

Bruk av hydrogenperoksid i oppdrettsanlegg; fortynningstudier og effekter på blomsterreke (*Pandalus montagui*)

Masteroppgave i farmasi

Margrete Bae Fagereng



Senter for farmasi, Universitetet i Bergen

Havforskningsinstituttet

Mai 2016

Forord

Arbeidet presentert i denne oppgaven ble gjennomført i et samarbeid mellom Senter for farmasi ved Universitetet i Bergen og Havforskningsinstituttet.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere Svein Haavik og Bjørn Einar Grøsvik som har muliggjort denne oppgaven tross i vesentlige praktiske og teoretiske utfordringer med forsøkene gjennomført. Begge har bidratt med god veiledning, omfattende kunnskap og gjennomføringsevne. En stor takk fortjener også James Fang ved Havforskningsinstituttet som har vært nøyaktig og tålmodig i opplæring på lab. Ingrid Fiksdal ved Havforskningsinstituttet takkes også for å ha brukt av egen arbeidstid for å klargjøre histologi prøver for oppgaven.

Denne oppgaven ville ha vært betraktelig tynnere uten innsatsen fra ansatte i Chemco AS. Jeg er svært takknemlig for deres bidrag med utstyr, arbeidskraft og omfattende fagkunnskap. Også AkzoNobel fortjener en takk for kunnskap og innsats i forbindelse med planlegging og gjennomføring av feltforsøk. Takk til Aqua Kompetanse for bidrag i forbindelse med feltforsøk.

Takk til Lerøy Seafood som lot oss utføre feltforsøk ved deres oppdrettsanlegg både i oktober 2015 og i april 2016.

Bergen, mai, 2016

Margrete Bae Fagereng

Innholdsfortegnelse

Forord	5
Sammendrag	9
Forkortelser	9
1. Innledning	11
1.1 Bakgrunn	11
1.2 Hydrogenperoksidbruk i oppdrett.....	12
1.3 Lakselus	15
1.4 Amøbisk gjellesykdom	18
1.5 Reker.....	19
1.6 Kobber	20
3.7 Mål for oppgaven	22
2. Materiale og metode.....	23
2.1 Materialer.....	23
2.2 Analysering av hydrogenperoksidkonsentrasjoner	25
2.3 Forsøksdyr	27
2.4 Feltforsøk.....	28
2.5 Toksitetetsforsøk.....	31
2.6 Nedbrytningsforsøk.....	33
2.7 GSH	34
2.8 Histologi.....	36
3. Resultater	38
3.1 Feltforsøk oktober 2015	38
3.2 Feltforsøk April	42
3.3 Nedbrytningsforsøk	49
3.4 Toksitetetsforsøk.....	51
3.5 Toksitetestimeringer	57
3.6 GSH	61
3.7 Histologi.....	62
4. Diskusjon	65
4.1 Analysemetoder for måling av hydrogenperoksidkonsentrasjoner.....	65
4.2 Feltforsøk.....	67
4.3 Nedbrytningsforsøk	72
4.4 Toksitetetsforsøk.....	72
4.5 Effektmål	76

5. Konklusjon	78
6. Videre forskning	79
8. Referanser	80
Vedlegg 1	84
Vedlegg 2	90
Vedlegg 3	96
Vedlegg 4	100

Sammendrag

De siste årene har forbruket av hydrogenperoksid som anti-parasittmiddel i norsk oppdrettsnæring hatt en kraftig økning, og i 2015 ble det solgt hele 43000 tonn H₂O₂ til bruk i oppdrettsnæringen. Samtidig har det vært en del skepsis til hydrogenperoksidbruken spesielt blant rekefiskere som mener at utslipp av legemiddelet i områder med rekefelt påvirker fisket negativt.

Forsøk utført rundt oppdrettsanlegg umiddelbart etter badebehandling med hydrogenperoksid viste rask fortykning, eller nedbrytning av forbindelsen. Ved feltforsøk utført i oktober 2015 ble det tatt vannprøver opp til 30-60 meter unna merden, de fleste hadde en hydrogenperoksidkonsentrasjon under deteksjonsgrensen til Quantofix teststrimler. I feltforsøk utført i april 2016 ble det tatt vannprøver tett på merden. Disse viste også lave konsentrasjoner av hydrogenperoksid, men noe høyere enn i feltforsøk utført i oktober.

Studier gjort på nedbrytningshastigheten til hydrogenperoksid i sandfiltrert sjøvann viste halveringstider fra 3,5 dager til 28 dager ved henholdsvis 8,7 °C og 12°C.

Nedbrytningshastigheten for hydrogenperoksid var vesentlig lengre ved lave temperaturer.

Rekearten *pandalus montagui* (blomsterreke) har blitt eksponert for hydrogenperoksid i kar i 1 time og 6 timer ved ca. 0,5-3,5-45,5 og 171,5 mg/L. Eksponeringer etter 1 time med påfølgende gradvis utskifting av vannet ga opp mot 50% dødelighet ved høyeste konsentrasjon. Eksponering i 6-timer med etterfølgende overføring til rent vann og registrering etter 24 t recovery ga ca. 50% dødelighet ved høyeste konsentrasjon LC₅₀- og EC₅₀- verdier ble kalkulert ut fra resultatene.

For å undersøke eventuelle synergistiske effekter mellom hydrogenperoksid og kobber ble det også brukt kobbernøter i karene. Forsøk hvor rekene fikk gå fritt i kar med kobbernot og høyeste konsentrasjon av hydrogenperoksid ga opp mot 100 % dødelighet. I kar not var opphengt men ingen hydrogenperoksid var tilsatt så en 50% dødelighet. I forsøk hvor rekene ble lagt i bur i karene så en ingen økt dødelighet som følge av kobbernøtene.

For å undersøke eventuelle subletale effekter hos rekene ble det kjørt et GSH-assay på overlevende reker fra 6-timerseksponering. Ingen signifikante sammenhenger mellom eksponeringsdose og glutationnivåer ble påvist. Gjellevev ble også undersøkt med lysmikroskopi for å undersøke subletale effekter. En kunne se tydelige effekter på gjellevevet hos rekene som hadde blitt eksponert i 6 t for 3,5 mg/L eller høyere doser av H₂O₂.

Forkortelser

Forkortelse	Betydning
A	Absorbans
AGD	Amøbisk gjellesykdom
C	Celsius
DNTB	Dinitrotiocyanoenzen
DPD	N,N-dietyl-p-fenylendiamin
EC	Effective concentration
GSH	Glutation
H₂O₂	Hydrogenperoksid
Kt	Knop
KI	Konfidensintervall
l	Lengde
LC	Lethal concentration
L	Liter
µg	Mikrogram
Mg	Milligram
M	Molar
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
ppm	Parts per million
PNEC	Predicted no-effect concentration
SSA	Sulfosalisylysyre
SDM	Standardavvik for gjennomsnittet
V	Volum

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Ulike former for fiskeoppdrett har forekommet opp gjennom historien, men det var først på 1970-tallet moderne oppdrett som vi nå kjenner den fikk sin start i Norge (Hallenstvedt, 2015). I dag er den norske havbruksnæringen blant landets viktigste verdiskapere. I 2014 ble det omsatt over 1,33 millioner tonn fisk og skalldyr fra norske oppdrettsanlegg. Over 1,2 millioner tonn bestod av atlantisk laks med en samlet verdi på over 47,2 milliarder kroner (Aandahl, 1016). Næringen og dens ringvirkninger bidrar også til viktige arbeidsplasser både i perifere og sentrale strøk.

Som følge av nedgangen i pris på fossile brennstoffer og behovet for bærekraftige næringer er det ventet videre vekst i oppdrettsnæringen. Regjeringen har gitt tydelig uttrykk for ønske om vekst, men at veksten ikke skal skje på bekostning av miljøet. I 2015 ble det lagt fram en ny stortingsmelding om forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i oppdrettsnæringen (Det kongelige nærings- og firskeridepartamentet, 2015). Hovedpunktene i stortingsmeldingen var at nye konsesjoner som tillater vekst i oppdrettsnæringen skal gis. Vekst skal derimot skje i et slikt tempo at man rekker å se dens konsekvenser før nye konsesjoner gis. Samtidig stilles tydelige krav til anleggenes miljøpåvirkning.

1.1.2 Miljøutfordringer ved fiskeoppdrett

Rømning av fisk fra anlegg, sykdommer og utslipp av kjemikalier er blant de største miljøutfordringene til oppdrettsnæringen. Rømt fisk kan gyte i villaksens naturlige habitat hvilket kan føre til at oppdrettslaksens genetik krysser over i villfiskbestandens (Bakketeig, Gjøsæter, Hauge, Sunnset, & Toft, 2015).

Sykdom hos oppdrettsfisk kan medføre redusert fiskehelse og matkvalitet. Fisk i oppdrettsanlegg lever tett på hverandre og smitte kan derfor skje raskt i merd. I tillegg er det en vesentlig risiko for smitte til villfisk (Karlsen et al., 2016). Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og AGD (Amøbisk gjellesykdom) er to sykdommer som har ført til vesentlige utfordringer for oppdrettsnæringen. Ikke bare er sykdommene utfordrende fra et miljøperspektiv i seg selv, men behandlingen av dem vil også føre til ytterligere påkjenninger.

Kjemikalieutslipp fra oppdrettsanlegg kan ha flere kilder. Behandling av sykdommer i oppdrettsanlegg med medikamenter er én potensiell kilde. I tillegg kommer fôr, behandling av nøter osv. Oppdrettsnøter behandles ofte med impregnering og maling før de settes ut i sjøen og fra noten kan disse forbindelsene sive ut i sjøen. Hvordan og i hvilken grad kjemikalier fra oppdrett påvirker miljøet krever fortsatt mye forskning. Fordi det som regel er flere forskjellige kjemikalier som brukes i oppdrettsanlegg bør man også se på såkalte cocktail-effekter (Celander, 2011).

På grunn av flere mulige negative effekter på miljøet har mediedekningen rundt forbruket av kjemikalier i næringen den siste tiden vært stor. VG avslørte at oppdretts-giganten Salmar hadde bruk formalin i en lusebehandling. NRK har blant annet skrevet om hvordan forbruket av avlusningsmidler øker (Thonhaugen, 2015) og om hvordan lus som våkner til live igjen etter behandling dumpes til sjøs hvor de kan ha muligheten til å infisere laks på ny (Sandmo & Lorentzen, 2015). En sak som har fått mye oppmerksomhet er en nedgang i rekefisket som mange mener skyldes oppdrett (Dagbladet, 2015). Rekefiskeren Tor Inge Larsen anmeldte i fjor Marine Harvest etter å ha observert en nedgang i mengden reker på et rekefelt etter at en brønnbåt hadde dumpet hydrogenperoksid i området (iLaks, 2015).

1.2 Hydrogenperoksidbruk i oppdrett

Hydrogenperoksid (H_2O_2) er en sterk oksidant med bred bruksprofil (National Center for Biotechnology Information, 2015). Forbindelsen har lenge blitt brukt både i private hjem og i industri, hovedsakelig som et desinfiserende middel eller som blekemiddel. I oppdrettsnæringen er hydrogenperoksid én av flere legemidler som brukes mot lakselus. Hydrogenperoksid er også det eneste medikamentet som så langt ser ut til å ha en effekt mot amøbisk gjellesykdom (AGD) (Adams, Crosbie, & Nowak, 2012).

Av de stoffene som brukes mot lakselus selges det mest av hydrogenperoksid. Tabell 1 viser oversikt for mengden solgte lakselusmidler i Norge de siste årene. For flere av substansene ser en beskjeden nedgang i forbruk fra 2014 til 2015. For diflubenzuron, emamektin og hydrogenperoksid ser man derimot en økning i salg. I 2015 ble det solgt ca. 80% mer diflubenzuron enn i 2013, denne veksten blir derimot beskjeden i forhold til den en ser i salg av emamektin og hydrogenperoksid. Salget av emamektin og hydrogenperoksid vokste med over 400% fra 2013 til 2015. Mens det ble solgt 259 kg emamektin i 2015 ble det solgt hele 43 246 tonn i hydrogenperoksid i 2015. (Med en molar masse på kun 34.02 g/mol gir antall kg solgt hydrogenperoksid enorme mengder aktiv substans).

Tabell 1: tabell viser mengde solgte lakselusmidler de siste årene i Norge. Alle verdier er oppgitt i kg. Tabell er hentet fra Folkehelseinstituttet (Folkehelseinstituttet, 2016).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
azametifos			66	1884	3346	2437	4059	3037	4630	3904
cypermetrin	49	30	32	88	107	48	232	211	162	85
deltametrin	23	29	39	62	61	54	121	136	158	115
diflubenzuron	-	-	-	1413	1839	704	1611	3264	5016	5896
emamektin	60	73	81	41	22	105	36	51	172	259
teflubenzuron	-	-	-	2028	1080	26	751	1704	2 674	2509
hydrogen- peroksid (100%) (tonn)				308	3071	3144	2538	8262	31577	43246

1.2.1 Miljøaspekter ved hydrogenperoksidbruk i oppdrett

Hydrogenperoksid har lenge blitt ansett som et av de mer miljøvennlige avlusningsmidlene fordi forbindelsen brytes ned til oksygen og vann. Nedbrytningsreaksjonen er forventet å skje raskt på grunn av hydrogenperoksids høye reaktivitet og høy tetthet av organisk materiale rundt anlegg. På grunn av rekefiskere som har påstått at det har vært sammenheng mellom hydrogenperoksidbruk og reduserte rekefangster har det den siste tiden blitt stilt spørsmål ved den påståtte miljøvennligheten til forbindelsen.

Gode studier på hydrogenperoksids effekt på «non-target»-organismer er foreløpig mangelfulle. Studier på hydrogenperoksid har ofte vært fokusert rundt effekter på laksen etter behandling. Eksempelvis har det blitt funnet at hydrogenperoksid skader gjellene hos laksen ved 1,45g/L etter 20 minutters eksponering ved temperaturer over 13°C. Effekter som førte til dødelighet ble derimot funnet ved høyere konsentrasjoner (Kierner & Black, 1997).

Dødelighet hos laks har også blitt rapportert ved 1,23g/L ved 20 minutters eksponering i sjøvann med temperaturer på over 13°C. Samme studie var ett av de første som også viste at hydrogenperoksid kan immobilisere lakselusen i stedet for å drepe den (Bruno & Raynard). Tilfeller av dødelighet hos laks under behandling har også blitt rapportert (Holstad, 2016).

For «non-target»-organismer har en studie funnet LC₅₀-verdi for rekearten *Crangon septemspinosa* på 3182 mg/L ved 1 times eksponering og 95 påfølgende timer i recovery-kar. Studien undersøkte også effekter på hummerlarver, voksen hummer og mysider. LC₅₀-verdiene for hummerlarvene og mysidene ble funnet å være henholdsvis 1637 og 973 mg/L (Burridge, Lyons, Wong, MacKeigan, & VanGeest, 2014). Hos strandreker har det blitt vist nedsatt metabolsk rate og redusert intracellulær pH i muskelvev hos strandreker etter 5 timers eksponering for 0,68 mg/L H₂O₂. PNEC for hydrogenperoksid i vann har blitt estimert til 0,01mg/L. Den lave verdien skyldes i hovedsak at den estimerer en ufarlig konsentrasjon for alle organismer i vann, deriblant alger som har lav toleranse (Institute for Health and Consumer Protection, 2003).

