisken vanligvis settes ut i elven som egg eller yngel. Prosessen starter med at man fisker kjønnsmoden laks på høsten og stryker for oppsamling av egg og melke. Dette vil så befruktes og transporteres til et kultiveringsanlegg som kan ligne på klekkerier man ser i oppdrett. Etter stryking og befruktning blir noen egg satt rett ut i elven, mens resten tilbringer vinteren i klekkeriet før de settes ut som yngel året etter. Utsett av fisk på rett måte kan styrke en populasjon, men hvis man praktiserer kultivering feil vil det kunne gi tap av genetisk variasjon og i lengden påvirke populasjonen negativt. Derfor er det viktig å kjenne til de mest sentrale prinsippene ved kultivering. Siden hele reproduksjonssyklusen til laks foregår i ferskvann er det også viktig å vite hva man bør gjøre for å redusere forekomsten av *Saprolegnia* sp.

Siden kultivering gir økt overlevelse av avkom sammenlignet med de som gyter naturlig, vil kultivert stamfisk få en økt sannsynlighet til å bringe sine gener videre. For at kultivering ikke skal gi tap av genetisk mangfold må man derfor velge ut individer som representerer en viss genetisk bredde. Ved stamfiske har man derfor som mål å få et stort nok antall til at du får et

representativt utvalg, men ikke så mange at mengden kultivert fisk kan føre til innavl i vassdraget. Det er altså noe som må tilpasses hvert vassdrag basert på andelen vill gytefisk i forhold til andelen kultiverte gytefisk. Dette illustreres i figur 10, hvor den grønne linjen er der man ønsker å ligge for å optimalisere effektiv bestandsstørrelse, noe som tilsvarer genetisk variasjon. Dette kan brukes til å avgjøre hvor mange stamfisk man bør ta ut hvis man ved andel kultivert fisk i bestanden og effektivt antall vill gytefisk. Hvis vassdraget består av 100 effektive ville gytefisk og 17% av disse stammer fra tidligere kultivering bør man ha som mål å oppnå 20 effektive kultiverte gytefisk. Er derimot 50% av gytebestanden kultivert fisk (som er den svarte prikken), må man enten redusere andelen kultivert egg/ungel som settes ut (loddrett pil) eller ta ut flere stamfisk (vannrett pil). Alternativt kan man kombinere dette (skrå pil) (7). For å gjøre dette må man ha informasjon om både antallet kultivert fisk i vassdraget og effektiv gytebestand, noe som kan være en utfordring. Derfor vil mange kultiveringsanlegg benytte seg av en generell minimumsregel som er 50 effektive stamfisk, per generasjonstid. En generasjon tilsvarer 5 år i de fleste vassdrag som betyr at du trenger minst 10 effektive stamfisk per år. Dette utgjør 5 fisk av hvert kjønn, som ikke er i slekt. Man får ikke vite om de er i slekt før man får svar på de genetiske prøvene, så det er viktig med representative utvalg og en viss sikkerhetsmargin på antall stamfisk (56).



Figur 10: Hvordan velge riktig antall stamfisk for å oppnå mest effektiv bestandsstørrelse (7).

Som et minimum skal kultiveringen kompensere for mengden stamfisk man tar ut, som vil si at hvert par må produsere to gytefisk. Dette vil si at man trenger et minimumsbidrag for hvert par. Dette vil etablere et lite antall kultivert fisk i gytebestanden som man etter noen år kan bruke videre til å bestemme antall stamfisk med figur 4. Som tommelfingerregel overlever 2% av utvandrende smolt frem til oppvandring i elv. 50% av fisken som vandrer opp deltar i gytingen. Ergo trengs minst 200 utvandrende smolt per par gytefisk. Anslått overlevelse på utsatt øyeroغن/plommeseekkyngel frem til de er utvandningsklar smolt ligger på 5%. Dette tilsvarer 4000 egg som er et minimum man bør kultiveres frem og sette ut per par. Da overlevelsen per innlegg varierer anbefales det å legge inn 5500 roغن (1 liter) per par (7). Hvis man kultiverer på grunn av mangel på gode oppvekstområder kan man sette ut smolt, men da disse ikke er like lenge i elven får de redusert homing og dobbelt så høy frekvens av feilvandring. Da må man sette ut minst 400 kultivert smolt. De kultiverte individene har også mindre grad av naturlig seleksjon og man runder det derfor opp til 500 smolt, siden de trolig vil ha økt dødelighet. Dette kan igjen dobles hvis man har 1:1 kjønnsfordelingen da det trolig ikke er så jevnt i naturen, men at enkelte hannfisk befrukter flere hunners roغن. Ergo setter man ut minst 1000 kultivert smolt per par ved kultivering på grunn av tap av oppvekstområder.

Effekten av kultiveringen bør evalueres årlig basert på hvor mange kultivert fisk som kommer tilbake for å gyte. For å finne ut av dette kan man benytte seg av genetiske analyser av skjellprøve fra stamfisken, alternativt kan kultivert fisk merkes med for eksempel finneklipping eller roغنfarging før utsett. Man ønsker også like mange hannfisk som hunnfisk, da 1 til 1 ratio gir størst genetisk variasjon i utvalget. Av samme årsak ønsker man et representativt utvalg med fisk av ulik alder og størrelse uten noen form for bevisst seleksjon. For å sikre dette må man gjerne fiske i ulike habitater i elva. Stamfisken skal fanges i samme elv man setter egg og yngel ut i igjen, da laksen i hvert vassdrag har egne gener tilpasset akkurat dette vassdraget (7). Man avliver hver fisk som har tegn på å være oppdrettsfisk og disse strykes ikke. Før man stryker vil en veterinær undersøke fisken og ta ut prøver som sendes inn til fiske-laboratorier for analyser. Dette gjøres helst under stamfisket så resultatene foreligger før strykingen. Både skjell-analyse og genetisk analyse er pålagt for stamfisk, hvor man leter etter individer fra oppdrett, tidligere kultivering eller hybridarter. Først undersøker Veterinærinstituttet skjellene visuelt med mikroskop/lupe. Oppdrettsfisk har jevne ringer grunnet kontinuerlig fôring, mens villfisk har

ujevne ringer grunnet ulik sesongmessig mattilgang. Omtrent 25% forkastes ved visuell skjellanalyse. Deretter vil NINA gjøre genetiske analyser hvor 15 % av de resterende individene forkastes. Det gjenstår da omtrent 62,25 % som kategoriseres som ekte villaks som kan brukes som stamfisk (57). De individene med gener som typer på oppdrett, hybridisering eller tidligere kultivering vil få eggene destruert, og derfor er det veldig viktig med nøye merking av både egg og prøver.

Stamfisken blir røktet i et par uker før stryking gjennomføres. Dette er fordi de bør sultes i 2 uker før stryking for å minimere mengden urin og avføring som følger med, samt at da tåler fisken bedre håndtering (58). For øvrig er det ikke uvanlig med infeksjon av *Saprolegnia* sp. på rogn, gjeller og hud hos stamfisk (57, 59). Derfor vil man ofte gjøre forebyggende formalinbehandling en ukes tid før stryking. Dette vil behandle parasitter som *Riboschyphidia*, *Scyphidia*, *Epistylis*, *Ichthyobodo* og *Trichodina*, som voksen villaks pleier å være noe infisert av (57). Ikke minst vil formalin også behandle *Saprolegnia* sp. som kan smitte over på rogn under stryking og gi et høyt smittepress i kultiveringsanlegget. Man er også redd for å kultivere rogn fra stamfisk som er infisert av BKD (*Renibacterium salmoninarum*), IPN og CMS med tanke på vertikal overføring, samt furunkulose (*Aeromonas salmonicida*). Derfor tar man prøver fra melke og rognvæske eller organer som sendes inn til PCR. Kun PCR-analyser for BKD er påbudt ved vanlig stamfiske (gjennom akvakulturdriftforskriften), men man skal også gjøre andre relevante undersøkelser basert på smittestatus i området. Hva som er relevante undersøkelser er ikke godt å si siden man har liten kunnskap om helsestatus på villfisk, men de vanligste tilleggsundersøkelsene er PCR for IPN, CMS og furunkulose. Skal man bruke rogn eller melke til genbank er det påbudt å teste for IPN og CMS i tillegg til BKD. Man kan også søke om screening for furunkulose (60). Ved gjennomføring av strykingen skal fisken være godt bedøvet og man klemmer først rundt gattet for å få ut urin og avføring. Deretter klemmer man midt på fisken og nedover for å få ut melke eller rogn. De første eggene bør forkastes, da de kan ha lavere kvalitet.

Ved befruktning legger man rogn fra en hunnfisk i en bønne og tilsetter melke fra en hannfisk. Dette blandes godt før man tilsetter vann som aktiverer sædcellene og muliggjør befruktning. Deretter desinfiseres den befruktede rognen i 10 minutter med salt og jod (med for eksempel preparatet Buffodine). Dette er et systematisk tiltak som hindrer innførsel av smittestoffer til

kultiveringsanlegget(61, 62). Deretter transporteres den befruktede og desinfiserte rognen til kultiveringsanlegget.