1.2.2 Hydrogenperoksid og oksidativt stress

Antioksidanter hindrer celledødsårsaker forårsaket av frie radikaler, også kalt reaktive oksygenforbindelser. Hydrogenperoksid er et slikt fritt radikal. Dersom en organisme har for lave verdier av antioksidanter i forhold til frie radikaler vil den bli utsatt for oksidativt stress (Betteridge, 2000). Frie radikaler, eller reaktive oksygenforbindelser, kan føre til en rekke skader hos en organisme. Den reaktive naturen til forbindelsene kan føre til at de reagerer med viktige cellekomponenter som lipidmembraner, DNA og mitokondrier og påføre disse irreversibel skade. Nevrodegenerative sykdommer, kreft og hjerte- og karsykdommer har blitt knyttet opp mot frie radikaler (Villamena, 2013). Apoptose (celledød) kan i verste fall oppstå ved overskudd av frie radikaler i forhold til antioksidanter (Stoian, Oros, & Moldoveanu, 1996).

Det fins en rekke biomarkører som kan kvantifiseres for å finne graden av oksidativt stress i en organisme, eksempelvis katalase, peroksidaser, glutation og superoksid dismutase. Katalase og peroksidaser bryter ned hydrogenperoksid til vann, eller vann og molekylært oksygen (Pigeolet et al., 1990). Glutation er en viktig antioksidant som binder opp frie radikaler. Oksidativt stress kan føre til økte nivåer av glutation, men skader er mest alvorlige når alt glutation er bundet opp og en påfølgende mangel oppstår (A. H. Ringwood & Connors, 2000). Superoksid dismutase omdanner superoksider til hydrogenperoksid og molekylært oksygen (Pigeolet et al., 1990). I tillegg kan kvantifisering av lipidoksidering brukes som et effektmål for å undersøke skader på lipidmembraner som følge av oksidativt stress (Repetto, Semprine, & Boveris, 2012).

1.3 Lakselus

Lepeophtheirus salmonis (lakselus) er en ektoparasitt som lever på laks eller ørrets skinn. Lakselusen er copepoditt (hoppekreps) i familien caligidae. Nylig har det blitt vist at lakselusen, som øvrige copepoditter, gjennomgår 8 utviklingsstadier gjennom nøye overvåkning av skallskifte og morfologiske endringer (Hamre et al., 2013). Tidligere har en trodd at lakselusen gjennomgår 10 eller flere utviklingsstadier (Poppe, Bergh, Espelid, & Nygaard, 1999).

De tre første utviklingsstadiene til lakselusen er to nauplius- og ett copepodittstadium. I disse tre første stadiene svever lusen fritt i havet som plankton og kan da spres over store geografiske områder. I copepodittstadiet fester parasitten seg til laksen. De neste to stadiene er chalimusstadiene hvor lusen er festet til fisken gjennom en kitintråd. Deretter kommer to preadultstadier hvor lusen kan bevege seg fritt rundt hele fisken. I det påfølgende voksenstadiet er både hunn- og hannlusen kjønnsmodne. Voksenstadiet inntreffer tidligere hos hannen og denne fester seg da til hunnen. Etter befruktning oppbevarer hunnen egg i flere eggstrenger. Hunnens eggstrenger kan inneholde opptil flere hundre befruktete egg etter én parring (Poppe et al., 1999). Hamre et. al viste at lusen kun gjennomgår 2 chalimusstadier i motsetning til 4 som man før antok.

Lakselus er et stort problem hos oppdrettsfisk i hele verden. Lakselusen påfører fisken fysiske skader ved at den føder på slim, skinn og blod. Resulterende sår er ikke i seg selv veldig problematiske, men disse gjør laksen med utsatt for blant annet infeksjoner og osmotiske forstyrrelser (Havforskningsinstituttet, 2014). Lakselus kan også være svært skadelig dersom den smitter villfisk. Redusert reproduksjon, osmotiske forstyrrelser og akutt dødelighet er blant konsekvensene av smitte (Karlsen et al., 2016). Ifølge Mattilsynets lakselusrapport var tallene på lakselus i norsk oppdrettsanlegg totalt noe lavere i 2015 enn tidligere år (Mattilsynet, 2016), men i region Midt-Norge (Nord-Trøndelag, Sør-Trøndelag og Møre og Romsdal) var lusetalene tidvis svært høye samtidig som man så resistens mot avlusningsmidler.

1.3.1 Behandling av lakselus

I forskriften om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg står det at «*Det skal til en hver tid være færre enn 0,5 voksen hunnlus av lakselus i gjennomsnitt per fisk i akvakulturanlegget. Det skal gjennomføres tiltak for å sikre at mengden lakselus ikke overskrider denne grensen, herunder om nødvendig utslakting av fisk.*» (lakselusbekjempelse, 2012). Altså er man pålagt å behandle dersom det er for store antall lus per fisk i anlegg.

Det finnes en rekke behandlingsalternativer mot lakselus. Flere ikke-medikamentelle metoder brukes, eksempelvis rensefisk, ferskvannsbad og spyling av fisk (Mattilsynet, 2016), i tillegg til medikamentelle behandlinger. Fordi ikke-medikamentelle regnes å være miljøvennlige ventes og ønskes det en videre utvikling av gode metoder.

Medikamentelle behandlinger mot lakselus kan administreres ved å bade fisken i aktuelt medikament eller peroralt via fôr. Badebehandlinger mot lakselus kan administreres direkte i merden eller ved bruk av brønnbåt. Ved behandling i brønnbåt blir fisken fraktet inn i tanker i båt hvor den behandles for så å bli sluppet ut i anlegget igjen. Ved badebehandlinger i merd blir det spent opp en presenning hvor all fisken i anlegget behandles samlet. Det er fordeler og ulemper ved begge behandlingsmetodene. Ved en badebehandling i merden kan alle individene i merden behandles samtidig, mens de i brønnbåter må behandles i flere omganger. På grunn av lavere vannvolum i brønnbåtene behøver man mindre mengder av medikamentet som skal behandle fisken. Behandlingsmetodene er i begge tilfeller tid- og ressurskrevende.

1.3.2 Legemidler mot lakselus

Legemidler som brukes mot lakselus kan ses i tabell 1. Utenom hydrogenperoksid blir det også brukt pyretroider (eks. deltametrin), acetylkolinesterasehemmere (eks. azametifos) og kitinsyntesehemmere (eks. diflubenzuron) og et avermektin (emamektin) mot lakselus (Lusedata.no, 2012). De to førstnevnte legemiddelklassene brukes som badebehandlinger mens kitinsyntesehemmere og avermektiner tilsettes fôr. Pyretroider og acetylkolinesterasehemmerne påvirker lusens nervesystem. Bruken i praksis er noe forskjellig da acetylkolinesterasehemmere kun virker på voksne og halv voksne lus (Burrige et al., 2014) og behandlingen må derfor gjentas. Av fôr-behandlingene påvirker kitinsyntesehemmerne skallskifte hos lusen (MSD Animal Health, 2009), mens avermektiner påvirker cellemembran i nervesystemet (MSD Animal Health, 2009). Avermektiner og kitinsyntesehemmere må administreres over 7 dager for å være effektive mot lakselus (Lusedata.no, 2012).

Flere studier har undersøkt effekter av diverse lusemidler på «non-target»-organismer. Spesielt deltametrin har blitt vist å være skadelig for hummer, reker og kreps ved konsentrasjoner ned til 3,4 ng/L hvilket er langt lavere enn anbefalt behandlingskonsentrasjon på 2 µg/L (Burrige et al., 2014). LC₅₀-verdier ble i samme studie funnet for Azametifos, men kun etter 24 timer med eksponering. Mindre forskning har blitt gjort på avermektiner. Ingen LC₅₀-verdier har blitt bestemt, men subletale effekter som immobilisering hos planktoniske copepoditter (Willis & Ling, 2003) og endret genuttrykk hos *Pandalus platyceros* (Veldhoen et al., 2012). Lite forskning har blitt gjort på kitinsyntesehemmeres effekter på «non-target»-organismer i sjø. På grunn av resistensutvikling hos lus, brukes avlusningsmidler også i kombinasjon. Få studier har undersøkt toksiske effekter av slike kombinasjonsbehandlinger (Karlsen et al., 2016).

Selv om det finnes flere legemidler mot lakselus ser man nå kun en vekst i salg av noen få, til tross for en generell økning i produksjon fra norske oppdrettsanlegg. Salget av hydrogenperoksid har derimot økt sterkt i senere år (tabell 1). I en rapport fra veterinærinstituttet blir det meldt om resistens hos lakselusen mot flere avlusningsmidler (Grøntvedt, Jansen, Horsberg, Helgesen, & Tarpai, 2014). En vesentlig årsak til det økte forbruket av hydrogenperoksid er trolig resistens mot andre brukte midler. Rapporten fra veterinærinstituttet melder likevel om en økning i resistens hos lakselus også mot hydrogenperoksid (Grøntvedt et al., 2014).

1.4 Amøbisk gjellesykdom

Amøbisk gjellesykdom (AGD) ble først observert ved oppdrettsanlegg i Tasmania men har i senere år spredd seg til flere deler av verden, deriblant langs Norskekysten (Bakketeig et al., 2015). AGD ble først observert i Norge i 2006, deretter i 2012. Siden 2012 har sykdommen blitt påvist i årlig med en stadig økning i antall tilfeller (Veterinærinstituttet, 2015). Salinitet påvirker trolig utviklingen av sykdommen (Mo, Hytterød, & Hansen, 2015). Fordi sykdommen i større grad forekommer i sommermånedene antas sjøtemperaturen også å være viktig for utviklingen av sykdommen. Tilfeller av AGD i Norge hvor sjøtemperaturen har vært under 7°C fører derimot til usikkerhet rundt viktigheten til temperaturer for sykdomsutvikling.

AGD forårsakes av amøben *Paramoeba Perurans* som prolifererer etter å ha festet seg til fiskens gjeller (Crosbie, Bridle, Cadoret, & Nowak, 2012). Amøben kan angripe flere fiskearter da den ikke er artsspesifikk, hvilket igjen fører til et enormt infeksjonspotensiale. Ved infeksjon kan atferdsendringer som redusert bevegelse, økt respiratorisk frekvens og redusert matinntak ses. AGD-infeksjoner kan observeres med det blotte øyet som lyse flekker på fiskens gjeller (Karlsbakk, 2015) samt at infeksjon kan føre til fortykninger på gjellevev som igjen kan medføre anstrengt respirasjon (Norte dos Santos, Leef, Adams, & Nowak, 2013). Ubehandlete AGD-infeksjoner kan føre til død (Taylor, Muller, Cook, Kube, & Elliott, 2009).

1.4.1 Behandling av amøbisk gjellesykdom

AGD er ikke nevnt i spesifikt i lovverk, men ifølge lovverk om matproduksjon og dyrevern er man også pålagt å behandle denne sykdommen. Foreløpig fins det få behandlingsalternativer mot AGD. Ferskvannsbad er den mest brukte behandlingen, denne behandlingen er relativt miljøvennlig og ser ikke ut til å gi bivirkninger hos laks (Powell, Parsons, & Nowak, 2001). Ferskvannsbehandling vil derimot ikke fjerne amøbene fullstendig fra fiskens gjeller (Parsons, Nowak, Fisk, & Powell, 2001), og etter 10 dager vil infeksjonen igjen kunne være like ille som før behandling (Clark, Powell, & Nowak, 2003). Behandling med ferskvann krever store utgifter i form av logistikk da ferskt vann må fraktes til oppdrettsanlegget. For å redusere fraktkostnader bør også anlegg ha en nærliggende ferskvannskilde. Hydrogenperoksid er det eneste legemidlet som så langt ser ut til å ha noen effekt mot AGD (Adams et al., 2012), graden av effektivitet er derimot usikker.

Fordi AGD er en relativt ny sykdom for mange store oppdrettsnasjoner har det ikke blitt utført like mye forskning på denne sykdommen som på lakselus. Hvorvidt denne sykdommen i framtiden vil bli like utfordrende for fiskehelse og oppdrettsselskapenes økonomi som lakselusen så langt har vært vil man trolig se i løpet av de neste årene, men på grunn av de begrensede behandlingsalternativene vil AGD trolig bidra til videre økt forbruk av hydrogenperoksid.

1.5 Reker

Reker er protandriske hermafroditter hvilket vil si at de i første del av livet er hanner og utvikler seg til å være hunner med alder og vekst (Torsvik N, 1995). Reker gjennomgår flere skallskifter. Når reken kaster skallet vokser den blant annet ved å ta opp vann før det nye skallet herdes. Reken er i denne perioden noe mer sårbar da det harde skallet gir god beskyttelse. Mange rekearter lever på mat som finnes på bunnsedimentet på dagtid mens de kan bevege seg oppover i vannsøylen på nattestid hvor det fins dyreplankton (Bakketeig et al., 2015).

På verdensbasis fins omtrent 2000 forskjellige rekearter, om lag 35 av disse fins langs Norskekysten (Sømme, 2013a). Av de rekeartene man finner i norske farvann er dypvannsreken (*Pandalus borealis*) den viktigste for fiske (Torsvik N, 1995). Siden oppstarten av rekefisket langs kysten i Norge på 1970-tallet har man sett varierende mengder reker, men i hovedsak ser man en nedgang. Mye av nedgangen skyldes strukturelle endringer i industrien; en endring fra mange små trålere langs kysten til større båter som fisker lengre ut til havs (Bakketeig et al., 2015).

1.5.1 Pandalus montagui

I denne studien har rekearten blomsterreke (*Pandalus montagui*) blitt brukt som forsøksdyr. Blomsterreke regnes som slektning av dypvannsreken, men kan skilles fra denne ved hjelp av en mer kurvet fasong på pannetornet og dens karakteristiske røde striper (Sømme, 2013b). Blomsterreker lever normalt på bunnsediment i fjordstrøk fra 20-200 meters dyp men kan også observeres ved andre dybder. På tross av at arten anses som godt egnet til mat fiskes den i hovedsak kun kommersielt i Storbritannia og Irland (Holthuis, 1980). Arten er utbredt i store deler av Nord-Atlanteren men kan også finnes i nordøstlige deler av stillehavet. For denne studien er Blomsterrekesvært relevant da den er å finne i fjordstrøk hvor oppdrettsanlegg befinner seg og hvor mindre reke-trålere har sitt fiske.

1.6 Kobber

I tillegg til parasittære sykdommer er begroing av organismer som hydroider, diverse skjell, alger og lignende på noten i oppdrettsanlegg en stor utfordring. Begroing begrenses ved vasking, utskifting og impregnering av noten. Dersom begroing ikke begrenses vil merden kunne bli opptil flere tonn tyngre. Økt vekt på merden vil igjen kunne gjøre den mer ustabil, spesielt i forhold til sterke strømmer, dønninger og bølger. Begroing vil også gi føde til leppefisk som man i oppdrettsanlegg ønsker kun skal spise lakselus. I alvorlige tilfeller kan begroing også resultere i redusert vannkvalitet gjennom begrensning av gjennomstrømning i merden.

Diverse kobberforbindelser er mest brukt til notimpregnering i Norge. Kobber er toksisk for en rekke høyere organismer og har antimikrobiell effekt, hvilket gir en effektiv forebygging av begroing på nøtene (Grass, Rensing, & Solioz, 2011). Kobber vil derimot ikke hindre begroing fullstendig og det vil tross i impregnering tidvis være nødvendig med notvask.

1.6.1 Miljøutfordringer ved bruk av kobber i oppdrettsnæringen

Det er per i dag en skepsis til bruk av kobber som antibegroingsmiddel. Fremdeles er det usikkert hvor mye kobber fra not som siver ut i sjøen. Studier har vist at kobbermengden i sediment rundt anlegg ikke er signifikant forskjellig fra kontrollområder. Samme studie klarte heller ikke vise noe særlig påvirkning hos organismer i og rundt anlegget. Eksempelvis var det ingen signifikant forskjell på mengden kobber i oppdrettslaksens muskelvev hvor kobberimpregnering ble brukt på noten i forhold til steder hvor ingen impregnering ble brukt (Solberg, Sæthre, & Julshamn, 2002). Det er derimot vanskelig å si om større mengder kobber fra noten siver ut for så å bli fraktet bort fra anlegget. Miljødirektoratet estimerer til sammenligning med at 85% av kobberet brukt til notimpregnering siver ut i vannmassen (Skarbøvik et al., 2014). Basert på salgsstatistikker for antibegroingsmidler for 2013 var det samme år beregnet et utslipp på ca. 900 tonn kobber fra norsk akvakultur (Miljødirektoratet, 2014).