Håndtering av egg bør gjøres med stor forsiktighet så de ikke ødelegges, da død rogn gir økt forekomst av *Saprolegnia* sp. Fysiske påkjenninger bør holdes til et minimum, da rognen tåler dette dårlig frem til den når øyerognstadiet. Derfor bør man bruke vann for å få de ut av transportkassene og ned i klekkekarene. Rogn som ikke befruktes dør også, så hvis man har lav grad av befruktning blir smittepresset fra *Saprolegnia* sp. høyere. Et kultiveringsanlegg bør ha minst 90% befruktning og for å vurdere dette kan man blande 7 gram salt og 50 ml eddiksyre og plassere et representativt utvalg rogn i løsningen. De blir da gjennomsiktede og hvis befruktningen har vært vellykket kan man med lupe eller mikroskop se at cellene har begynt å dele seg. Det er typisk å gjøre dette et døgn etter befruktning, da ser man 4 celler. Alternativt kan man vente til 100 døgngrader har passert, da vil de befruktede eggene få en makroskopisk synlig hvit strek som tilsvarer fosteranlegget. Rognen kan også skades av direkte sollys og sterke lamper, så klekkekarene bør befinne seg i rom med svak/ingen belysning eller tildekkede kar (63).

Det vil alltid forekomme en del dødelighet av egg under fosterutviklingen som et resultat av mangelfull befruktning, fysisk traume, lys osv. De døde eggene koagulerer innvendig og blir hvite. Disse hvite eggene er en utmerket grobunn for *Saprolegnia* sp. (24). Det er helt avgjørende at røkteren hindrer saprolegnia-infeksjonen fra å spre seg til levende egg, noe som gjøres ved å plukke de døde eggene så fort som mulig. Derfor er plukking av døde egg er noe alle kultiveringsanlegg burde gjøre flere ganger i uken for å hindre spredning til levende egg (24). Hvis man har rogn som ligger så tett at man risikerer å støte bort i nærliggende rogn ved plukking av døde egg bør man utvise særlig forsiktighet ved plukking mellom 70-120 døgngrader, da eggene er mer ømfintlige når det gjelder fysiske traumer i denne perioden (63). Det er derfor anbefalt å bruke en egg-pipette eller annet verktøy som gjør at man kan suge ut et enkelt dødt egg uten å skade nærliggende, levende egg. Særlig kultiveringsanlegg for villaks er utsatt for saprolegnia-infeksjoner da det gjerne er mer primitive forhold her, både når det gjelder anleggets utforming og drift. Dette skyldes at slike anlegg i all hovedsak drives av spesielt interesserte laksefiskere uten samme økonomiske midler som ved drift i kommersielt oppdrett. Derfor har

heller ikke personellet samme nivå av utdanning eller erfaring innen fiskehelsearbeid. Det er ikke noe penger å tjene på dette, så de fleste som arbeider på et slikt anlegg har det på siden av en annen fulltidsjobb. Da sier det seg selv at det ikke blir like godt drevet som et stamfiskanlegg i oppdrettsbransjen som gjerne driftes av flere fulltidsansatte med personell på plass til enhver tid.

Ved 150 døgngrader kan man se fosterets øye gjennom skallet. Et godt drevet klekkeri mister ikke mer enn 10% av befruktet rogn frem til dette stadiet. Ved 220 døgngrader er øyeroggen mer fysisk motstandsdyktig og det er anbefalt å påføre øyeroggen et bevisst fysisk traume, kjent som «sjokking». Da kan man enten helle de i en bønne som dunkes i bakken, eller fysisk vaske de med rent vann. Dette vil de friske, befruktete eggene tåle fint, mens resten dør etter 2 døgn og kan plukkes ut. Ved klekking er det viktig å plukke eggeskallrester daglig for å hindre at *Saprolegnia* sp. blomstrer opp (24), samt øke vanngjennomstrømningen da plommeseekkyngelen har større oksygenbehov. Man må ikke øke for mye, da kan de presses ut klekkearets perforeringer og skades. Det er også viktig å dekke til karene i denne perioden for å sørge for at plommeseekkyngelen ikke skremmes, da dette vil gjøre at de bruker opp verdifull næring fra plommesekken på unødvendig energi i forbindelse med stress (63).

Når plommesekken er brukt opp er laksen i yngelstadiet. Det er da de fleste setter de ut i elven siden man ønsker naturlig seleksjon av individene så de ikke svekker villstammen i elven de settes ut i. Kun 2% av naturlig gytt rogn overlever lenge nok til å bli utvandringssklar smolt (64), men overlevelsesprosenten øker jo lenger du kultiverer fisken. På grunn av naturlig seleksjon og homing-egenskaper velger man likevel å sette ut ung fisk. Dette er primært yngel, men ofte settes også ut noen egg. Dette er også mer kostnads- og arbeidseffektivt å sette ut fisken tidligere. Når man setter ut er det også helt avgjørende at man benytter seg av deler i elva hvor det er lav produksjon av villaks fra før, så det ikke blir konkurranse om ressursene. Unntaksvis kan man sette ut smolt. Da vil overlevelsen øke, men det gir også økt feilvandring og mindre naturlig seleksjon. Slike unntak kan være mangel på oppvekstområder for yngelen eller ved bare gode produksjonsområder i vassdraget som uansett vil føre til konkurranse om ressursene med den naturlig produserte villfisken. Da bør man vurdere å ikke sette ut kultivert fisk i det hele tatt (7) og heller fokusere på habitatforbedring som å for eksempel forbedre gyteområder, lage nye produksjonsområder, forenkle vandringensruter eller restaurere inaktive gytebekker.

I Numedalslågen setter Lågens Framtid ut 10% av eggene samme dag som det strykes, mens resten går til klekkeriet for produksjon av yngel. En del av yngelen settes ut i sidevassdrag, mens andre settes ut ovenfor fosser som er for høye til at annen laks kan vandre opp hit. Disse utsatte individene kan likevel slippe seg ned og vandre ut når de smoltifiseres. Slik sikrer man en naturlig genbank av 2-4 generasjoner av kultivert fisk som går her oppe uten påvirkning av fisk med sykdom eller oppdrettsgener som på den måten bidrar til produksjon av villfisk (65).



Figur 11: Oversiktsbilde av klekkeriet til Lågens Framtid.
Foto: Marius Steen Dobloug.



Bilde 12: Nærbilde av en rad med rognkasser hos Lågens Framtid. Foto: Marius Steen Dobloug.

Mål for oppgaven

På grunn av formalin sin potensielle karsinogene effekt bør man finne alternative måter for å forebygge og behandle saprolegnia-infeksjoner på. I tillegg er det antatt at det kommer et forbud mot formalin fra EU som vi som EØS-land da mest sannsynlig må følge (30). Derfor var målsettingen å teste følsomheten til ulike saprolegnia-stammer opprinnelig fra oppdrettsfisk overfor varierende borsyrekonsentrasjoner. Dette ble sammenlignet effekten av malakittgrønt og bronopol som positive kontroller. Da populasjonen av vill atlantisk laks er kraftig redusert ønsker jeg også å rette fokus på villaksen. Siden *Saprolegnia* sp. fra villaks aldri er undersøkt tidligere

Marius Steen Dobloug – Kultivering av villaks, *Saprolegnia* sp. og borsyre.

ble vekst og sensitivitet ovenfor borsyre sammenlignet med saprolegnia-stammer fra kommersielle oppdrettsselskaper.

Samlet sett var målet for oppgaven å finne ut av om det er noen forskjeller når det gjelder vekst og/eller sensitivitet ovenfor borsyre mellom ulike stammer av *Saprolegnia* sp.

Materiale og metoder

Materiale

Studieenhet

Min studieenhet er 3 kjente saprolegnia-isolater fra oppdrett, 4 kjente saprolegnia-isolater fra villfisk og 2 ukjente saprolegnia-isolater fra villfisk i Numedalslågen. Alle er høstet fra enten stamfisk eller befruktet øyerogn.

Samtlige kjente isolater er samlet inn av Veterinærinstituttet og lagret i nedfrost tilstand. Det ble gitt tilgang til disse isolatene ble brukt i dette studiet.

VI 05413= Villfisk. *Saprolegnia parasitica*. Lagret fra 26.05.15 i hampefrø.

VI 04810= Villfisk. *Saprolegnia parasitica*. Isolert fra atlantisk laks i Norge. Lagret fra 26.05.15 i hampefrø.

VI 05416= Villfisk. *Saprolegnia diclina*. Lagret fra 26.01.11 i hampefrø.

VI 02741= Oppdrett. *Saprolegnia parasitica*. Isolert fra egg fra Atlantisk laks i Chile. Lagret fra 02.04.13 i hampefrø.

VI 02392= Oppdrett. *Saprolegnia parasitica*. Isolert fra atlantisk laks i Invergarry, Skottland. Lagret fra 23.04.15 i hampefrø.

VI 02739= Villfisk. *Saprolegnia diclina*. Isolert fra egg fra atlantisk laks i Chile. Lagret fra 02.04.13 i hampefrø.

VI 02736= Oppdrett. *Saprolegnia parasitica*. Isolert fra Atlantisk laks i Argyll, Skottland. Lagret fra 18.03.13 i hampefrø. Det mest patogene isolatet man kjenner til.