Ved vaskeanlegg har man påvist forhøyede kobberkonsentrasjoner. NIVA tok i 1996 sedimentprøver rundt 3 norske notvaskerier og fant forhøyede kobberverdier ved alle tre (Johnsen, 1996). I 2003 trådte forskriften om regulering av utslipp fra vask og impregnering av oppdrettsnøter i kraft (oppdrettsnotforurensning, 2003). I forskriften står det at «Det er forbudt å slippe ut miljøskadelige kjemikalier i forbindelse med rengjøring, vask eller impregnering av hele eller deler av oppdrettsnøter.». Videre i kommentarene til forskriften er det utdypet at kobber inngår som en av disse «miljøskadelige kjemikaliene». Altså har problemet med utslipp av kobber fra notvaskeri blitt tatt tak i av norske myndigheter. Det rapporteres derimot tidvis om brudd på dette lovverket (Vengen & Erstad, 2009).

3.7 Mål for oppgaven

Kunnskapen om potensielle negative miljøeffekter ved bruk av hydrogenperoksid i behandlinger av oppdrettslaks er fortsatt mangelfull. På grunn av flere tilfeller av AGD i norske oppdrettsanlegg og en økt resistens mot andre avlusningsmidler har bruken av hydrogenperoksid økt veldig i senere år (tabell 1). Samtidig som bruken av hydrogenperoksid har økt har flere enkeltpersoner protestert mot det økte forbruket da de hevder det er skadelig for reker og andre «non-target»-organismer. Denne oppgaven har som mål å undersøke miljøeffekter ved bruk av hydrogenperoksid i behandling av oppdrettslaks.

- Delmål 1: undersøke spredningen og nedbrytningen av hydrogenperoksid etter utslipp fra merd etter badebehandling.
- Delmål 2: undersøke akutt toksisitet og mulige subletale effekter hos rekearten *Pandalus montagui* (blomsterreke) etter eksponering for hydrogenperoksid.

2. Materiale og metode

2.1 Materialer

2.1.2 Kjemikalier

Tabell 2: tabell viser oversikt over kjemikalier og enzymer brukt i forsøk

Navn	Strukturformel	Leverandør
Hydrogenperoksid	H ₂ O ₂	Chemco
5-Sulfosalisylysyre dihydrat	HO ₃ SC ₆ H ₃ -2-(OH)CO ₂ H·2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Natriumfosfat monobasisk monohydrat	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Sigma-Aldrich
5,5-Ditiobis(2-nitrobenzosyre)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	Sigma-Aldrich
β-Nikotinamid-adenin-dinukleotid 2'-fosfat-reduisert tetranatrium-salhydrat	C ₂₁ H ₂₆ N ₇ Na ₄ O ₁₇ P ₃ ·xH ₂ O (enzym)	Sigma-Aldrich
L-Glutation (reduisert)	H ₂ NCH(CO ₂ H)CH ₂ CH ₂ CONHCH (CH ₂ SH)CONHCH ₂ CO ₂ H	Sigma-Aldrich
Kaliumfosfat dibasisk	K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Kaliumpermanganat	KMnO ₄	Sigma-Aldrich
Svovelsyre	H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Glutathione reductase fra baker's yeast	Enzym med omfattende struktur	Sigma-Aldrich
Formalin	CH ₂ O	Ukjent

2.1.2 Tillagde løsninger

Tabell 3: Løsninger tillagd i GSH-assay med tilsatte mengde ingredienser

Løsning	Innhold
5% SSA	<ul style="list-style-type: none">- 250 mL destillert filtrert vann- 12,5g 5-Sulfosalisylysyre dihydrat
Na₃PO₄-buffer (143 mM)	<ul style="list-style-type: none">- 240 mL destillert filtrert vann- 2,145 g Natriumfosfat monobasisk monohydrat- 2,6796 g Kaliumfosfat dibasisk
DTNB (10 mM)	<ul style="list-style-type: none">- 4 mL Na₃PO₄-buffer- 0,01585 g 5,5-Ditiobis(2-nitrobenzosyre)
NADPH (0,476 mg/mL)	<ul style="list-style-type: none">- 15 mL Na₃PO₄-buffer- 0,00714g β-Nikotinamid-adenin-dinukleotid 2'-fosfat-redusert tetranatrium-salhydrat
GSSG reductase	<ul style="list-style-type: none">- 59,3 μL Glutation reductase- 740,7 μL Na₃PO₄-buffer
GSH-standard (1000 μM)	<ul style="list-style-type: none">- 10 mL SSA 5%- 0,00307 g redusert l-glutatione

2.1.3 Instrumenter

Tabell 5: Type, modell og produsent for instrumenter brukt i forbindelse med oppgaven.

Instrument	Modell	Produsent
Spektrofotometer	V-200	Chemetrics
Autotitrator	ukjent	Ukjent
Plateleser	Anthos Zenyth 340	Biochrom
FastPrep	FP 120	Thermo Savant
Sentrifuge	5415 R	Eppendorf
Mikroskop	Eclipse 80i	Nikon

2.2 Analysering av hydrogenperoksidkonsentrasjoner

I feltforsøk, toksisitetsforsøk og nedbrytningsforsøk ble hydrogenperoksidkonsentrasjoner målt. Følgende målemetoder ble brukt: teststrimler; spektrofotometri og titrering.

2.2.1 Quantofix teststrimler

I feltforsøk ble Quantofix Peroxide 25, 100 og 1000 teststrimler, levert av selskapet Macherey-Nagel, brukt. Teststrimlene har deteksjonsområde fra 0-25 mg/L, 1-100 mg/L og 0-1000 mg/L. Strimlene har et testområde som må dyppes i prøven i et sekund før de så må tørke i opptil 45 sekunder. Ved tilstedeværelse av hydrogenperoksid i prøven vil testområdet få et fargeutslag som så må sammenlignes med en medfølgende fargeskala for å identifisere H₂O₂-konsentrasjoner. Metoden er semi-kvantitativ ettersom den baserer seg på visuell sammenligning av fargenyanser. Metoden ble brukt som hovedmetode i første feltforsøk og som supplerende metode i andre feltforsøk.

2.2.2 Spektrofotometri

For å få mer presise data ble det undersøkt hvorvidt det kunne finnes en annen metode for måling av konsentrasjoner - som også kunne benyttes i felt. Det amerikanske selskapet Chemetrics har utviklet metoder, blant annet for kvantifisering av hydrogenperoksid i vannprøver, ved hjelp av spektrofotometri. Sett K-5513 og K-5543 fra selskapet ble brukt. Settene kommer levert som ampuller, kalt Vacu Vials, fylt med kjemiske løsninger. Det ble ikke vurdert å lage løsningene selv på grunn av behov for mobilitet.

Sett K-5513 baserer seg en oksidering av N, N-dietyl-p-fenylendiamin (DPD) som gir fargeutslag. Prøven blir overmettet med kaliumjodid. Jodid løst i prøven blir så oksidert av hydrogenperoksid til jod ved tilstedeværelsen av en molybdatkatalysator. Jod kan så oksidere DPD til et radikalt kation som gjør prøven rosa. Fargeutslaget gir en absorpsjon ved 520 nm som er proporsjonal med hydrogenperoksidkonsentrasjonen i den opprinnelige vannprøven (Bader, Sturzenegger, & Hoigné, 1988). Lignende metoder for kvantifisering av klor i vannprøver har tidligere blitt brukt (Agency, 1983). Settet har deteksjonsområde for hydrogenperoksid mellom 0-3 mg/L. Feilgrenser er gitt til å være $\pm 0,23$ mg/L ved 2,25 mg/L (75% av range), $\pm 0,15$ mg/L ved 0,75 mg/L, $\pm 0,05$ mg/L ved 0,15 mg/L og $\leq 0,04$ ved 0,00 mg/L (Chemetrics a).

I praksis utføres analyser med Sett K-5513 ved at en bruker en vannprøve på 25 mL med en hydrogenperoksidkonsentrasjon mellom 0-3 mg/L. Vannprøven tilsettes så to reagenser; 2 dråper av reagens A-5500 og 5 dråper av reagens A-5501. Prøven må stå i 6 minutter for å tillate nødvendige reaksjoner å skje. Ampullens topp knekkes så av i den klargjorte vannprøven slik at væsken trekkes opp. Ett minutt senere kan prøven leses av i spektrofotometeret. Avlesningen tar ca. 1 minutt og konsentrasjonen målt oppgis i mg/L.

Sett K-5543 baserer seg på en annen reaksjon hvor hydrogenperoksid i sur løsning oksiderer Fe^{2+} -ion til Fe^{3+} -ion. Ammoniumtiocyanat reagerer så med Fe^{3+} -ionet og gir jerntiocyanat med en rødlig farge. Prøvens absorpsjon ved 520 nm er proporsjonal med hydrogenperoksidkonsentrasjonen tilstede i den opprinnelige vannprøven. Settet har deteksjonsområde for konsentrasjoner på 0-6 mg/L. I praksis brukes settet ved å knekke av toppen av ampullen i prøven slik at prøven trekkes opp. 30-60 sekunder etter ampullen har blitt knekt i vannprøven kan innholdet analyseres av spektrofotometeret. Ingen tilleggsreagenser behøves å tilsettes vannprøven for sett K-5543.

Begge settene er oppgitt med nøyaktighet på $\pm 10\%$ ved 75% av fullt målespekter, $\pm 20\%$ ved 25% av fullt målespekter og $\pm 30\%$ ved deteksjonsgrensen (Chemetrics, 2013),(Chemetrics c, 2013).

Likning 1 og 2 viser likninger som ligger til grunn for utregning av konsentrasjoner fra absorpsjon. Disse beregningene ble gjort automatisk av instrumentene.

Likning 1:

$$A = \epsilon lc$$

Likning 2:

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_p = \frac{A_l^{551} \cdot V_s}{\epsilon \cdot l \cdot V_p}$$

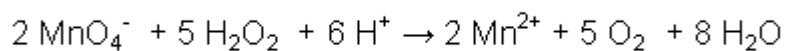
A: Absorpsjon ved ϵ : Molar absorptivitet l: veilenge for celle V_s : volum prøve etter tilsetning av reagenser V_p : Volum for opprinnelig prøve
--

2.2.3 Permanganattitrering

Alle analyser med kaliumpermanganattitrering ble utført av ansatte fra Akzo Nobel og metoden vil derfor ikke bli beskrevet i detalj.

Kaliumpermanganat er en sterk oksidant og kan brukes til å bestemme hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved hjelp av titrering. Reaksjonen som skjer mellom permanganat og hydrogenperoksid vises i reaksjonslikning 1. Permanganat har en lilla farge og omslagspunktet i titrering vil være når løsningen får en svak lillafarge som følge av et permanganatoverskudd. Ved hjelp av den kjente konsentrasjonen på permanganatløsningen kan man finne mengden hydrogenperoksid ved molforholdet på 2:5. Metoden egner seg for løsninger med 0,25-70% H₂O₂

Reaksjonslikning 1:



I dette studiet ble hydrogenperoksid titrert med en standardløsning med kaliumpermanganat. Svovelsyre ble tilsatt hydrogenperoksid før titrering for regulering av pH. For å få et mest mulig presist svar ble en autotitrator brukt til titreringen.

2.3 Forsøksdyr

I toksikologiforsøk ble rekearten *Pandalus Montagu* (blomsterreker) brukt som forsøksdyr.

Til forsøk utført i månedsskiftet november-desember ble det brukt reker som tidligere hadde blitt brukt som kontrollgruppe i et eksponeringsforsøk. Etter dette forsøket hadde de vært i flere måneder i kar, og viste ingen tegn på å være preget. Rekene hadde blitt foret med fiskefôr i den perioden de hadde vært i kar.

Til forsøk utført i februar ble det fisket nye reker. Rekene ble fraktet til Havforskningsinstituttet og derfra videre til Matre i januar 2016. I utgangspunktet var det ca 600 tilgjengelige reker, men en del reker døde under frakt. I tillegg døde ca 100 reker under aklimatisering i kar ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon i Matre. Rekene gikk i samlekar og ble foret på krill.

2.4 Feltforsøk

2.4.1 Feltforsøk oktober

Første feltforsøk ble utført i Hjeltefjorden rett sør for Storøksen ved Askøy rundt et oppdrettsanlegg tilhørende Lerøy Seafood 8. oktober 2015 . Anlegget bestod av 5 sirkelformede merder med en diameter på 60 m. Fjorden var omtrentlig 190 m dyp hvor merdene lå. 2 av merdene ble

behandlet for AGD på

forsøksdagen. Havstrømmen ble

målt med et Doppler-meter.

Strømmen var relativt svak og av

vekslende retning. Den sterkeste

strømmen målt under forsøksdagen

var på 0,7 kt og denne var målt ved

sjøoverflaten. Før forsøket hadde

det blitt gitt en indikasjon fra

oceanografer ved HI om at strømmen

i hovedsakelig var i nordgående

retning. Under AGD-behandlingen

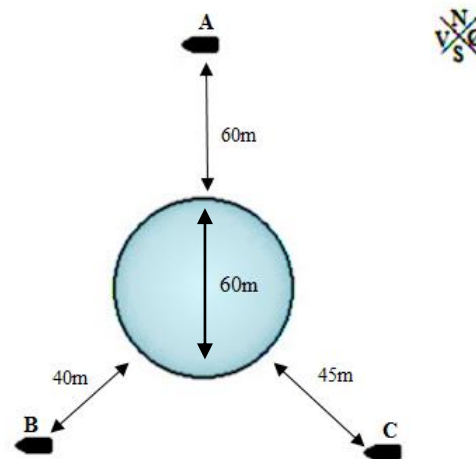
ble en presenning med en dybde på

ca 10 m brukt.

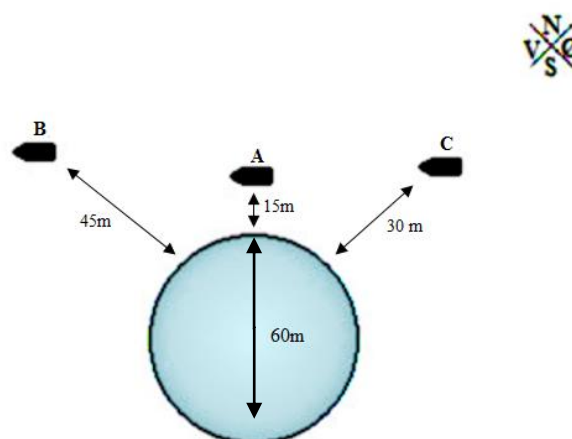
Hydrogenperoksidkonsentrasjonen

brukt i behandlingene var på

henholdsvis 1,31 og 1,33 g/L.



Figur 1: Illustrasjon viser plassering av båter under første merdbehandling under feltforsøk i oktober.



Figur 2: Figur 1: Illustrasjon viser plassering av båter under andre merdbehandling under feltforsøk

Tre båter ble plassert ut for opptak av vannprøver. Ved første behandling lå båt A 60 m nord for merdkanten, båt B lå 40 m sørvest og båt C lå 45 m sørøst (Figur 1). Hver båt var utstyrt med et pumpesystem tilkoblet slanger med 25 mm åpning. Vann ble pumpet opp fra 10, 20, 30, 40, 60, 90, 130 og 150 meters dybde. Kun båt A var utstyrt med slanger som rakk ned til 130 og 150 meters dybde. Slipp av presenningen etter AGD-behandlingen ble satt til t_0 . Ved 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 og 40 min etter t_0 ble det tatt vannprøver fra nevnte dyp. Båt B og C sluttet å ta prøver etter 20 min.