Ukjent saprolegnia-isolat 1 fra Numedalslågen= Isolatet ble samlet inn fra infisert rogn på kultiveringsanlegget til Lågens Framtid i Numedalslågen i 2018. Det ble sanket og plassert i Corner sentristar 50 ml plastglass med skrukork sammen med vann fra anlegget med temperatur på omtrent 5 °C. Dette ble lagret i kjøleskap med 2 °C i 2 dager før overføring til Veterinærinstituttet.

Ukjent saprolegnia-isolat 2 fra Numedalslågen= Isolatet ble samlet inn fra stamfisk i Hvittingfoss i Numedalslågen 12. oktober 2019. Dette skjedde under uttak av skjellprøver til stamfiskkontroll og denne fisken har aldri vært behandlet med kjemikalier. Saprolegnia-isolatet ble sanket ved å stryke en kniv lateralt på laksen, i kaudal retning, hvor det befant seg saprolegnia-lesjoner. Disse lesjonene på omtrent 1x2 cm areal og 2-3 mm tykkelse ble slik løsnet og fylt i Corner sentristar 50 ml plastglass med skrukork sammen med elvevann på 5 °C. Dette ble lagret i kjøleskap med 2 °C i 2 dager før overføring til Veterinærinstituttet.



Figur 13: Bilde fra stamfisket i Numedalslågen 12. oktober 2019 hvor *Saprolegnia* fra villaks ble sanket av Morten Kvammen, Lågens Framtid. Samtidig tas også ut en skjellprøve som man ser på bildet. Foto: Håkon Torsvik.

Studiepopulasjon

Populasjonen jeg undersøker er primært villaks med ekstra fokus på populasjonen i Numedalslågen via sammenligning av *Saprolegnia* sp. høstet fra denne elven med mer velkjente isolater.

Studieutvalg

Saprolegnia sp. fra villaks er høstet fra en tilfeldig fanget villaks ved stamfiske i Numedalslågen

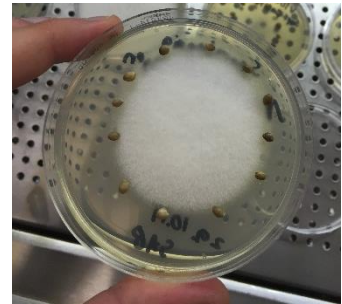
Marius Steen Dobloug – Kultivering av villaks, *Saprolegnia* sp. og borsyre.

12. oktober 2019, samt egg med makroskopisk synlig *Saprolegnia* sp. har blitt tilfeldig plukket ut av studiepopulasjonen i kultiveringsanlegget til «Lågens Framtid» i Numedalslågen. 7 andre isolater av *Saprolegnia* sp. fra kommersielt oppdrett og villaks er også tilfeldig utvalgt egg og fisk med makroskopisk synlig infeksjon.

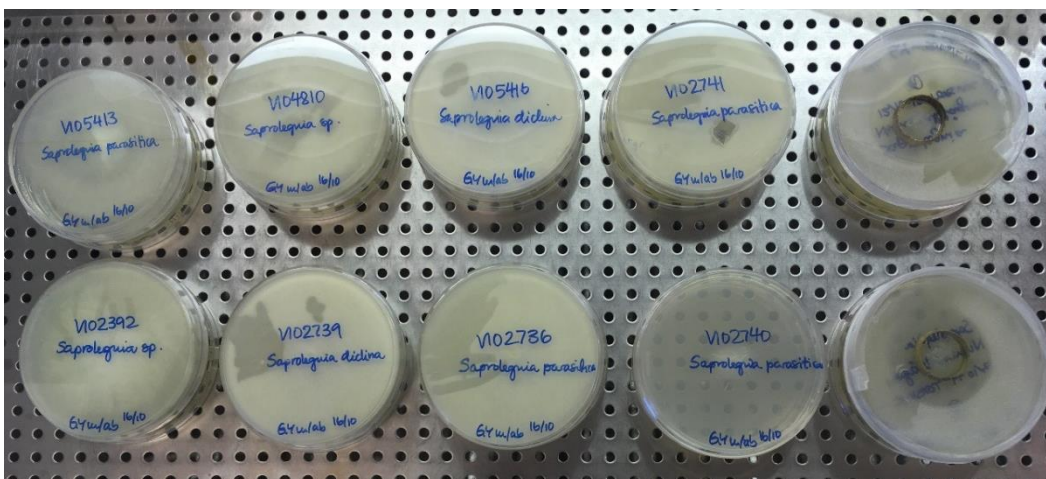
n=9.

Hampefrø, agar, vann og kjemikalier

- **Hampefrø:** Sterile hampefrø autoklaveres på 121 °C i 20 minutter og deretter nedkjølt. De ble så infisert etter HeMP-metoden (66).
- **Agar:** Agarene som benyttes til oppdyrking av *Saprolegnia* sp. er Glukose Yeast (GY) agar tilsatt antibiotika for å få renkultur. De ble så dyrket videre på Sabourad Dextrose Agar (SAB). Jeg har også støpt egne SAB-agarer med ulike konsentrasjoner av vann, borsyre, bronopol og malakittgrønt.
- **Borsyre:** H₃BO₃, M 61.83 g/mol (Merck).
- **Malakittgrønt:** SIGMA Malachite Green oxalate salt, C₂₃H₂₅N₂, C₂HO₄, 0.5C₂H₂O₄, 463,50 g/mol. Dette er positiv kontroll 1.
- **Bronopol, Pyceze 500 g/L:** Positiv kontroll 2.
- **Sterilt, destillert vann:** Dette ble brukt til å fortynne borsyren til konsentrasjoner på 0,4, 0,7 og 1,2 og malakittgrønt til 0,1 mg/ml.



Figur 14: HeMP-metoden.
Foto: Marius Steen Dobloug.



Figur 15: 10 ulike isolater på GY-skåler. Foto: Marius Steen Dobloug.

Metoder

Variabler

Saprolegnia-isolater, veksthastighet, følsomhet, kjemikalier og tid.

Datainnsamling

Data samles fra smitteforsøk på labben med ulike isolater av *Saprolegnia* sp.

Registrering av vekstegenskaper med vekt på radial utbredelse ved overflateutsæd målt i diameter.

Registrering av veksthemming av mycel på SAB-agar med vekt på reduksjon i radial utbredelse målt i diameter.

Registrering av veksthemming av mycel på hampefrø i tidlig fase med vekt på morfologi ved mikroskopi.

Registrering av veksthemming av mycel på hampefrø i sen fase med vekt på morfologi ved mikroskopi.

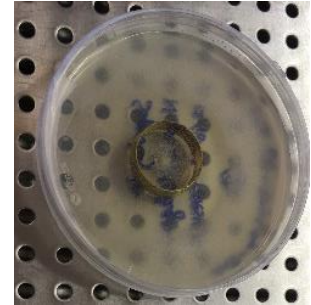
Det gjøres via studier av effekt av forebygging og behandling med borsyre, bronopol og malakittgrønt tilsatt i kulturene nevnt over. Det registreres forskjell i følsomhet og vekstegenskaper/-hastighet under fallende konsentrasjoner av borsyre, samt malakittgrønt og bronopol.

Laboratoriearbeid:

- **Registrering av vekstegenskaper:** Overflateutsæd av de ulike *saprolegnia*-isolatene fra GY agar til SAB-agar. Platina-podøse ble benyttet og spritet, brent og nedkjølt mellom hver kontakt. *Saprolegnia* sp. ble høstet fra GY-agar (Ida Skaar, Veterinærinstituttet). Det ble plassert i midten på en SAB-agar 22.10.19. Disse ble så inkubert på 20 °C. Etter 3 og 6 døgn måles diameter (cm), som er en kvantitativ makroskopisk karakterisering av veksthastigheten til de ulike isolatene.

Saprolegnia-isolat 1 og 2 fra villaks ble dyrket opp av Veterinærinstituttet 23.10.19 på

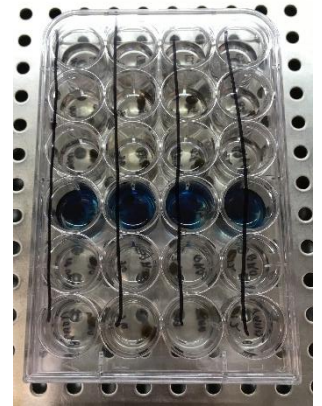
GY-agar med bakteriehemmende jernring (Jernia), samt 50 µg/l ampicillin og streptomycin. De ble derfra overført til midten av en SAB-agar 28.11.19 og inkubert på 20 °C. Etter 3 og 6 døgn ble diameter (cm) målt.



Figur 16: GY-agar med jernring.
Foto: Marius Steen Dobloug

- **Hemming av vekstegenskaper:** Legemiddel i aktuell konsentrasjon ble støpt inn i flytende SAB-medium til agaren. De ble så tilsatt 5 mm agar-plugger med *Saprolegnia* sp. etter 24 timers vekst på 20 °C. Hemming av vekst måles i reduksjon av radial utbredelse i diameter (cm) etter 1, 2 og 3 døgn.

- **Veksthemming av mycel på hampefrø i tidlig fase:** Hampefrø inkubert på 121 °C i 20 min og nedkjølt. De ble så plassert på en SAB-agar rundt et voksende saprolegnia-isolat og inkubert på 20 °C, etter HeMP-metoden. Etter 3 døgn ble hvert hampefrø plassert i hver sin brønn i en SIGMA 24 well flat-bottom plate. Deretter tilsettes 800 µl av de ulike legemidlene i ulike brønner. Dette ble inkubert på 20 °C i 24 timer før mikroskopisk undersøkelse med morfologisk karakterisering av vekst som ble scoret fra 1-3;



Figur 17: Brønner med isolater, legemidler og hampefrø klare for inkubasjon. Foto: Marius Steen Dobloug

- 1 = Ingen mycel-vekst.
- 2 = Noe mycel-vekst.
- 3 = Uttalt mycel-vekst.

- **Veksthemming av mycel på hampefrø i sen fase:** Hampefrø ble inkubert på 121 °C i 20 min og nedkjølt, infisert etter HeMP-metoden og plassert i en brønn med 792 µl vann. Dette ble inkubert på 20 °C i 24 timer før mycel-vekst bekreftes mikroskopisk. Deretter ble 8 µl av konsentrert legemiddel tilsatt til ønsket konsentrasjon. Dette ble inspisert mikroskopisk for mycel-vekst etter 24 timer og scoret fra 1-3;

- 1 = <33% av brønnen.

2 = 33%-66 % av brønnen.

3 = >66 % av brønnen.

- **Følgende ble gjort for hvert isolat:**

1. Utsæd *Saprolegnia* på SAB-agar → Vekstegenskaper målt i diameter.
2. SAB-agar + 5 mm agarplugg med *Saprolegnia* → Vekstegenskaper målt i diameter.
3. SAB-agar med 400 µl *Saprolegnia*-suspensjon + 5mm agarplugg med *Saprolegnia* → Vekstegenskaper målt i diameter.
4. SAB-agar med 0,4 mg/ml borsyre + 5 mm agarplugg med *Saprolegnia* → Hemming av vekstegenskaper målt i diameter.
5. SAB-agar med 0,8 mg/ml borsyre + 5 mm agarplugg med *Saprolegnia* → Hemming av vekstegenskaper målt i diameter.
6. SAB-agar med 1,2 mg/ml borsyre + 5 mm agarplugg med *Saprolegnia* → Hemming av vekstegenskaper målt i diameter.
7. SAB-agar med Bronopol + 5 mm agarplugg med *Saprolegnia* → Hemming av vekstegenskaper målt i diameter.
8. SAB-agar med 0,1 mg/ml Malakittgrønt + 5 mm agarplugg med *Saprolegnia* → Hemming av vekstegenskaper målt i diameter.
9. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + vann → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
10. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + 0,4 mg/ml borsyre → Kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
11. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + 0,8 mg/ml borsyre → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
12. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + 1,2 mg/ml borsyre → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
13. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + bronopol → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.

14. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + 0,1 malakittgrønt → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
 15. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø med vann → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
 16. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + etter 24 timers inkubasjon med vann tilsettes borsyre til 0,4 mg/ml → Kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
 17. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + etter 24 timers inkubasjon med vann tilsettes borsyre til 0,8 mg/ml → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
 18. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + etter 24 timers inkubasjon med vann tilsettes borsyre til 1,2 mg/ml → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
 19. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + etter 24 timers inkubasjon med vann tilsettes bronopol → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
 20. Utsæd *Saprolegnia* på hampefrø + etter 24 timers inkubasjon med vann tilsettes malakittgrønt til 0,1 mg/ml → Morfologi og kvalitative vekstegenskaper observert med mikroskopi.
- **Ulike tillaginger/suspensjoner/løsninger:**
1. Suspensjon av *saprolegnia*-sporer: Hvert isolat ble sådd ut fra SAB-agar til pea-broth, som er et medium som får *Saprolegnia* sp. til å sporulere svært godt. Hvert rør ble inkubert på 20 °C i 3 dager, prøven ble ristet og sporer ble telt i et Bürker tellekammer. Prøven ble fortynnet med en faktor på 2 og det ga 6,5 sporer per B-felt i gjennomsnitt som tilsvarer 10^6 sporer per ml.
 2. Borsyre fortynnet til 0.4, 0.8 og 1.2 mg/ml fra pulver: Det ble laget borsyreløsninger med konsentrasjoner på 40, 80 og 120 mg/ml som stamløsning og fortynnet til ønsket konsentrasjon. Alle løsninger og fortynninger ble gjort med sterilt, destillert vann.
 3. Malakittgrønt fortynnet til 0,1 mg/ml fra pulver: Det ble laget en stamløsning på 10 mg/ml som før bruk ble fortynnet til ønsket konsentrasjon. Alle løsninger og fortynninger ble gjort med sterilt, destillert vann.

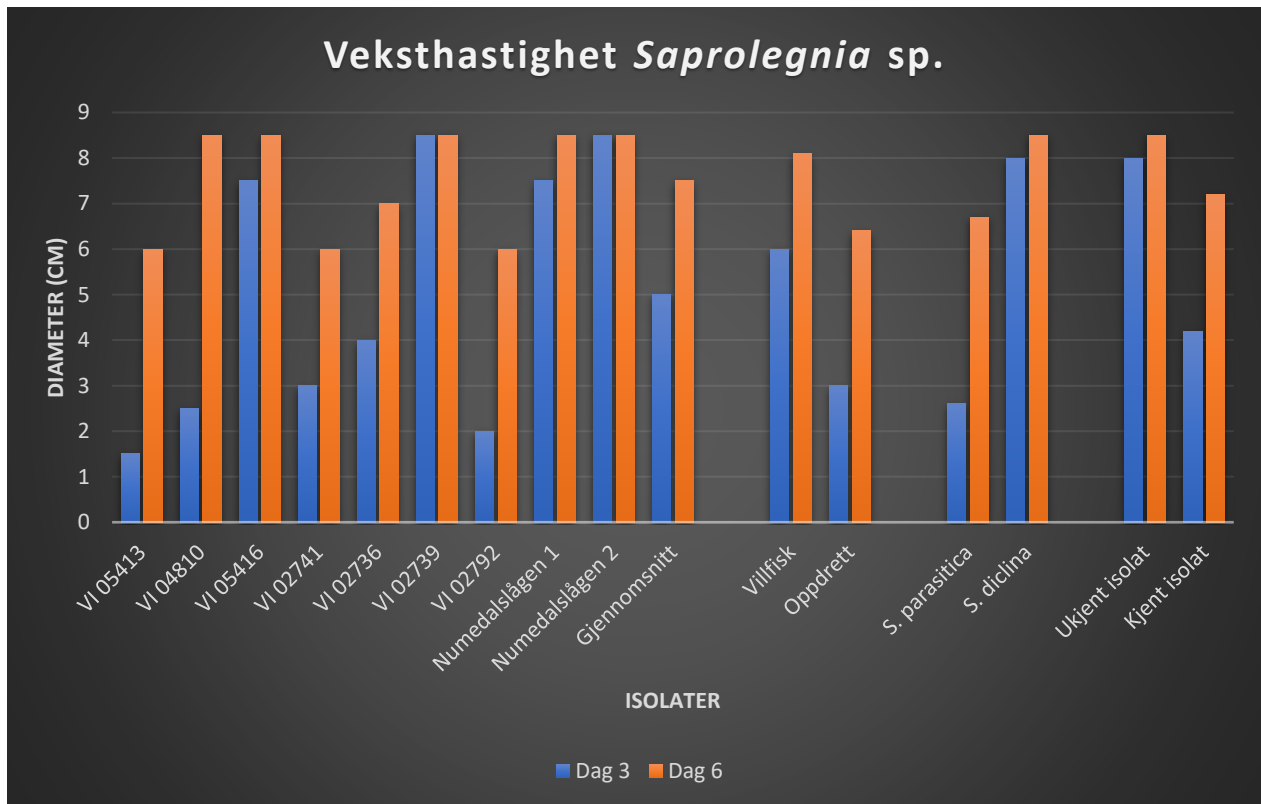
4. Agarar støpt av flytende SAB sammen med legemidler i ønsket konsentrasjon:
Flytende SAB-medium ble levert og holdt varmt på 45 °C i vannbad frem til bruk.
Tomme petriskåler ble tilsatt 1 ml av aktivsubstansene i en slik konsentrasjon at man fikk ønsket fortykning. Petriskålene med aktivsubstansene ble deretter tilsatt 19 ml flytende SAB-medium som ble blandet godt før det stivnet i romtemperatur.