Under forsøk 2 var båt A plassert 15m nord for merdkanten, båt B 45 m nordvest og båt C 30 m nordøst (Figur 2). Samme pumpesystem ble brukt som under forsøk 1, men på grunn av en teknisk feil hadde båt B kun fungerende pumper ved 20 og 90 meters dyp. Vannprøver ble under forsøk 2 tatt ved 2, 4, 6, 8, 10, 15 og 20 min, alle prøvene ble oppbevart i 500 mL-plastflasker. Vannprøvene ble oppbevart i 500 mL-plastflasker fram til analysering. Alle vannprøvene fra ble analysert med Quantofix teststrimler.

2.4.2 Feltforsøk april

En ny runde med feltforsøk ble gjennomført 14. og 15. april 2016. Forsøket ble planlagt og utført som et samarbeid mellom Akzo Nobel, Chemco, Aqua Kompetanse, UiB, og Havforsningsinstituttet. Merdanlegget tilhørte Lerøy Seafood og lå i Hjeltefjorden like utenfor Tjeldstø. Anlegget bestod av 6

sammenhengende rektangulære merder (Figur 3). Hver merd var ca 50 m lang og 25 m bred. Fjorden var ca 60 – 90 m dyp under anlegget. To merdbehandlinger ble utført 14. april og én 15. april. Vannprøver ble tatt ved samtlige merdbehandlinger. Sjøtemperaturen var på ca 6°C de to forsøksdagene. I merdene ble det behandlet med en H₂O₂-konsentrasjon på ca 2,0 g/L på grunn av den lave sjøtemperaturen.

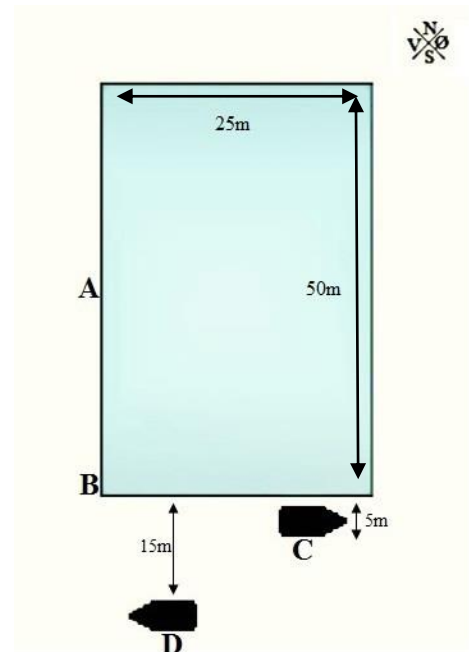


Figur 3: Oversikt over anlegg hvor feltforsøk i april ble utført. Bildet er kopier fra Google maps (maps, 2016)

Fire pumpestasjoner ble plassert ut ved merdene. Stasjon A var plassert midt på merden, stasjon B ved sør-vestlig hjørne, stasjon C 5 meter sør for merd og stasjon D 15-20 m sør for merd (Figur 4). Plasseringen av pumpestasjonene ble gjort med tanke på en sørgående strøm i området.

Pumpestasjonene tok vannprøver ved 5, 20, 30, 40, 60 og 90 meters dyp. T₀ ble satt til slipp av presenning og vannprøver ble tatt ved -5, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 og 25 min. Målet med stasjon A var å ta prøver rett under merden, og det ble derfor kun tatt prøver fra 30-90 meters dyp ved stasjonen. Under prøvetakning etter 3. merdbehandling sviktet pumpene ved stasjon C etter 20 min og noen prøver ved 25 min mangler derfor. Eventuelle andre prøver som mangler skyldes tilfeldigheter.

Alle vannprøver ble analysert samme dag som de ble tatt. Prøvene ble først testet med Quantofix teststrimler og sortert ut fra konsentrasjon. Alle prøver som hadde en H₂O₂-konsentrasjon på under 5 mg/L ble etterpå analysert spektrofotometrisk med VacuVials sett K-5543. Prøvene med høyere konsentrasjoner ble analysert ved hjelp av kaliumpermanganattitrering. Prøvene som hadde for lave H₂O₂-konsentrasjoner til å detekteres spektrofotometrisk ble fraktet til Akzo Nobels fasiliteter i Sverige for videre analyser. Nøyaktig hvilken metode disse prøvene ble analysert med har det ikke lyktes å få klarhet i.



Figur 4: Illustrasjon viser plassering av pumpestasjoner ved feltforsøk i april. Den relative posisjonen av stasjonene i forhold til merden var lik ved samtlige behandlinger.

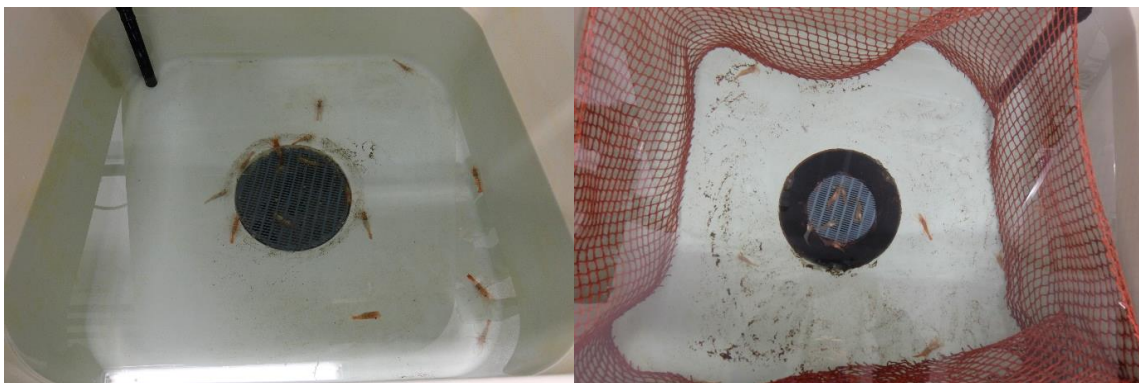
2.5 Toksisitetsforsøk

En rekke toksisitetsforsøk ble utført ved Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre for å undersøke hydrogenperoksids toksiske effekt på rekearten *Pandalus montagui*. Det ble også sjekket om bruk av kobberimpregnerte nøter påvirker hydrogenperoksids toksisitet. Fordi tilgangen til forsøksdyr var begrenset måtte hensyn tas under planlegging og gjennomføring av forsøk. Kar som rommet ca 400 L med gjennomstrømning av sandfiltrert sjøvann fra Masfjorden ble brukt i alle toksisitetsforsøkene. Vannet i karene holdt en stabil temperatur på 8-9°C. Per forsøkskar ble det brukt 15 forsøksdyr.

Rørsystemet som ledet vann ut av karene gjorde vannvolumet i karene ustabil hvilket medførte vanskeligheter med å oppnå de ønskede H₂O₂-konsentrasjoner. Resultatene må derfor ses i lys av de målte hydrogenperoksidkonsentrasjonene. I alle forsøk ble to kar kledd med kobbernot av typen AquaNet North Sea Ultra fra Steen Hansen. Denne typen not er impregnert med Kopperoksid (Cu₂O).

2.5.1 Uke 49

Første runde med toksisitetsforsøk ble gjennomføre uke 49 i 2015. 1 uke før forsøket hadde kobbernøter blitt hengt opp i to av karene. Forsøksdyrene fikk gå fritt i 400L-karene med vannutskiftingen avslått under eksponeringen. Etter 1 time med H₂O₂-eksponering ble vannutskiftingen skrudd på igjen for å simulere en naturlig fortynning. Forsøksdyrene ble tatt opp av karene 24 timer etter vannutskiftingen ble slått på. Etter 24 timer ble eventuell dødelighet og atferdspåvirkning hos forsøksdyrene dokumentert. Atferdsendringer ble vurdert ut fra hvordan rekene reagerte når de ble forsøkt fanget opp med håv fra karet. Rekene som ikke var i stand til å svømme ble vurdert som svært påvirket og de som svømte men viste nedsatt reaksjonsevne ble vurdert som påvirket.



Figur 5: De to ulike oppsett i kar ved forsøk gjennomført i uke 49. Bildet til høyre viser oppheng av kobberimpregnert not.

6 kar ble brukt i dette forsøket. Ett av karene ble brukt som kontroll mens tre fikk tilsatt hydrogenperoksid for å oppnå konsentrasjoner på ca 1,5 – 15,0 og 150 mg/L. Av karene med kobberimpregnert not ble det ene karet tilsatt hydrogenperoksid for å oppnå konsentrasjoner på 150 mg/L, mens det andre ble brukt som en «kobberkontroll».

2.5.2 Uke 6 og 7

Neste runde med toksisitetstests ble gjennomført uke 6 og 7 i 2016. Basert på praktiske forhold og resultater fra første toksisitetstest ble designet endret noe. Reke ble denne gang plassert i individuelle bur som fløt i karene. H₂O₂-eksponeringen varte i 1 eller 6 timer og når eksponeringstiden var over ble reke raskt flyttet over i recovery-kar med rennende sjøvann. Etter 24 timer i recovery-karene ble antall døde og påvirkede reker telt opp. Påvirkede reker ble vurdert som i uke 49. Reke ble så tatt opp av karene, ett og ett kar i gangen. Vekt, total lengde og lengde på Carapace for hver enkelt reke ble så målt, det ble også dokumentert dersom reke var død ved opptak fra kar. Fra 5 reker ble gjellene fjernet og lagt på formalin, mens de resterende reke ble frosset med flytende nitrogen og lagt i en -80 °C-fryser.

Ønskede konsentrasjoner for forsøkene i uke 6 og 7 var 0,5 – 3,5 – 24,5 og 171,5 mg/L. Kobbernøtene fra november-desember ble gjenbrukt i uke 6, mens nøter som hadde hengt i kar med vanngjennomstrømming i 1 uke ble brukt i uke 7



Figur 6: oppsett av forsøk utført i uke 6 og 7. Nederste bilde viser oppheng av kobberimpregnert not.

For 1-timeseksponeringen i uke 6 ble det brukt til sammen 6 kar. Et kar var kontroll og fire kar ble tilsatt hydrogenperoksid. I de to siste karene var noten som ble brukt i november-desember fortsatt spent opp, denne ble ikke skiftet ut. På grunn av problemer med et veldig ustabil vannvolum for den ene karet med kobbernot gikk det ikke å tilpasse hydrogenperoksidkonsentrasjonen i dette karet og det ble derfor kuttet fra forsøket. Dette problemet ble ordnet til videre forsøk.

I uke 7 ble 1-timeseksponeringen fra uke 6 gjentatt. På grunn av lav eller ingen dødelighet ved de tre laveste hydrogenperoksidkonsentrasjonene i tidligere forsøk ble laveste hydrogenperoksidkonsentrasjon utelatt. De eksperimentelle forholdene var altså kontroll, kobberkontroll, 3,5 mg/L, 24,5 mg/L og 171,5 mg/ hydrogenperoksid samt et kar med kobbernot og ca 171,5 mg/L hydrogenperoksid.

I uke 6 og 7 ble det også gjennomført to 6-timerseksponeringer. De ble utført på samme vis som 1-timerseksponeringene. Begge 6-timerseksponeringene hadde følgende eksperimentelle forhold: kontroll, kobberkontroll, 0,5 mg/L, 3,5 mg/L, 24,5 mg/L og 171,5 mg/ hydrogenperoksid samt et kar med kobbernot og ca 171,5 mg/L hydrogenperoksid.

2.5.3 EC₅₀- og LC₅₀-verdier

Resultatene fra eksponeringsforsøkene ble brukt til å beregne EC₅₀- og LC₅₀- verdier. EC₅₀- verdien forteller hvilken konsentrasjon som kreves for å påvirke 50% av forsøksdyrene ved en gitt eksponeringstid. Det ble ikke gjort forskjell på rekene som ble vurdert som påvirket og svært påvirket i utregningen. Tilsvarende forteller LC₅₀- verdien hvilken konsentrasjon som behøves for å drepe 50% av forsøksdyrene.

EC- og LC verdier ble beregnet med Excel-tillegget XLStat. Både en logit- og en probit-analyse kan brukes til å beregne LC- og EC-verdiene. Probit-modellen antar normalfordeling i forhold mellom uavhengig (konsentrasjon) og avhengig variabel (dødelighet), mens en logit-modell antar et logistisk forhold. I praksis gir probit- og logit-modeller svært like resultater, men logit-modellen gir som regel en lengre hale på kurven (Horowitz & Savin, 2001). I denne oppgaven ble en logit-modell brukt for å beregne LC-verdier.

2.6 Nedbrytningsforsøk

For å estimere nedbrytningshastigheten til hydrogenperoksid ble et enkelt forsøk utført med vann fra 1-timerseksponeringen i uke 6. Fra 3 kar med ulike H₂O₂-konsentrasjoner ble til sammen 6 1-litersflasker fylt opp; to og to flasker med vann fra samme kar. 3 flasker med vann fra ulike kar ble så satt i vannbad som holdt en jevn temperatur på 8-9°C, mens de resterende 3 flaskene ble plassert i vannbad med temperatur på 12°C. H₂O₂-konsentrasjonen i flaskene ble så målt tidvis i ca. 1 uke. De målte H₂O₂-konsentrasjonene til ble så plottet mot antall timer. Grafen tydet på et tilnærmet lineært forhold mellom konsentrasjon og tid.

Likningen til grafens regresjonslinje ble brukt til å finne halveringstidene til hydrogenperoksid ved de ulike temperaturene.

2.7 GSH

Fordi hydrogenperoksid er en sterk oksidant ble det gjennomført et glutathion-assay for å undersøke rekene fra toksisitetstestene for oksidativt stress. Glutathion er viktig for detoksifisering hos en rekke arter og står for eliminering av blant annet oxy-radikaler ved å binde dem opp (Ringwood et al., 2003). En depleksjon av glutathion kan indikere høy tilstedeværelse av frie radikaler (A. H. Ringwood & Connors, 2000). Protokoll er basert på den beskrevet for *Palaemonetes pugio* av Ringwood et al. (2003) (Ringwood et al., 2003).

2.7.1 Forberedelse av biologiske prøver

Rekene ble frosset hele like etter avsluttet toksisitetstest. Til GSH-assayet ble reker som ikke hadde dødd under toksisitetstesten valgt ut. Hepatopankreas ble fjernet fra rekene når de var tilstrekkelig tinct, også mage og gjellevev ble ivarettatt til eventuelt senere bruk.

Hepatopankreas ble så delt i to og veid. Vevsprøvene ble så overført til kryorør. Ca 300 µL SSA 5% ble tilsatt hver enkelt prøve for å hindre uttørking. Prøvene ble så tilsatt ca 0,3 g lyseringskuler fra MP Biomedical for homoogenisering i en Fast Prep-maskin. Maskinen ristet prøvene i 2x20 sek. Prøvene ble lagt på is etter hver 20-sekundersperiode. Etter homoogenisering ble prøvene sentrifugert ved 13000g og 4°C i 5 minutter.

Etter sentrifugering hadde de homogeniserte hepatopankreasprøvene skilt ut en tydelig supernatant. 50 µL av supernatanten ble overført fra kryorørene til Eppendorfrør og 150 µL 5% SSA ble tilsatt prøvene.

2.7.2 Tillaging av løsninger

5% SSA og Na₃PO₄-bufferen ble tillagd først. Begge løsningene er relativt stabile og kan oppbevares i kjøleskap i opp til 2 uker.