Resultater

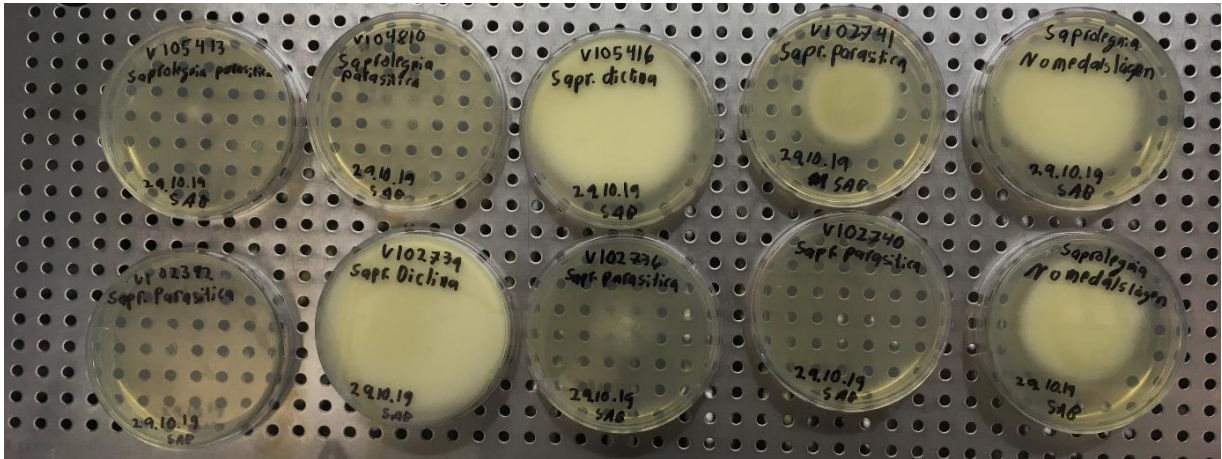
I denne oppgaven har jeg vist at ulike isolater av *Saprolegnia* sp. har ulike vekstegenskaper *in vitro*. Borsyre hemmer vekst av *Saprolegnia* sp. i høye konsentrasjoner, både når det gjelder vekst ved overflateutsæd og på hampefrø i tidlig og sen fase.

Vekstegenskaper ved overflateutsæd

I dette ble vekstegenskapene til de ulike isolatene undersøkt. Isolaterne fra villfisk, *Saprolegnia diclina*-isolatene og de ukjente isolatene fra Numedalslågen hadde klart best vekstegenskaper i dette forsøket. De sammenstilte resultatene viser måling av cm vekst i diameter etter 3 og 6 dager (figur 18-19).



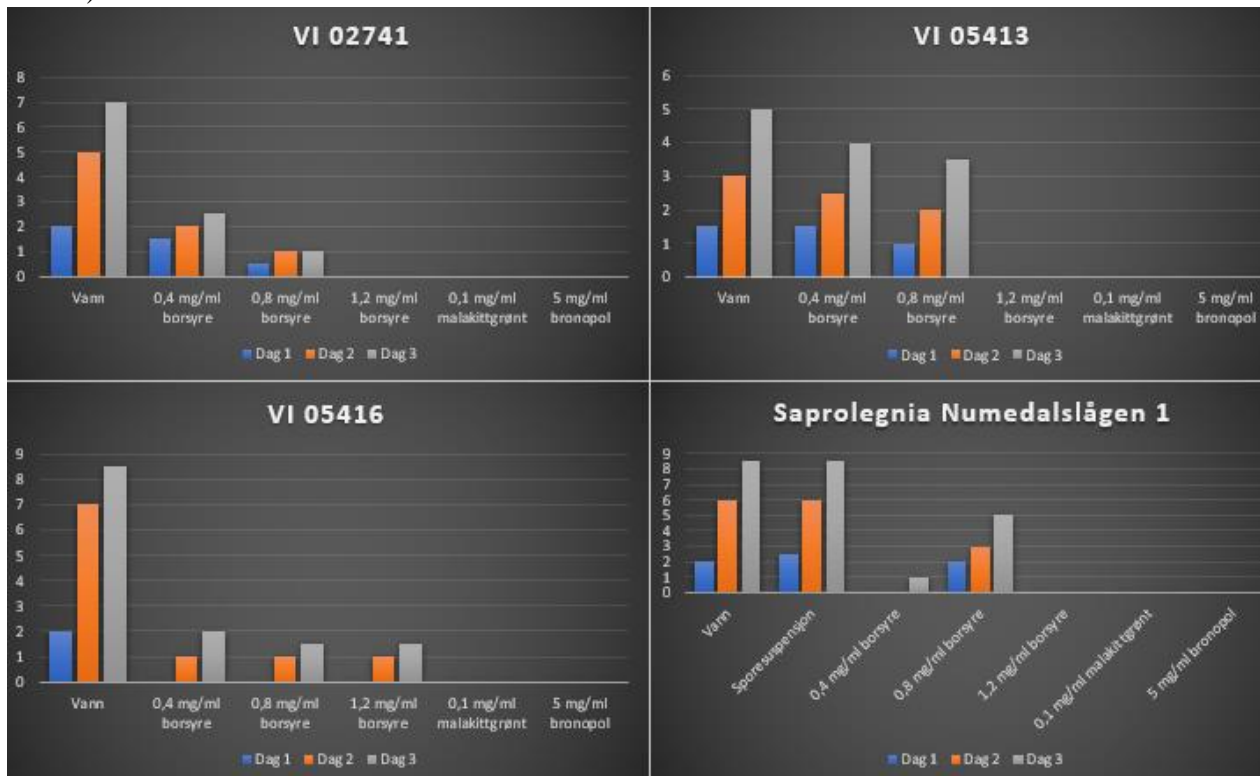
Figur 18: Vekstegenskaper hos ulike isolater.



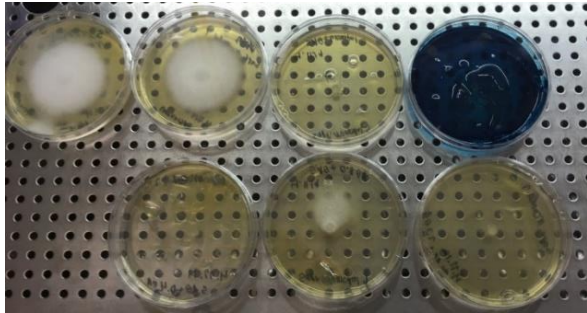
Figur 19: Samtlige isolater på SAB-agar etter 3 dagers vekst. Isolat VI 02740 fikk aldri vekst og ble ikke brukt videre.
Foto: Marius Steen Dobloug

Hemming av Vekstegenskaper ved overflateutsæd

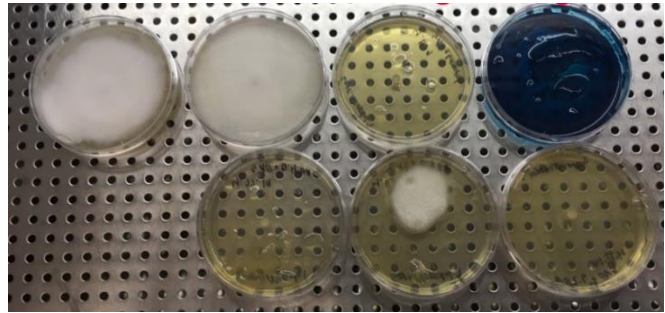
Økende konsentrasjoner av borsyre medførte en gradvis økning i vekstreduksjon hos de 4 utvalgte isolatene. Et unntak er ukjent isolat 1 fra Numedalslågen, som hadde bedre vekst ved 0,8 mg/ml enn 0,4 mg/ml. Resultatene viser måling av cm vekst i diameter etter 1, 2 og 3 dager (figur 20-22).



Figur 20: Hemming av vekstegenskaper hos 4 utvalgte isolater.



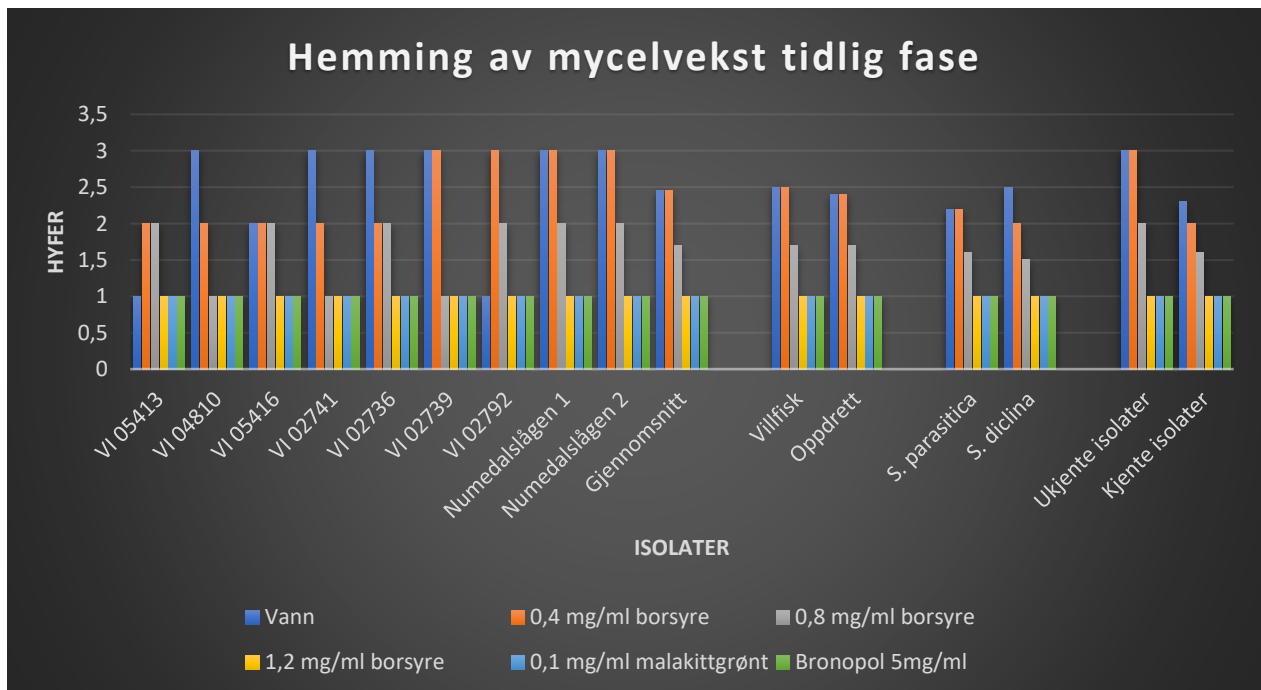
Figur 21. Hemming av vekst, isolat 1 fra Numedalslågen, dag 2. Foto: Marius Steen Dobloug.



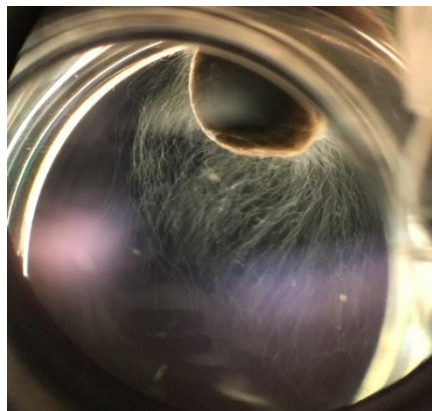
Figur 22. Hemming av vekst, isolat 1 fra Numedalslågen, dag 3. Foto: Marius Steen Dobloug.

Hemming av mycelvekst i tidlig fase

I dette forsøket ble det vist at borsyre hemmer veksten av *Saprolegnia* sp. på hampefrø ved konsentrasjoner over 0,4 mg/ml. 0,4 mg/ml ga liten/ingen grad av hemming, 0,8 mg/ml ga noe hemming, mens 1,2 mg/ml ga like god hemming som malakittgrønt og konsentrert bronopol. Det er relativt lik effekt av de ulike aktivsubstansene for de ulike isolatene, men de ukjente isolatene fra Numedalslågen skiller seg noe ut med bedre vekst når de eksponeres for 0,4 og 0,8 mg/ml borsyre. Resultatene etter 1 døgns vekst er gradert fra 1-3; 1= ingen hyfer, 2= noen hyfer, 3= mange hyfer (figur 23-29).



Figur 23: Veksthemming i tidlig fase.



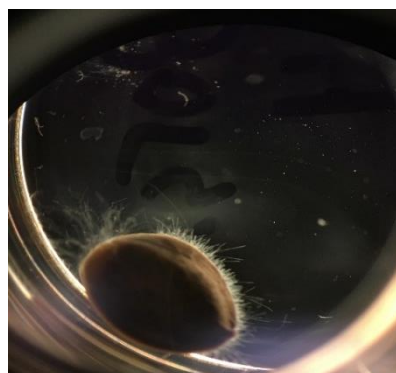
Figur 24: Isolat VI 02741 med vann. Mange hyfer. Foto: Marius Steen Dobloug.



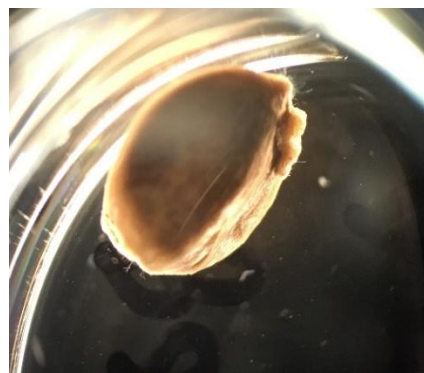
Figur 25: Isolat VI 02741 med bronopol. Ingen hyfer. Foto: Marius Steen Dobloug.



Figur 26: Isolat VI 02741 med malakittgrønt. Ingen hyfer. Foto: Marius Steen Dobloug.



Figur 27: Isolat VI 02741 med 0,4 mg/ml borsyre. Noen hyfer. Foto: Marius Steen Dobloug.



Figur 28: Isolat VI 02741 med 0,8 mg/ml borsyre. Noen (få) hyfer. Foto: Marius Steen Dobloug.

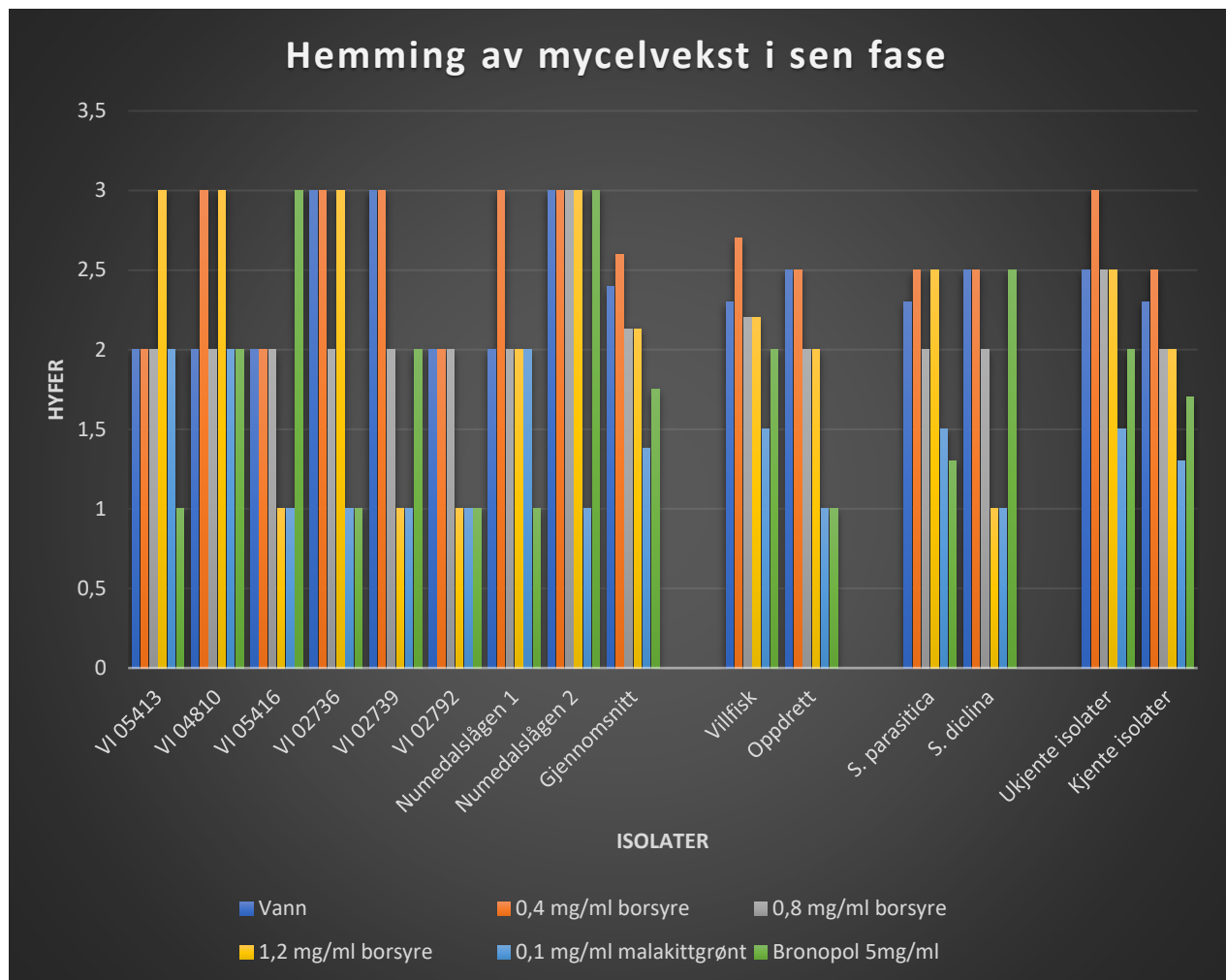


Figur 29: Isolat VI 02741 med 1,2 mg/ml borsyre. Ingen hyfer. Foto: Marius Steen Dobloug.

Hemming av mycelvekst i sen fase

I dette forsøket ble det vist at økende konsentrasjoner av borsyre kan hemme veksten av *Saprolegnia* sp. på hampefrø i sen fase av infeksjonen. Isolatene har noe bedre gjennomsnittlig vekst i 0,4 mg/ml borsyre enn i vann. Det er imidlertid ikke en like klar effekt trend for effekten av borsyre som ved forsøket gjennomført i tidlig fase. Enkelte isolater skiller seg ut, for eksempel *S. diclina*. Bronopol hemmer ikke veksten like effektivt som malakittgrønt. Villfisk-isolatene ble

mindre hemmet av samtlige aktivsubstanser enn oppdrett. Det samme ser man også på de ukjente isolatene fra Numedalslågen i sammenligning med de kjente isolatene (figur 30).