DNTB- og NADPH- løsningene ble så tillagd. Begge disse løsningene måtte lages på ny hver gang assayet skulle kjøres. Før assayet ble DNTB- og NADPH-løsningene blandet. På grunn av lav stabilitet ble GSH- og GSSG-løsningene lagd til sist. Glutation reduktase er blant annet lyssensitivt og denne løsningen ble lagd så sent som mulig.

Av GSH-standarden ble det lagd en fortynningsrekke med 8 løsninger som skulle anvendes til å lage en standardkurve. Løsningene ble gitt navn a-h hvor h var en blankprøve. Følgende løsninger ble tillagd i eppendorfrør:

Tabell 6: Oversikt over innhold i tillagde standardløsninger til GSH-assay.

Prøve	Konsentrasjon	Innhold	
a	160 µM	336µL SSA 5%,	64 µL GSH-standard
b	80 µM	200 µL SSA 5%	200 µL prøve a
c	40 µM	200 µL SSA 5%	200 µL prøve b
d	20 µM	200 µL SSA 5%	200 µL prøve c
e	10 µM	200 µL SSA 5%	200 µL prøve d
f	5 µM	200 µL SSA 5%	200 µL prøve e
g	2,5 µM	200 µL SSA 5%	200 µL prøve f
h	0 µM	200 µL SSA 5%	

2.7.3 Klargjøring av plate

En plate med 96 brønner ble brukt i assayet. Klargjøringen av platen til avlesning ble gjort i et mørkerom på grunn av lyssensitivitet etter tilsetning av glutation reductase. Fra de tillagde GSH-fortynningsløsningene samt fra hepatopankreasprøvene ble det overført 50 μ L til tre påfølgende brønner. 190 μ L NADPH/DNTB-løsning ble så tilsatt hver enkelt brønn. Til sist ble 30 μ L av GSSG-løsningen tilsatt hver brønn raskt. Fordi tilsetning i hver enkelt brønn med en autopipette tok veldig lang tid ble det etter hvert bestemt å bruke en autopipette med 12 kanaler. Platen ble så avlest ved 405 nm hvert 30. sekund i 7 sykluser. Avlesning over tid ga en kinetisk graf for hver brønn som gir en indikasjon for reaksjonshastigheten. Stigningstallet til den kinetiske grafen kan brukes til å finne mengden GSH i vevsprøvene.

Fordi tre paralleller ble klargjort fra hver prøve ga den spektrofotometriske analysen 3 stigningstall per prøve. Gjennomsnittet til disse tre stigningstallene ble brukt videre i utregningene. Stigningstallene for standardløsningene ble plottet mot deres kjente GSH-konsentrasjoner hvilket ga en lineær standardkurve. Likningen til trendlinjen i standardkurven kunne så brukes til å regne ut GSH-konsentrasjonen til de ukjente prøvene.

Gjennomsnittlige GSH-verdier for hver eksponeringsgruppe ble analysert med en Dunnet-test og en Tukey-test i excel-tillegget XLStat. Ved hjelp av en Dunnet-test kan de forskjellige behandlingsgruppene sammenlignes med kontroll for å undersøke om de er signifikant forskjellige. Tukey-test viser derimot om det er noen signifikante forskjeller mellom de enkelte gruppene ved å sammenligne to og to grupper. Disse testene egnet seg godt da de kan brukes uavhengig av gruppestørrelse (Day & Quinn, 1989).

2.8 Histologi

Gjelleprøver fra 6-timerseksponeringen i uke 6 og 7 ble undersøkt med lysmikroskopering. Histologisk prosessering ble utført på Molekylærbiologisk laboratorium ved Havforskningsinstituttet av Ingrid Fiksdal.

For klargjøring av preparater til lysmikroskopering blir prøven først lagt i små plastbur. Beholderne blir så badet i etanol for automatisk dehydrering, xylene for «clearing» og deretter parafin for innleiring. Denne prosessen tar ca et halvt døgn og blir utført i et Histokinette-apparat. Prøvene blir så støpt i parafin i støpemaskin. Etter parafinen har satt seg blir de snittet og plasert på objektglass. Gjenværende parafin blir fjernet før snittene blir farget med Haematoxylin, Erythrosin og Safranekstrakt. Dekkglass blir festet til snittene med monteringslim som har samme bytningsindeks som glasset. På grunn av bruk av sterke løsemidler blir deler av prosessen gjennomført i avtrekksskap. Etter prøvene er klargjort må de ligge til avdunsting i avtrekksskap i 3-4 dager.

Etter klargjøring av snittene ble de studert ved hjelp av lysmikroskopi.

3. Resultater

3.1 Feltforsøk oktober 2015

3.1.2 Første behandling

Tabell 7, 8 og 9 viser hydrogenperoksidkonsentrasjoner målt ved ulike dybder til gitte tidspunkter etter t_0 ved første merdbehandling 08.10.2016. Alle vannprøver ble analysert med Quantofix teststrimler. Fisken i merden ble behandlet for AGD og den opprinnelige behandlingskonsentrasjonen var på 1,31 g/L. Behandlingsvolumet i merden var 10 000 m³. Strømmålinger i området viste svak styrke med høyeste måling på 0,6 kt. Sjøtemperaturen var på tilnærmet 12,5 °C. T_0 er satt til slipp av presenning etter behandling.

Målingene viser svært lave konsentrasjoner, i de fleste tilfeller under deteksjonsgrensen til Quantofix teststrimler (<0,5 mg/L). Den høyeste hydrogenperoksidkonsentrasjonen ble observert ved båt B1 som lå 40 m sørvest for merdkanten. Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner oversteg ikke 10 mg/L hvilket indikerer en fortykning på minst 1:130. Det er for få konsentrasjoner over teststrimlenes deteksjonsområde til å gi noen klare indikasjoner på hydrogenperoksids diffusjon etter slipp av presenning.

Tabell 7: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte tidspunkt ved båt A1 (ca. 60 m nord for merd).

Dybde (m)	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner(mg/L) målt ved tidspunkt:								
	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min
10 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
20 m	5	<0,5	<0,5	<0,5	2	<0,5	<0,5	2	<0,5
40 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
60 m	<0,5	<0,5	<0,5	5	<0,5	3	<0,5	<0,5	0,5
90 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	5	2	<0,5	<0,5
130 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	2	<0,5	<0,5
150 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,5	<0,5

Tabell 8: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte tidspunkt ved båt B1 (ca. 40 m sørvest for merd).

Dybde (m)	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner(mg/L) målt ved tidspunkt:						
	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min
10 m	0,5	<0,5	0,5	<0,5	10	<0,5	<0,5
20 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,5	<0,5
40 m	<0,5	<0,5	<0,5	2	<0,5	<0,5	<0,5
60 m	0,5	<0,5	0,5	0,5	<0,5	<0,5	<0,5
90 m	<0,5	2	<0,5	<0,5	<0,5	3	<0,5

Tabell 9: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte tidspunkt ved båt C1 (ca. 45 m sørøst for merd).

Dybde (m)	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner(mg/L) målt ved tidspunkt:						
	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min
10 m	<0,5	<0,5	<0,5	0,5	<0,5	<0,5	<0,5
20 m	<0,5	2	<0,5	<0,5	0,5	<0,5	<0,5
40 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,5
60 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
90 m	<0,5	<0,5	0,5	0,5	<0,5	<0,5	<0,5

3.1.2 Andre behandling

Tabell 10, 11 og 12 viser målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner etter andre merdbehandling 08.10.2016 ved gitte tidspunkter etter t_0 . Fisken i merden ble behandlet for AGD og den opprinnelige behandlingskonsentrasjonen var på 1,33g/L. Behandlingsvolumet i merden var 9566 m³. De fleste vannprøvene hadde H₂O₂-konsentrasjoner under praktisk deteksjonsgrense for Quantofix teststrimler. Høyeste konsentrasjon ble observert ved båt A2 som lå 15 m nord for merdkanten, denne konsentrasjonen var på 25 mg/L. Dette er en høyere konsentrasjon enn det som ble observert under første badebehandling. Det var generelt flere detekterbare konsentrasjoner etter andre merdbehandling enn det var etter første.

Data fra båt C2 er noe mangelfulle fordi en teknisk feil førte til at 3 av pumpene på denne båten sviktet. Det er også noe mindre data fra båt A ettersom målingene ble stoppet etter 20 minutter ikke etter 40 som ved båt A2.

Dersom man sammenligner de data som er tilgjengelige fra 2. merdbehandling med tilsvarende data fra 1. behandling ser en at i 2. behandling var 33 detekterbare konsentrasjoner i motsetning til 1. behandlings 21 detekterbare konsentrasjoner. Dette kan tyde på at båtene ved andre behandling lå bedre plassert i forhold til merd og strømretning eller at det kan være noe gjenværende H₂O₂ fra første behandling. En annen vesentlig forskjell var høyere behandlingskonsentrasjon ved 2. behandling med 1,33 g/L mot 1,31 g/L.

Tabell 10: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte tidspunkt ved båt A2 (ca. 15 m nord for merd).

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner(mg/L) målt ved tidspunkt:						
	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min
10 m	2	2	2	2	2	1	25
20 m	0,5	<0,5	2	1	1	0,5	<0,5
40 m	<0,5	10	<0,5	0,5	0,5	<0,5	<0,5
60 m	<0,5	<0,5	0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
90 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
130 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
150 m	2	1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Tabell 11: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte tidspunkt ved båt B2 (ca. 35 m nordvest for merd).

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner(mg/L) målt ved tidspunkt:						
	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min
10 m	2	2	2	2	2	2	2
20 m	2	2	0,5	5	5	5	2
40 m	2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
60 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
90 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Tabell 12: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte tidspunkt ved båt C2 (ca. 30 m nordøst for merd).

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner(mg/L) målt ved tidspunkt:						
	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min
10 m							
20 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
40 m							
60 m							
90 m	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

3.2 Feltforsøk April

3.2.1 Første behandling

Tabell 13-16 viser målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner etter første avlusning 21.04.16. T_0 er satt til slipp av presenningen etter avlusning. Strømretningen i området var i sørgående. Det ble ikke gitt fordose av hydrogenperoksid før behandlingen behandlingskonsentrasjonen ble 2,3 g/L, noe høyere enn den ønskede konsentrasjonen på 2 g/L Etter behandlingen ble det registrert noe dødelighet hos laks i anlegget, antageligvis skyldes dette den høye behandlingskonsentrasjonen. Konsentrasjonsmålinger ble gjort med kaliumpermanganattitrering og spektrofotometri.

Målingene har stort sett lave konsentrasjoner. Noen høye konsentrasjoner kan likevel observeres. Høyeste konsentrasjoner ble målt ved posisjon B og C ved henholdsvis. Ved posisjon B ble det målt 727,81 mg/L ved 5 meters dyp etter 6 minutter, mens det ved posisjon C ble målt 778,83 mg/L H_2O_2 ved 10 meters dyp etter 15 minutter. Posisjon B var like ved merdens sørvestlige hjørne og posisjon C var ca. 5 meter fra merdens sørlige kant, begge stasjoner i strømretning i forhold til merden. Ved posisjon D, som var 15-20 meter sør for merden kunne en se forhøyede H_2O_2 -konsentrasjoner fra 15 minutter etter T_0 . Igjen ser en høyeste konsentrasjoner ved 5-30 meters dyp. Ved posisjon B ble det målt en H_2O_2 -konsentrasjon på over 20 mg/L allerede før presenningen ble sluppet, dette kan være et tegn på en lekkasje fra presenningen.

Tabell 13: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon A (midt på merd, vestsida). T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
30 m	0,46	0,18	0,04	0,54	0,06	1,07	1,03	0,04	22,28	38,43
40 m	0,05	0,10	0,08	0,07	0,03	0,03	0,03	0,05	0,07	0,14
60 m	0,15	0,02	0,02	0,14	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Tabell 14: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon B (sørvestlig hjørne av merd). T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,37	38,43	62,75	62,41	727,81	230,42	5,78	113,59	320,03	288,06
10 m	0,03	0,33	0,66	0,32	38,77	5,44	231,27	270,04	269,36	57,82
20 m	23,30	2,14	2,60	17,01	35,37	12,24	116,82	32,99	48,12	55,10
30 m	0,03	0,09	0,03	0,03	1,49	1,26	0,12	40,47	28,91	0,59
40 m	0,03	0,02	0,03	0,09	0,04	0,03	0,03	0,06	0,09	24,83
60 m	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,06	0,03	0,06	0,07

Tabell 15: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon C (5 m sør for merd). T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,20	0,11	0,15	0,06	0,07	0,03	0,03	0,33	0,02	0,14
10 m	0,16	0,26	0,38	0,26	0,43	2,83	2,17	778,83	258,31	105,94
20 m	0,71	0,18	0,11	0,27	0,17	0,34	1,12	123,97	0,46	2,57
30 m	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,28	0,03	0,03
40 m	0,02	0,02	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02	0,03	0,15	0,08
60 m	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,07	0,14	0,02	0,05

Tabell 16: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon D (15-20 m sør for merd). T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,17	0,13	0,02	0,17	0,18	0,11	0,17	0,09	0,23	40,64
10 m	0,22	0,09	0,08	0,07	0,07	0,19	0,09	0,18	0,04	0,33
20 m	0,21	0,08	2,59	0,12	0,10	0,14	0,70	17,69	0,03	36,05
30 m	0,14	0,05	0,02	0,09	0,09	0,05	0,03	1,89	29,59	0,73
40 m	0,02	0,06	0,15	0,09	0,03	0,14	0,02	0,06	0,10	0,03
60 m	0,10	0,10	0,02	0,07	0,02	0,02	0,12	0,16	0,02	0,02

3.2.2 Andre behandling

Tabell 17-20 viser målte H₂O₂-verdier etter andre avlusning. T₀ er satt til slipp av presenning etter avlusning. Behandlingskonsentrasjonen i merden var 1,7 mg/L. Andre behandling ble utført samme dag som første behandling.

Generelt ser en litt høyere konsentrasjoner etter denne avlusningen enn en gjorde etter første. Det er også observert noe forhøyede konsentrasjoner før slipp av presenning. Forhøyede bakgrunnskonsentrasjoner kan skyldes gjenværende H₂O₂ etter første behandling.

Tabell 17: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon A (midt på merd, vestside). T₀ er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
30 m	0,09	0,06	0,09	0,25	0,05	0,85	0,58	10,37	2,09	2,25
40 m	0,03	0,15	0,05	0,25	0,08	0,15	0,07	0,19	0,03	0,47
60 m	0,39	0,63	0,37	0,68	0,58	723,56	462,54	323,10	312,38	271,74

Tabell 18: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon B (sørvestlig hjørne av merd). T₀ er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,85	1,06	0,71	673,23	609,63	697,21	504,20	215,28	669,79	353,70
10 m	3,59	23,47	19,22	13,94	17,69	134,68	275,14	243,17	378,27	159,36
20 m	0,03	0,20	0,16	0,08	20,75	3,54	13,26	16,32	14,28	20,24
30 m	0,09	0,11	0,11	0,17	13,94	10,54	15,98	0,13	7,82	2,88
40 m	0,03	0,16	0,17	0,08	0,13	0,09	0,10	0,06	0,10	0,14
60 m	0,43	0,42	0,60	0,58	0,43	0,44	0,38	0,44	0,20	0,58

Tabell 19: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon C (5 m sør for merd). T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,10	0,03	0,16	0,08	0,02	0,11	0,07	0,62	0,28	0,56
10 m	2,78	0,82	1,56	0,77	6,63	8,50	1,83		46,42	87,58
20 m	0,17	0,14	0,19	0,09	20,75	5,78	0,98	0,34	10,71	10,37
30 m	0,17	0,14	0,19	0,09	20,75	5,78	0,98	0,34	10,71	10,37
40 m	0,02	0,19	0,09	0,15	0,03	0,11	0,08	0,03	0,15	0,03
60 m	0,02	0,13	0,17	0,18	0,05	0,03	0,14	0,25	0,06	0,09

Tabell 20: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon D (15-20 m sør for merd). T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,18	0,19	0,34	0,20	0,34	0,28	0,51	0,57	11,05	50,50
10 m	1,53	1,37	1,53	0,96	1,65	1,57	1,34	23,64	61,39	43,53
20 m	2,89	0,11	0,08	0,17	0,20	0,11	0,05	19,73	0,55	12,07
30 m	0,15	0,44	0,03	0,04	0,05	0,07	0,13	0,27	0,29	6,12
40 m	0,04	0,03	0,13	0,03	0,12	0,03	0,03	0,17	0,20	0,05
60 m	1,63	1,37	3,46	3,71	0,46	0,85	1,55	2,42	2,16	0,84

3.2.3 Tredje avlusning

Tabell 21-24 viser målte H₂O₂-konsentrasjoner etter tredje avlusning. Behandlingen ble gjennomført dagen etter 1. og 2. behandling ved samme oppdrettsanlegg.