Figur 30: Veksthemming i sen fase.

Diskusjon

Vekstegenskaper ved overflateutsæd

Saprolegnia diclina hadde bedre vekstegenskaper i dette forsøket enn *Saprolegnia parasitica*. Dette kan forklares av at *S. diclina* generelt sett har bedre vekstegenskaper *in vitro*, eller at det tåler fryselagring bedre. Dette kan også være at dette er isolater av *S. diclina* med spesielt god vekst for arten.

De ukjente isolatene fra Numedalslågen hadde bedre vekstegenskaper i dette forsøket enn de kjente isolatene, noe som kan skyldes at de ukjente isolatene også er *S. diclina*, men dette er ikke undersøkt. Det som taler mot dette er at et av de ukjente isolatene var høstet fra en stamfisk, som vanligvis infiseres av *S. parasitica*. Alternativt kan et eller begge av de ukjente stammene være *S. parasitica*-isolater med over gjennomsnittlig gode vekstegenskaper for arten. En tredje mulighet er at *S. diclina* tåler fryselagring bedre enn *S. parasitica*. Det ukjente isolatet fra egg som har vært fryst ned er mest sannsynlig *S. diclina*, mens det ukjente isolatet fra stamfisk som trolig er *S. parasitica* ble høstet like før forsøkene begynte og derfor aldri fryst ned. Dette kan dermed forklare hvorfor både *S. diclina*-isolatene og de ukjente isolatene hadde overlegne vekstegenskaper i dette forsøket.

Isolatene fra villfisk hadde bedre vekstegenskaper i dette forsøket enn de fra oppdrett, som kan forklares av at dataen fra de ukjente isolatene hadde de beste vekstegenskapene og de inkluderes i dataen til villfisken. Potensielle årsaker til dette er diskutert i forrige avsnitt.

Hemming av vekstegenskaper ved overflateutsæd

Økende konsentrasjoner av borsyre medførte en gradvis økning i vekstreduksjon hos de 4 utvalgte isolatene.

Effekten var mest tydelig hos VI 02741 og VI 05413. Effekten var noe ujevn hos VI 05416 og

ukjent isolat 1 fra Numedalslågen, men trenden er fortsatt klar; borsyre hemmer veksten av *Saprolegnia* sp. Noe av avviket skyldes at SAB-mediet begynte å stivne når de siste gruppene med agar ble laget, som mest sannsynlig ga ufullstendig innblanding av kjemikaliene. Denne teorien forsterkes av at i enkelte av disse skålene var det kun vekst i en retning, som er karakteristisk for høyere konsentrasjoner av legemidler i enkelte områder av agaren.

Hemming av mycelvekst i tidlig fase

Også her kan man se at økende konsentrasjoner av borsyre gir økt hemming av veksten til *Saprolegnia* sp. hvor 1,2 mg/ml ga like god hemming som malakittgrønt og konsentrert bronopol.

De ukjente isolatene er mindre følsomme for eksponering for 0,4 og 0,8 mg/ml borsyre. Her kan gode vekstegenskaper ha kompensert for hemmingen.

En feilkilde er at den ene brønnen med vann for isolat VI 05413 fikk en dråpe bronopol i seg når bronopol ble tilsatt i en annen brønn. Det ble skyllet ut og rensert flere ganger, men det kan synes som det var nok rester igjen i brønnen til å hemme veksten.

Hemming av mycelvekst i sen fase

Dette forsøket viser også en gjennomsnittlig veksthemming av hyfevekst og myceldannelse på hampefrø i sen fase med økende konsentrasjoner av borsyre.

Et uventet resultat er at isolater i 0,4 mg/ml borsyre hadde gjennomsnittlig mer mycelvekst enn vann. En potensiell årsak kan være at ved uttalt mycelvekst kan borsyre provosere til ytterligere vekst («miljøstress»), men dette må i så fall etterprøves med ytterligere forsøk. En annen mulig forklaring er at enkelte brønner ble feilmerket eller at det ble sølt med veksthemmende kjemikalier i vann-brønnene.

Det er mindre tydelige forskjeller på veksthemmingen i sen fase enn ved forsøket gjort i tidlig

Marius Steen Dobloug – Kultivering av villaks, *Saprolegnia* sp. og borsyre.

fase. Dette kan skyldes at det gikk 24 timer før kjemikaliene ble tilsatt, noe som kan være litt lenge. Det var allerede betydelig mycelvekst på alle hampefrøene, og det gjorde bedømmingen krevende. Likevel ser man effekten tydelig i enkelte grupper, som for eksempel *S. diclina*.

Villfisk-isolatene ble mindre hemmet av samtlige aktivsubstanser enn isolatene fra oppdrett. Det samme ser man også på de ukjente isolatene fra Numedalslågen i sammenligning med de kjente isolatene. Dette kan skyldes at disse isolatene er noe mer motstandsdyktige, for eksempel på grunn av deres gode vekstegenskaper som kompensere for hemmingen. Her kan også deres dyrkning/plassering i kultur ha betydning; en form for *in vitro* attenuering.

I dette forsøket ser man at Bronopol hadde mindre effekt på veksthemning sammenlignet med malakittgrønt. Dette skyldes trolig at Bronopol (Pyceze) er et legemiddel med indikasjon på å forebygge saprolegnia-infeksjoner, og er ikke ment for behandling av etablerte infeksjoner.

Konklusjon

Målet for oppgaven var å finne ut av om det er forskjeller når det gjelder vekstegenskaper og/eller sensitivitet ovenfor borsyre mellom ulike stammer av *Saprolegnia* sp.

Det er tydelige forskjeller når det gjelder vekst hos de ulike isolatene. *Saprolegnia diclina* og de ukjente isolatene fra Numedalslågen viser langt bedre vekstegenskaper *in vitro* enn de andre isolatene. Når det gjelder sensitivitet ovenfor borsyre er villaks-isolatene, og særlig de ukjente isolatene fra Numedalslågen, mindre følsomme for eksponering for borsyre ved ulike konsentrasjoner. Samtlige isolater har dog vist følsomhet for borsyre i konsentrasjoner på 0,8 og 1,2 mg/ml, men dette er mest tydelig ved eksponering i tidlig fase av vekstperioden.

Borsyre er altså et potensielt godt alternativ til formalin basert på disse *in vitro* forsøkene, men det trengs mer data fra småskala forsøk *in vivo* og fra felt.

Marius Steen Dobloug – Kultivering av villaks, *Saprolegnia* sp. og borsyre.

Takk til bidragsytere

- Lågens Framtid.

Summary

Saprolegnia sp. is an oomycete that infects Atlantic salmon and Atlantic salmon eggs, as well as several other fish species. All life stages in fresh water can be infected. *Saprolegnia* sp. is a ubiquitous and endemically occurring oomycete in fresh water across the globe which and poses a significant financial problem for the salmon farming industry. It also poses a problem for wild salmon, which is an endangered population in continuous decline since 1980.

The treatment of *Saprolegnia* infections in infected eggs or salmonids is currently based on the use of formalin. Formalin is potentially carcinogenic, and its use should be minimized, thus there is a need for other ways to prevent and treat *Saprolegnia* infections. Boric acid has a potential for preventative use, while the therapeutic effect is more uncertain. The effect of boric acid has mainly been explored on *Saprolegnia* isolates from farmed salmon, while isolates from wild salmon as not been tested for sensitivity to boric acid. In this study the growth abilities and sensitivity to boric acid has been explored and compared for *Saprolegnia* isolates from both wild salmon and farmed salmon.

Different isolates have been shown to have different growth characteristics *in vitro*. Boric acid has also been shown to effectively inhibit the growth of *Saprolegnia* sp. in high enough concentrations, both in terms of growth in surface seed and in early and late phase hemp seeds. Differences in sensitivity to boric acid between isolates from wild salmon and farmed salmon have been shown.

Referanser/kilder

1. Geographic NZ. Signs of life 2019 [Available from: <https://www.nzgeo.com/stories/signs-of-life/>].
2. Miljødirektoratet. Miljøstatus laks 2019 [Available from: <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/Tema/Ferskvann/Laks/>].
3. Discussion B. Life Cycle of *Saprolegnia* 2019 [08.09.19]. Available from: <http://www.biologydiscussion.com/fungi/life-cycle-of-saprolegnia-with-diagram-oomycetes/63299>.
4. Business S. Unique cooperation between Scottish farmers to fight water moulds 2017 [Available from: <https://salmonbusiness.com/unique-cooperation-between-scottish-farmers-to-fight-water-moulds/>].
5. centre Sfir. Novel vaccination strategies against *Saprolegnia parasitica* 2019 [Available from: <https://www.abdn.ac.uk/sfirc/research/vaccine-development/parafishcontrol-saprolegnia/>].
6. Havforskningsinstituttet. Akvakultur i Norge 2019 [30.08.19]. Available from: https://www.hi.no/filarkiv/2015/03/akvakultur-muligheter_og_begrensninger.pdf/nb-no.
7. Karlsson S, Bjørn B, Holthe E, Lo H, Ugedal O. Veileder for utsetting av fisk for å ivareta genetisk variasjon og integritet. 2016.
8. FN. FN Norge 2018 [30.08.19]. Available from: <https://www.fn.no/Land/Norge>.
9. Bank N. Forvaltning av oljeformuen 2015 [30.08.19]. Available from: <https://www.norges-bank.no/aktuelt/nyheter-og-hendelser/Foredrag-og-taler/2015/2015-12-03-Olsen/>.
10. Klimatilpasning. Fiske og havbruk 2016 [30.08.2019]. Available from: <http://www.klimatilpasning.no/sektorer/fiske-og-havbruk/>.
11. Vettviten. Akvakultur i Norge 2019 [Available from: <https://vettviten.no/nettressurser/akvakultur/component/k2/item/57-akvakultur-i-norge>].
12. Norge Li. Lakseeventyret 2019 [Available from: <https://laks.no/lakseeventyret/>].
13. sentralbyrå S. Akvakultur 2019 [Available from: <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>].
14. Regjeringen. Nytt forslag om laksevekst 2017 [Available from: <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/nytt-forslag-om-laksevekst/id2577815/>].
15. NRK. Vil femdoble sjømatnæringen 2019 [Available from: <https://www.nrk.no/trondelag/sjomat-norge-onsker-a-femdoble-sjomatnaeringen--vil-koste-500-milliarder-1.14501218>].
16. Norge S. Bare akvakultur kan fylle gapet 2008 [Available from: <https://sjomatnorge.no/bare-akvakultur-kan-fylle-gapet/>].
17. fiskeridepartementet N-o. Regjeringens trafikklys 30.10.2017 [Available from: <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/regjeringen-skrur-pa-trafikklyset/id2577032/>].
18. Barentswatch. Bærekraft i havbruk - rømming 2019 [Available from: <https://www.barentswatch.no/havbruk/romming>].
19. Forskeren. Hvorfor er det ingen som bryr seg om dyrevelferd hos rensefisk? 2019 [Available from: <https://forskeren.no/dyreverden-etikk-hav-og-fiske/hvorfor-er-det-ingen-som-bryr-seg-om-dyrevelferd-hos-rensefisk/1346346>].
20. David W. Bruno PAN, Trygve T. Poppe, editor. A colour atlas of salmonid diseases: Springer Dordrecht Heidelberg; 2013.
21. D.W. Bruno PVW, G.W. Beakes. Fish Diseases and Disorders. England: CABI International; 2011 28.09.19.
22. Skaar I. Forelesning *Saprolegnia* for veterinærstudenter. In: 14 Vnk, editor. 2018.
23. Earle G, Hintz W. New Approaches for Controlling *Saprolegnia parasitica*, the Causal Agent of a Devastating Fish Disease. Tropical life sciences research. 2014;25(2):101.

24. E. Thoen ØE, I. Skaar. Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *Journal of Fish Diseases* 2011. 2011(34): 601–8
25. Songe MM, Willems A, Wiik-Nielsen J, Thoen E, Evensen Ø, West P, et al. *Saprolegnia* *diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 2016;39(3):343-52.
26. Veterinærinstituttet. Kultiveringsveileder *Saprolegnia* 2019 [Available from: http://multiconsult.eurest.no/nor/content/download/3745/34112/file/3.2.5.1_Saprolegnia%20sp.pdf.
27. van West P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*. 2006;20(3):99-104.
28. Dobloug MS. Personlig kommunikasjon, Ida Skaar. In: Dobloug MS, editor.
29. Horsberg TE. Forelesning Antiseptika og endoparasittmidler. In: 14 ANK, editor. 2019.
30. Shima EA, Even T, Øystein E, Ida S. Boric acid inhibits germination and colonization of *Saprolegnia* spores in vitro and in vivo. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e91878.
31. Legemiddelverket. Formalin til bruk på fisk i ferskvann - godkjenningfritak 2019 [Available from: <https://legemiddelverket.no/veterinarmedisin/fisk/formalin-til-bruk-pa-fisk-i-ferskvann-godkjenningfritak>.
32. VG. Oppdrettsgigant brukte ulovlig gift på laks 2015 [Available from: <https://www.vg.no/nyheter/innenriks/i/xnndV/oppdrettsgigant-brukte-ulovlig-gift-paa-laks>.
33. Branson E. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *BMJ Publishing Group Limited*; 2002. p. 539.
34. Cui N, Zhang X, Xie Q, Wang S, Chen J, Huang L, et al. Toxicity profile of labile preservative bronopol in water: The role of more persistent and toxic transformation products. *Environmental Pollution*. 2011;159(2):609-15.
35. Felleskatalogen. Pyceze FK 2019 [Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/pyceze-elanco-579890>.
36. Pottinger T, Day J. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1999;36(2):129-41.
37. Leksikon SN. Borsyre 2019 [Available from: <https://snl.no/borsyre>.
38. Ali SE, Thoen E, Vrålstad T, Kristensen R, Evensen Ø, Skaar I. Development and reproduction of *Saprolegnia* species in biofilms. *Veterinary Microbiology*. 2013;163(1-2):133-41.
39. Leksikon SN. Biofilm 2019 [Available from: <https://sml.snl.no/biofilm>.
40. Thoen E, Norges v. *Saprolegnia* infections in Norwegian salmon hatcheries : occurrence, characteristics and pathogenicity. Oslo: Norwegian School of Veterinary Science; 2011.
41. Kristiansund M. Foredrag om RAS. In: Dobloug MS, editor. 2019.
42. Heikkinen J, Tirola M, Mustonen SM, Eskelinen P, Navia-Paldanius D, Wright A. Suppression of *Saprolegnia* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using protective bacteria and ultraviolet irradiation of the hatchery water. *Aquaculture Research*. 2016;47(3):925-39.
43. Esam HA. Antifungal activity of sodium chloride on *Saprolegnia diclina* and *Aphanomyces* sp. *Acta Mycologica*. 2013;44(1):125-38.
44. Ali E. Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. *Mycopathologia*. 2005;159(2):231-43.
45. Evensen Ø. Personlig meddelelse. 2019.
46. Ingar Heum RH, Yngve Ask, editor. *Sportsfiske fra A til Å*. 3 ed: Vega Forlag AS; 2011.
47. Arhaug J, editor. *Effektivt laksefiske: Matei Publishing Group AS*; 2017.
48. lakselver N. *Laksesesongen 2018*. 2018.

49. Miljødirektoratet. Store utfordringer for villaksen 2015 [Available from: <https://www.miljodirektoratet.no/aktuelt/nyheter/20152/juni-2015/store-utfordringer-for-villaksen/>].
50. Meeren Glvd. Kasusstudie: Villaks og oppdrettslaks i et økosystemtjenesteperspektiv. Bergen: Havforskningsinstituttet; 2013.
51. Havforskningsinstituttet. Effekter av lakselus på villfisk [Available from: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/effekter-av-lakselus-pa-vill-laksefisk>].
52. NINA. Soppinfeksjon på laksefisk i Norge. 2001.
53. Veterinærinstituttet. Nettside for syk villaks 2019 [Available from: <https://www.vetinst.no/nyheter/status-nettside-for-syk-villaks-opprettet>].
54. Personlig meddelelse Håkon Torsvik. In: Dobloug MS, editor. 2019.
55. Personlig meddelelse Arild Jacobsen, Leder Lågens Fremtid. In: Torsvik H, editor. 2019.
56. veterinærinstituttet. Praktisk genetikk ved kultiveringsarbeid 2019 [Available from: <http://multiconsult.eurest.no/nor/Temasider/Fisk/Vill-laksefisk/Kultiveringsveilederen/Praktisk-genetikk-ved-kultiveringsarbeid.html>].
57. Veterinærinstituttet. Helsetjenesten for kultiveringsanlegg 2014 2014 [Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2015/helsetjenesten-for-kultiveringsanlegg-rsrapport-2014>].
58. veterinærinstituttet. Kultiveringsveileder, Stryking av stamfisk 2016 [Available from: http://multiconsult.eurest.no/nor/content/download/3773/34251/file/3.5.1_Stryking_av_stamfisk.pdf].
59. Veterinærinstituttet. Helsetjenesten for kultiveringsanlegg 2008 [Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2009/helsetjenesten-for-kultiveringsanlegg>].
60. veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten 2018 2018 [Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/fiskehelse rapporten-2018>].
61. Mattilsynet. Desinfeksjon av rogn 2019 [Available from: https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/akvakultur/desinfeksjon/desinfeksjon_av_rogn.3972].
62. Fishtech. Buffodine 2019 [Available from: <https://www.fishtech.no/produkter/detaljer/buffodine-5-liter/1050/39>].
63. Framtid L. Personlig meddelelse Bjørn Stavrum. In: Dobloug MS, editor. 2019.
64. Lakseelver. Kultivere eller ikke kultivere 2019 [Available from: <https://lakseelver.no/nb/news-2017/kultivere-eller-ikke-kultivere>].
65. Personlig meddelelse, Morten Kvammen, kultiveringsansvarlig Lågens Framtid. In: Torsvik H, editor. 2019.
66. Stueland S, Tafjord Heier B, Skaar I. A simple in vitro screening method to determine the effects of drugs against growth of *Saprolegnia parasitica*. *Mycological Progress*. 2005;4(4):273-9.