Behandlingskonsentrasjonen i merd var 1,8 g/L. Vannprøver ble analysert med kaliumpermanganattitrering eller spektrofotometrisk.

Ved posisjon A ser man igjen verdier som ligner de etter 1. avlusning. Ingen konsentrasjoner over 1 mg/L ble observert. Ved posisjon B var høyeste observerte H₂O₂-konsentrasjon på 69,21 mg/L og denne prøven ble tatt ved 10 meters dybde etter 25 minutter. Alle konsentrasjoner over 1 mg/L ble funnet fra 5 til 30 meters dyp. Ved posisjon C er det kun én prøve tatt med en H₂O₂-konsentrasjon på over 1mg/L hvilket er langt mindre enn de observerte konsentrasjoner ved 1. og 2. behandling. Ved posisjon D ble det tatt 3 vannprøver med H₂O₂-konsentrasjoner over 1mg/L og samtlige ble tatt ved 20 meters dybde. Den høyeste målte konsentrasjonen ved posisjon D var likevel kun på 10,20 mg/L.

Tabell 21: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon A (midt på merd, vestsida) etter 3. merdbehandling. T₀ er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
30 m	0,09	0,10	0,27	0,87	0,13	0,27	0,13	0,08	0,06	0,08
40 m	0,03	0,03	0,14	0,15	0,06	0,04	0,03	0,05	0,03	0,04
60 m	0,88	0,51	0,51	0,55	0,64	0,83	0,38	0,13	0,66	0,19

Tabell 22: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon B (sørvestlig hjørne av merd) etter 3. merdbehandling. T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,18	0,13	0,14	0,29	0,15	1,22	31,46	8,67	13,77	49,14
10 m	5,27	0,08	0,08	0,09	0,35	21,26	8,84	4,07	38,09	69,21
20 m	0,03	0,02	0,13	0,05	0,11	0,32	2,05	3,48	37,24	28,06
30 m	1,25	0,25	0,19	0,18	0,44	0,08	0,02	0,25	0,14	0,09
40 m	0,03	0,05	0,13	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06
60 m	0,11	0,37	0,33	0,29	0,40	0,36	0,31	0,25	0,34	0,28

Tabell 23: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon C (5 m sør for merd) etter 3. merdbehandling. T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:								
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min
5 m	0,06	0,04	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,10
10 m	0,04	0,03	0,03	0,57	0,08	0,03	0,62	0,68	1,41
20 m	0,09	0,21	0,09	0,53	0,24	0,04	0,09	0,08	0,05
30 m	0,14	0,16	0,09	0,52	0,57	0,25	0,57	0,35	0,39
40 m	0,30	0,57	0,50	0,54	0,67	0,67	0,64	0,36	0,49
60 m	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,33	

Tabell 24: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner ved gitte dybder og tidspunkt ved posisjon D (15-20 m sør for merd) etter 3. merdbehandling. T_0 er satt til slipp av presenning etter avlusning.

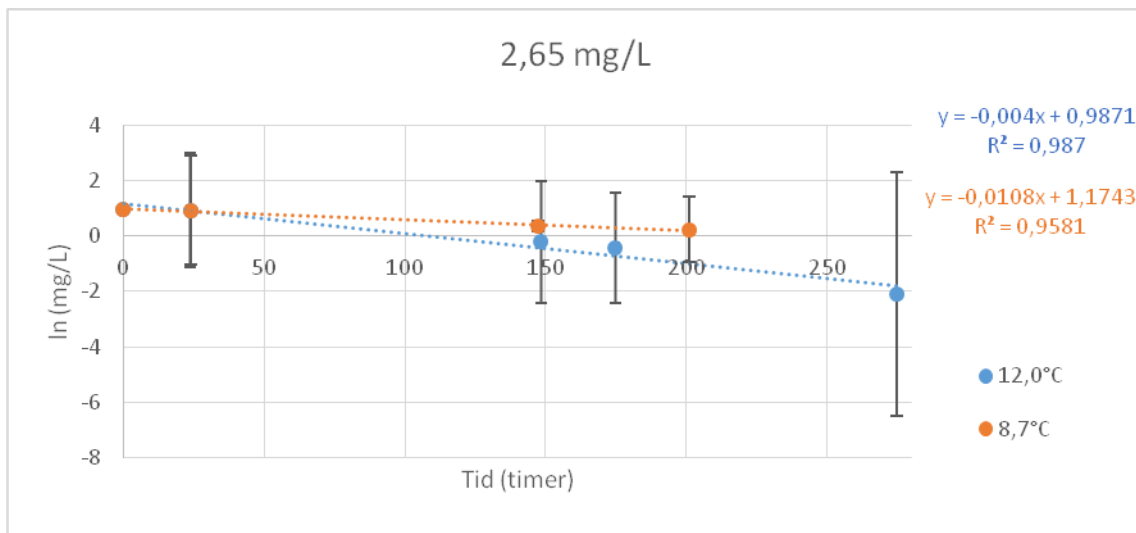
Dybde	Hydrogenperoksidkonsentrasjoner (mg/L) målt ved tidspunkt:									
	-5 min	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	15 min	20 min	25 min
5 m	0,49	0,09	0,74	0,55	0,37	0,29	0,52	0,14	0,03	0,24
10 m	0,08	0,09	0,08	0,13	0,05	0,10	0,06	0,08	0,18	0,06
20 m		1,15	0,36	0,20	0,17	0,11	0,06	0,17	3,47	10,20
30 m	0,13	0,16	0,05	0,04	0,04	0,08	0,05	0,04	0,05	0,04
40 m	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
60 m	0,32	0,25	0,31	0,30	0,23	0,19	0,20	0,23	0,19	0,18

Det ble funnet generelt lave H_2O_2 -konsentrasjoner etter feltforsøkene i april. Noen høye konsentrasjoner på over 700 mg/L ble observert. De høye konsentrasjonene ble kun observert ved 2 punkter. Prøvene tatt etter 3. behandling viser lavere konsentrasjoner enn de to foregående behandlingene med en gjennomsnittskonsentrasjon på 1,61 mg/L for alle prøvene. Høyeste gjennomsnittskonsentrasjon kunne ses etter 2. behandling med 41,04 mg/L, mens gjennomsnittlig konsentrasjon etter første behandling var på 19,65 mg/L.

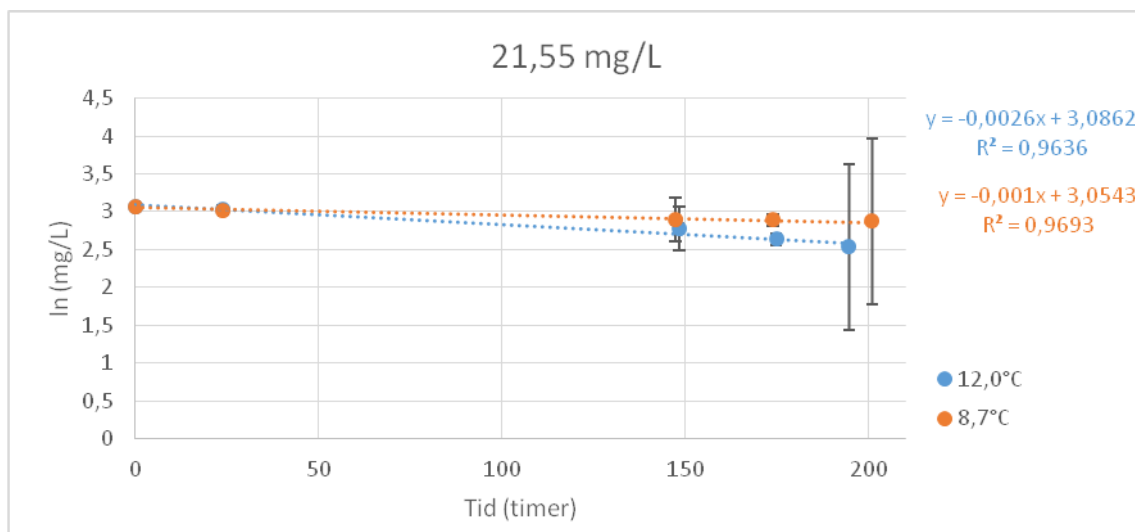
De høyeste konsentrasjonene kunne konsekvent finnes fra 5-20 meters dyp, med unntak etter 2. behandling hvor høyeste H_2O_2 -konsentrasjon ble funnet på 30 meters dyp ved posisjon A. Hele 78% av prøvene hadde en H_2O_2 -konsentrasjon på under 1mg/L og kun 5% av prøvene hadde konsentrasjoner på over 100 mg/L. I de områdene man så høye konsentrasjoner skjedde en rask reduksjon i H_2O_2 -konsentrasjon med tid.

3.3 Nedbrytningsforsøk

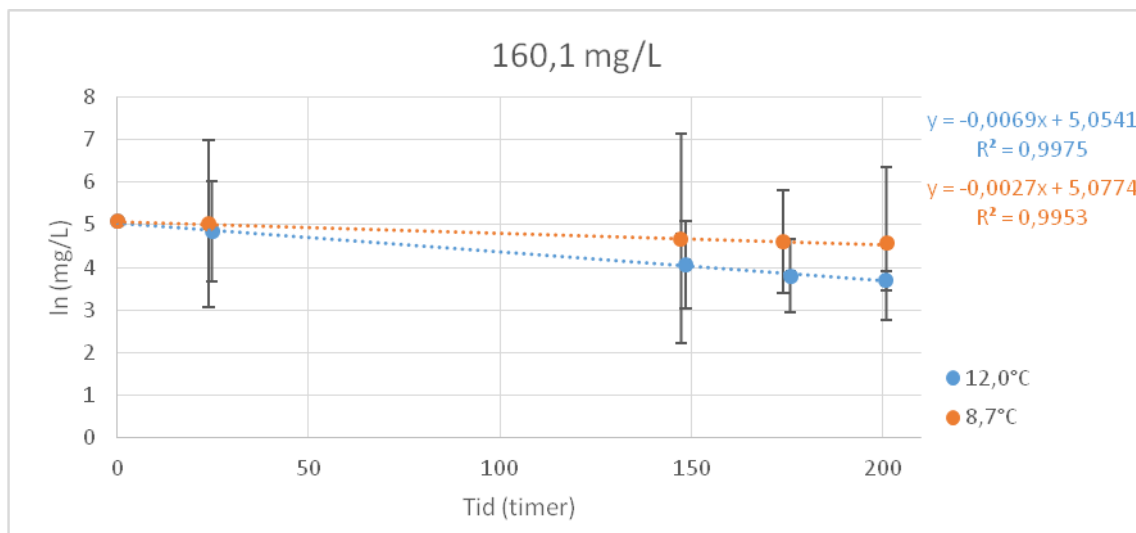
Figur 1, 2, og 3 viser hydrogenperoksidkonsentrasjoner plottet mot tid for tre forskjellige startkonsentrasjoner. For alle plot ble det utført en lineær regresjon hvilket ga det oppgitte ligningene i figurene. Punktene i diagrammet er gjennomsnittet for tre paralleller. Stolpene viser standardavviket for gjennomsnittet.



Figur 7: Kurvene viser den naturlige logaritmen av hydrogenperoksidkonsentrasjon plottet mot tid ved 8,7°C og 12°C og startkonsentrasjon på 2,65 mg/L. Søylene illustrerer SDM.



Figur 8: Kurvene viser den naturlige logaritmen av hydrogenperoksidkonsentrasjon plottet mot tid ved 8,7°C og 12°C og startkonsentrasjon på 21,55 mg/L. Søylene illustrerer SDM.



Figur 9: Kurvene viser den naturlige logaritmen av hydrogenperoksidkonsentrasjon plottet mot tid ved 8,7°C og 12°C og startkonsentrasjon på 160,1 mg/L. Søylene illustrerer SDM.

Figur 4, 5 og 6 viser at nedbrytningshastigheten til hydrogenperoksid øker med temperatur. I tabell 17 er de utregnede halveringstidene for hydrogenperoksid. Halveringstiden er lengst ved $C_0 = 21,55\text{mg/L}$ for begge temperaturer. Lengste observerte $t_{1/2}$ var ved 8,7°C og $C_0 = 21,55\text{mg/L}$.

Tabell 31: Utregnede halveringstider for de forskjellige startkonsentrasjonene med hydrogenperoksid ved 8,7°C og 12°C.

C_0 (mg/L)	$T_{1/2}$ ved 8,7°C (t)	$T_{1/2}$ ved 12°C (t)
2,58	176	83
21,55	677	272
160,1	257	97

3.4 Toksistetsforsøk

5.3.1 Forsøk uke 49

Tabell 25 viser målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner for forsøkskar under 1-timerseksponering med påfølgende vannutskifting. Det ble kun målt konsentrasjoner i kontrollkar før eksponering og etter 24 timer på grunn av en forventet stabil bakgrunnskonsentrasjon.

Vannprøvene tatt ved 60 minutter ble tatt like før vannutskiftingen ble igangsatt. I timen etter vannutskiftingen ble startet ser en nedgang i H₂O₂-konsentrasjon på 62,5 % i høydosekaret, 88,9% i mellomdosekaret, 62,6% i lavdosekaret og 99,5% i høydosekaret med kobbernot.

Variasjonene i konsentrasjonsnedgang skyldes at det ikke lot seg gjøre å stille inn vannutskiftingen nøyaktig. Etter 24 timer var alle H₂O₂-konsentrasjonene tilbake lik bakgrunnskonsentrasjon. H₂O₂-konsentrasjonen i høydosekaret med kobbernot ble høyere enn den ønskede konsentrasjonen på 150 mg/L. I merdbehandling brukes H₂O₂-konsentrasjoner fra 1,2 til 2,0 g/L. En fortyningsskala på 10 i forhold til 1,5 g/L ble brukt som utgangspunkt for de ønskede H₂O₂-konsentrasjonene da det ville gi konsentrasjoner som virket realistiske i forhold til resultatene fra feltforsøk.

Tabell 26 viser effekter hos de eksponerte rekene og kontroll etter H₂O₂-eksponeringen. Ingen påvirkning ble observert 2-3 timer etter oppstart av forsøket. Dataene fra tabell 25 viser effekter etter 24 timer i recovery-kar. I karene med lavdose og mellomdose H₂O₂ var det lav dødelighet. I høydosekaret hadde 6 av 15 reker dødd, og resten var tydelig påvirket. I kobberkontrollen så man en påvirkning som minnet om den i høydosekaret. Rekene i høydosekaret med kobbernot hadde veldig høy dødelighet.

Tabell 25: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner i kar før, under og etter eksponering i mg/L

<i>Tidspunkt</i>	Kontroll (mg/L)	Høydose (mg/L)	Mellomdose (mg/L)	Lavdose (mg/L)	Cu kontroll (mg/L)	Cu høydose (mg/L)
<i>Før eksponering</i>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05
<i>60 min</i>		157,00	18,25	1,31		265,70
<i>75 min</i>		144,40	10,30	0,80		82,10
<i>90 min</i>		161,90	7,30	0,49		15,30
<i>105 min</i>		88,40	1,87	0,41		12,70
<i>120 min</i>		58,80	2,04	0,49		1,25
<i>24 t</i>	0,02	0,039	0,01	0,02	0,03	0,01

Tabell 26: Påvirkning hos reker etter eksponering og 24 påfølgende timer i recovery-ker

<i>Gruppe</i>	Døde	Påvirket	Normale	Totalt antall reker
<i>Kontroll</i>	0	0	15	15
<i>Lavdose</i>	0	1	14	15
<i>Mellomdose</i>	1	0	14	15
<i>Høydose</i>	6	9	0	15
<i>Cu Kontroll</i>	5	10	0	15
<i>Cu Høydose</i>	14	1	0	15

3.3.2 1-timeseksponering uke 6

Tabell 27 viser målte H₂O₂-konsentrasjoner i forsøkskar under 1-timerseksponering i uke 6. H₂O₂-konsentrasjonene ble kun målt 1 gang per kar i løpet av eksponeringen grunnet en forventet stabil konsentrasjon. Tabell 27 viser også effekter hos de eksponerte reker. Kun 1 død reke ble observert totalt, denne i karet med mellomlav dose (4,25 mg/L). Den døde reken hadde ytre fysiske skader. I høydosekaret hadde alle reker redusert aktivitetsnivå. En fortynningsfaktor på 7 i forhold til behandlingskonsentrasjonen på 1,5 g/L ble brukt som utgangspunkt for de ønskede H₂O₂-konsentrasjonene da disse konsentrasjonene virket realistiske i forhold til resultatene fra feltforsøk i oktober 2015.

Tabell 27: Antall døde, påvirkede og normale reker etter 1-timerseksponering uke 6

<i>Dose</i>	Konsentrasjon H₂O₂(mg/L)	Totalt antall reker	Døde reker	Påvirkede reker	Normale
<i>Kontroll</i>	0,05	15	0	0	15
<i>Lavdose</i>	2,42	15	0	0	15
<i>Mellomlav dose</i>	4,25	15	1	0	14
<i>Mellomhøy dose</i>	33,90	14	0	0	14
<i>Høydose</i>	173,00	15	0	15	0
<i>Cu Kontroll</i>	0,05	15	0	0	15

3.3.2 1-timeseksponering uke 7

Tabell 28 viser målte H₂O₂-konsentrasjoner i forsøkskar under 1-timerseksponering i uke 7.

Kun 1 konsentrasjonsprøve ble tatt per kar grunnet en ventet stabil konsentrasjon.

Lavdosekaret ble i denne eksponeringen sløyfet basert på ingen observerte effekter i foregående 1-timerseksponering samt eksponeringsforsøk utført i uke 49.

Tabell 28 viser også effekter hos reker eksponert for H₂O₂. I kontrollkar og kar med mellomlav dose var det ingen observert dødelighet eller atferdsendring. I karet med mellomhøy H₂O₂-dose var det 1 død reke og 4 med nedsatt aktivitetsnivå. Også i høydosekaret kunne en observere 1 død reke. De resterende 14 rekene i høydosekaret hadde redusert aktivitetsnivå, hvorav 3 hadde veldig redusert aktivitetsnivå. 3 av rekene i kontrollkaret med kobbernot hadde redusert aktivitetsnivå. I høydosekaret med kobbernot var det igjen 1 død reke av de resterende 14 rekene ble 4 vurdert til å ha redusert aktivitetsnivå.

Tabell 28: Målte hydrogenperoksidkonsentrasjoner for hver dose og Antall døde, påvirkede og normale reker etter 1-timerseksponering uke 7

<i>Dose</i>	Konsentrasjon H₂O₂(mg/L)	Døde reker	Påvirkede reker	Normale reker	Totalt antall reker
<i>Kontroll</i>	0,05	0	0	15	15
<i>Mellomlav dose</i>	3,5	0	0	15	15
<i>Mellomhøy dose</i>	22	1	4	10	15
<i>Høydose</i>	197	1	15	0	15
<i>Cu Kontroll</i>	0,05	0	3	12	15
<i>Cu Høydose</i>	166	1	4	10	15

3.3.3 6-timeseksponering uke 6

Tabell 29 viser målte H₂O₂-konsentrasjoner 1 og 6 timer under 6-timerseksponering.

Målingene viser at konsentrasjonen holder seg stabil over tid. I høydosekaret med kobbernot ser en derimot en tydelig nedgang i konsentrasjon fra 175,2 mg/L ved 1 time til 71,5 mg/L etter 6 timer, hvilket gir en nedgang i konsentrasjon på 59,2%.

Effekter på reker etter eksponering for H₂O₂-konsentrasjonene er også gitt i tabell 29. Ved kontroll og lavdose ser man ingen effekt. Ved mellomlav dose var det etter recovery-perioden 1 død reke mens de resterende rekene i karet var tilsynelatende upåvirket. I karet med mellomhøy dose var 3 reker døde, mens de resterende rekene hadde redusert aktivitetsnivå. 3 av de påvirkede rekene hadde svært lavt aktivitetsnivå. I kontrollkaret med kobbernot var 2 rekene døde og hos de resterende 12 rekene kunne man ikke se noen tydelig atferdsendring. 6 reker var døde i høydosekaret, mens resten av rekene hadde redusert aktivitetsnivå. 6 av de påvirkede rekene i høydosekaret med kobbernot hadde svært redusert aktivitetsnivå.

Tabell 29: Målte H₂O₂-konsentrasjoner 1 og 6 timer etter oppstart og antall døde, påvirkede og normale reker ved 6-timerseksponering uke 6

<i>Dose</i>	C H₂O₂ ved 1t (mg/L)	C H₂O₂ ved 6 t (mg/L)	Totalt antall reker	Døde	Påvirket	Normale
<i>Kontroll</i>	0,05	0,05	15	0	0	15
<i>Lavdose</i>	0,31	0,29	15	0	0	15
<i>Mellomlav dose</i>	2,65	2,84	15	1	0	14
<i>Mellomhøy dose</i>	21,55	21,10	15	3	12	0
<i>Høydose</i>	164,40	154,60	15	7	8	0
<i>Cu kontroll</i>	0,05	0,05	15	2	0	13
<i>Cu høydose</i>	175,20	71,50	15	6	9	0

3.3.4 6-timeseksponering uke 7

Tabell 30 viser målte H₂O₂ konsentrasjoner 1 og 6 timer etter administrering til kar. Igjen ser man at H₂O₂-konsentrasjonene holder seg stabile over hele behandlingsperioden utenom i høydosekaret med kobbernot. Under denne 6-timerseksponeringen var nedgangen i H₂O₂-konsentrasjonen på 31,9% fra 143,40 mg/L til 97,7 mg/L

Tabell 30 viser også effekter hos reker etter 6-timerseksponeringen. 1 død reke ble observert i lavdosekaret, ingen andre effekter ble observert. I karet med mellomlav dose var det 2 døde reker. Det kunne ikke observeres noen atferdsendring hos de resterende 13 rekene. I karet med mellomhøy dose var det 3 døde reker, og 8 reker med redusert aktivitetsnivå.

Høydosekaret hadde etter recovery-perioden 8 døde reker, 4 som var tydelig påvirket og 3 normale reker. I kontrollkaret med kobbernot ble ingen endringer observert. Karet med høy H₂O₂-dose og kobbernot hadde 7 døde reker. Blant de 8 gjenlevende rekene hadde 5 redusert aktivitetsnivå.

Tabell 30: Målte H₂O₂-konsentrasjoner 1 og 6 timer etter oppstart og antall døde, påvirkede og normale reker ved 6-timerseksponering uke 7

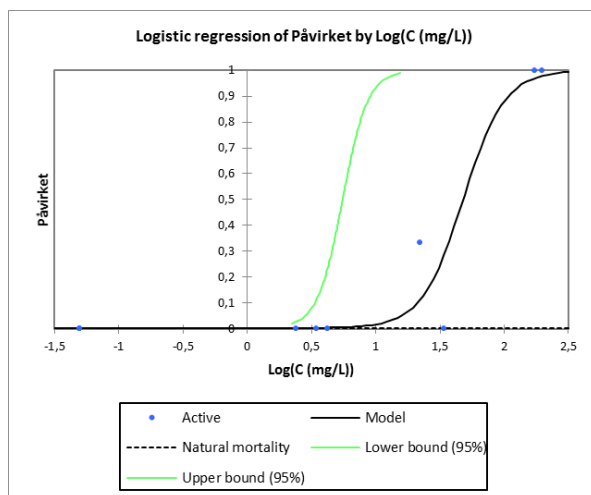
<i>Dose</i>	C H₂O₂ ved 1t (mg/L)	C H₂O₂ ved 6 t (mg/L)	Totalt antall reker	Døde	Påvirket	Normale
<i>Kontroll</i>	0,05	0,05	15	0	0	15
<i>Lavdose</i>	0,45	0,44	15	1	0	14
<i>Mellomlav dose</i>	3,04	3,55	15	2	0	13
<i>Mellomhøy dose</i>	22,75	23,25	15	3	8	4
<i>Høydose</i>	155,20	154,6	15	8	4	3
<i>Cu kontroll</i>	0,05	0,05	15	0	0	15
<i>Cu høydose</i>	143,40	97,7	15	7	5	3

3.5 Toksisitetsestimeringer

For eksponeringene ble EC- og LC-verdier beregnet med en logit-analyse. EC₅₀- og LC₅₀-verdier kunne ikke regnes ut for 1-timeseksponeringene med og uten vannutskifting.

Figur 7 viser antall påvirkede reker etter 1-timeseksponeringene i uke 6 og 7 plottet mot logaritmen til konsentrasjonen. I tabell 32 er en oversikt over de estimerte EC-verdiene for forskjellige prosentandeler av forsøksdyrene. EC₅₀-verdien for 1-timerseksponeringen ble kalkulert til å være 47,88 mg/L. 95% KI for denne verdien er svært vidt (<5,53, 483460,12>) og verdien er derfor svært usikkert.

LC₅₀-verdier kunne ikke kalkuleres for 1-timerseksponeringen.



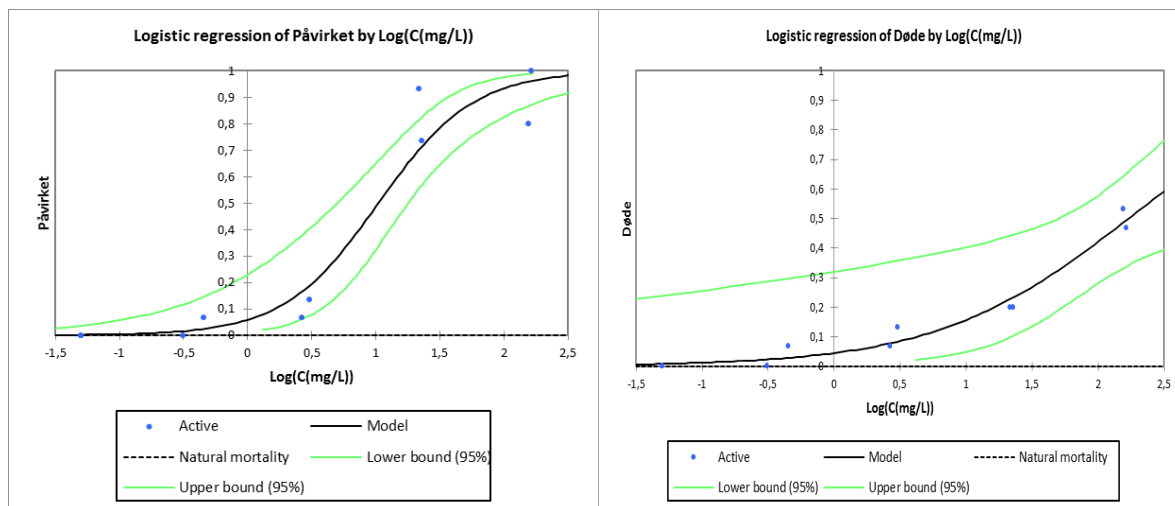
Figur 10: Andel påvirkede forsøksdyr plottet mot logaritmen til behandlingkonsentrasjonen for 1-timerseksponeringene med hydrogenperoksid i uke 6 og 7.

Tabell 32: EC-verdier for forskjellige prosentandeler av forsøksdyrene i 1-timerseksponeringen med øvre og nedre 95% konfidensintervall.

Prosentandel (%)	Effektiv konsentrasjon (mg/L)	Nedre 95% KI	Øvre 95% KI
1	7,49	1,80	3854,71
5	15,74	2,82	26780,48
10	21,02	3,35	56951,44
20	28,54	4,04	126355,54
30	34,90	4,56	213296,97
40	41,13	5,04	326984,01
50	47,80	5,52	483460,12
60	55,53	6,05	714350,78
70	65,39	6,69	1092564,84
80	79,79	7,55	1833793,64
90	107,63	9,07	3994293,96
95	141,81	10,73	8180470,31
99	260,73	15,59	39828137,00

Beregnete konfidensintervaller for EC-verdier gitt i tabell 32 indikerer stor usikkerhet i resultatene.

Vi ser av Figur 11 andel påvirkede og døde reker fra 6-timerseksponeringene i uke 6 og 7 plottet mot logaritmen til eksponeringskonsentrasjonen (tabell 26 og 27). Den sorte linjen representerer den logistiske regresjonslinjen og de grønne linjene representerer øvre og nedre 95% konfidensintervall. Punktene passer godt inn i modellen foruten to avvikende linjer i plottet for andel påvirkede reker. Det er meget lav estimert naturlig dødelighet for forsøksdyrene.



Figur 11: Venstre diagram viser andel påvirkede forsøksdyr plottet mot logaritmen til behandlingskonsentrasjonen for 6-timerseksponeringen med hydrogenperoksid. Høyre diagram viser tilsvarende plot for andel døde forsøksdyr.

Tabell 33: EC-verdier for forskjellige prosentandeler av forsøksdyrene i 6-timerseksponeringen med øvre og nedre 95% konfidensintervall.

Prosentandel (%)	Effektiv konsentrasjon (mg/L)	Nedre 95% KI	Øvre 95% KI
1	0,21	0,01	0,85
5	0,86	0,08	2,34
10	1,63	0,24	3,74
20	3,23	0,78	6,34
30	5,11	1,65	9,20
40	7,43	2,99	12,76
50	10,49	4,99	17,78
60	14,79	7,98	25,88
70	21,52	12,51	41,45
80	34,00	19,96	79,87
90	67,65	36,28	238,08
95	127,54	59,68	686,62
99	517,57	168,19	7595,85

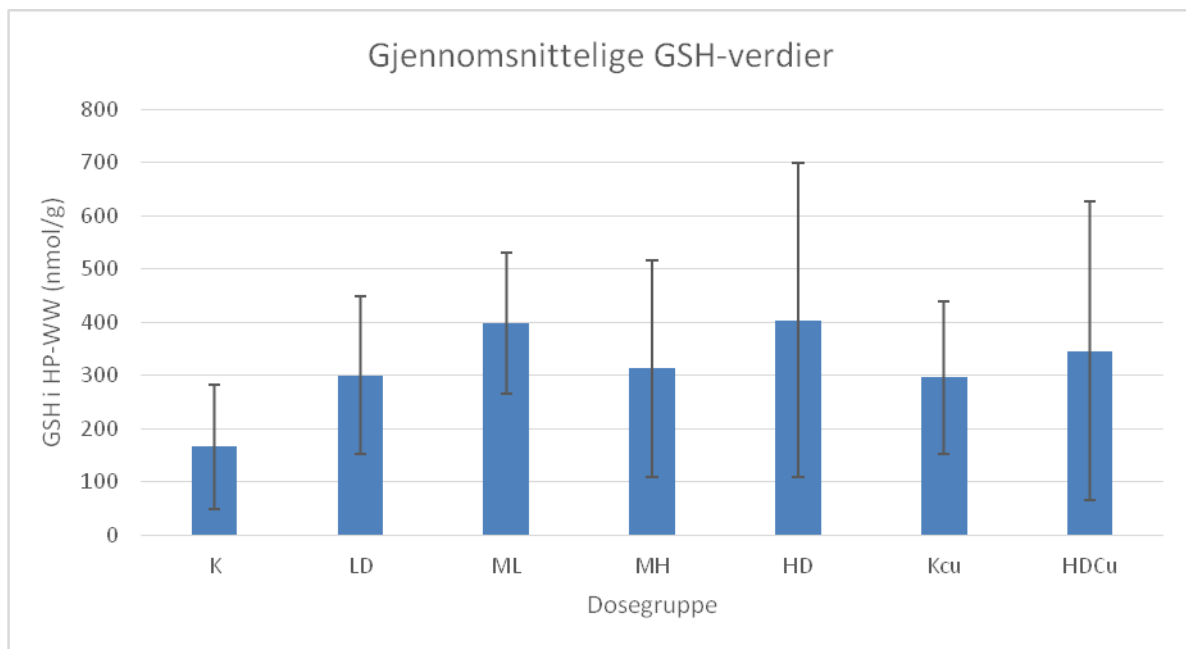
Tabell 34: LC-verdier for forskjellige prosentandeler av forsøksdyrene i 6-timerseksponeringen med øvre og nedre 95% konfidensintervall.

Prosentandel (%)	Dødelig konsentrasjon (mg/L)	Nedre 95% KI	Øvre 95% KI
1	0,08	0,00	2,1
5	1,22	0,00	10,41
10	4,26	0,00	22,19
20	16,60	0,01	54,52
30	41,00	0,50	116,87
40	86,03	9,27	337,66
50	169,84	49,99	2397,62
60	335,28	117,60	39021,07
70	703,53	217,50	1120259,94
80	1737,53	402,98	76896244,06
90	6771,46	932,40	48721413167,69
95	23714,65	1950,37	19256229790601,10
99	378017,92	9552,33	10948862257973700000,00

Tabell 33 og 34 gir estimerte EC- og LC-verdier fra regresjonsplottene i figur 4. Tabellene viser at EC₅₀-verdien for 6-timerseksponeringen er 10,49 mg/L med et 95% konfidensintervall på [4,990, 17,777]. LC₅₀-verdi er i tabell 32 gitt til 169,839 mg/L med et konfidensintervall på [49,988, 2397,634]. EC₅-verdien (0,862 mg/L) er også vesentlig da denne representerer konsentrasjonen for marginal subletal effekt ved 6-timerseksponeringen.

3.6 GSH

Figur 5 viser gjennomsnittlige GSH-verdier for de ulike eksponeringsgruppene. Dunnet-test ble utført for å vise om behandlingsgruppene var signifikant forskjellige fra kontroll, hvilket ingen av dem var. Tukey-test viste at ingen av gruppene var signifikant forskjellige fra hverandre.



Figur 12: De blå søylene viser gjennomsnittlige GSH-verdiene i hepatopancreas for de ulike dosene. Diagrammet viser også standardavviket for gjennomsnittet.

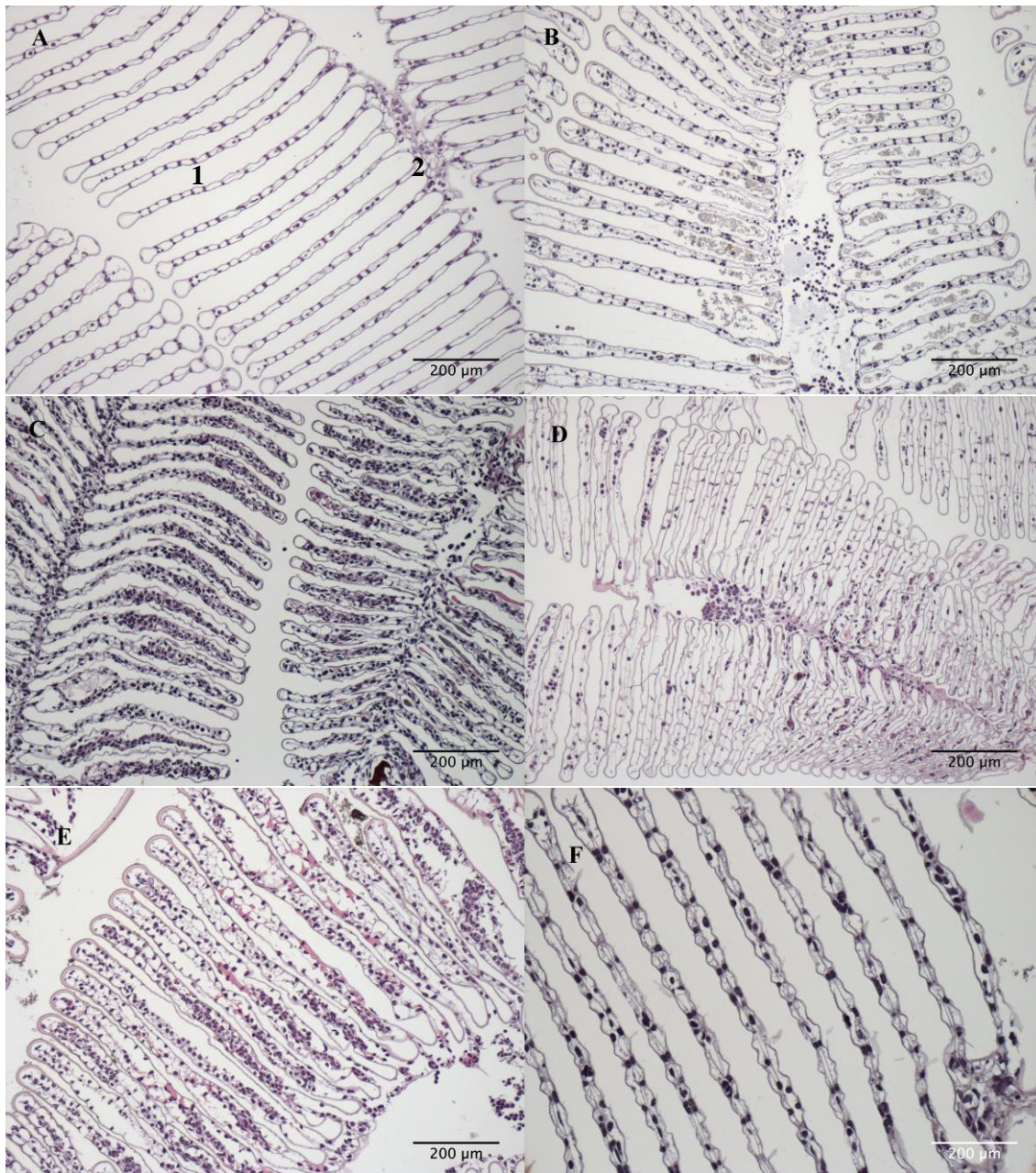
Ettersom det så ut til å være liten sammenheng mellom doseringer og glutationmengder i hepatopancreas hos forsøksdyrene ble det undersøkt om andre kjente parametere kunne ha påvirket resultatene. Vekt og lengde for hver enkelt reke ble koblet opp mot GSH-verdier og analysert innad i doseringsgruppe; ingen tydelige sammenhenger ble vist.

Vedlegg 3 viser GSH-verdier for hepatopancreas i rekene som tidligere ble eksponert for hydrogenperoksid. Alle verdier merket med rødt ble ikke tatt med i videre i utregningene da de ikke ble funnet å være statistiske utliggere. Kun reker som ikke hadde dødd ved opptak fra kar kunne brukes i analysen. For noen av rekene var det også vanskelig å isolere hepatopancreas grunnet størrelse eller skader på forsøksdyret, antallet prøver per dose varierer derfor.

Basert på resultatene er det ingen statistisk signifikant forskjell mellom glutationmengde i hepatopancreas og eksponeringsforhold i toksisitetstestsforsøket.

3.7 Histologi

På grunn av for få tilgjengelige prøver til histologi kunne ingen kvantifisering av resultater utføres. Figur 13 og 14 viser 100x fortykning av gjellehistologi for én utvalgt reke per eksponeringsgruppe. Bildene valgt er representative for de øvrige prøvene fra samme eksponeringsgruppe.

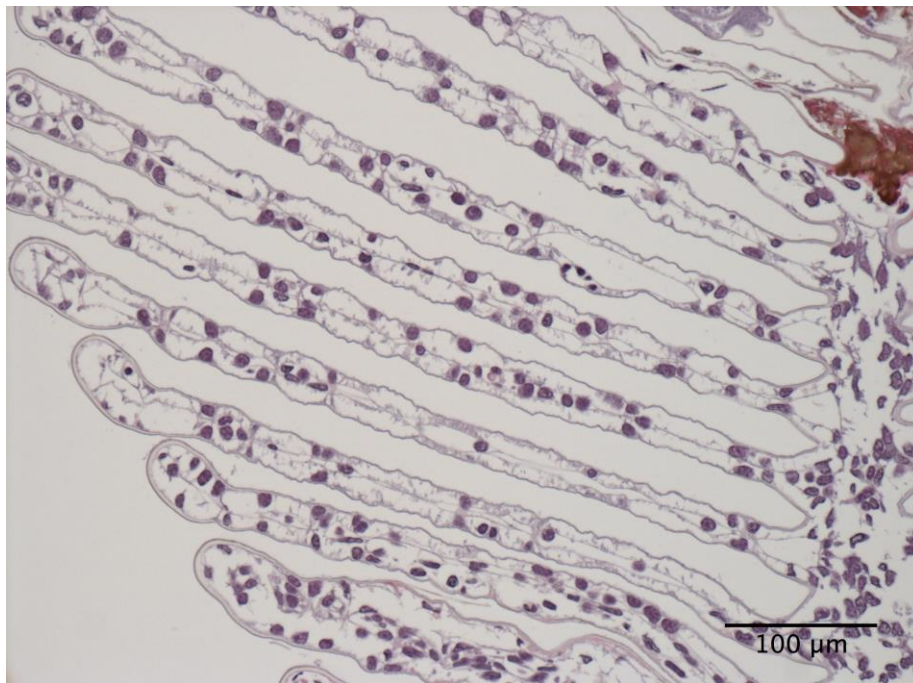


Figur 13: Bilder E-G viser 100x forstørring av gjellehistologi for forsøksdyr etter 6 timers eksponering i uke 6 og 7.

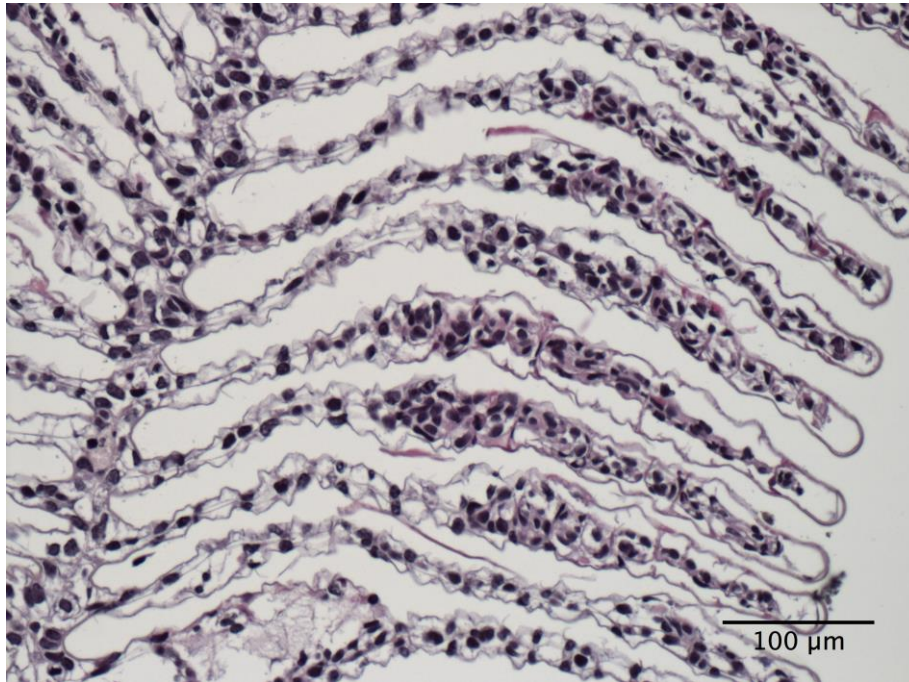
A: Kontroll, B: Lavdose, C: Mellomlav dose, D: Mellomlav dose, E: Mellomhøy dose, F: høydose, G: Kobber kontroll.

1: primærlamelle, 2: sekundærlamelle,

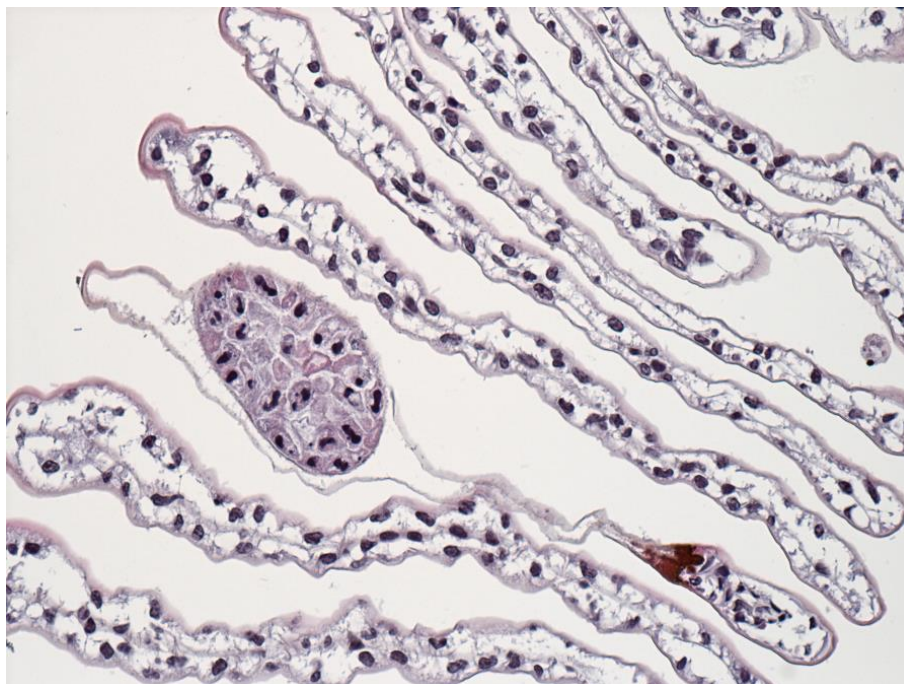
Figur 13 viser en oversikt over gjellehistologi fra de ulike eksponeringsgruppene fra 6-timerseksponeringene i uke 6 og 7. Kun reker som var levende fra opptak av kar kunne brukes til histologi på grunn av rask degenerering av vev etter død. Det er ingen histologiprøver fra rekene som var i høydosekaret med kobbernot på grunn av høy dødelighet. Bildene viser tydelige effekter i forhold til dose. Ved mellomlav, mellomhøy, og høydose (figur 13: c-e) vises en tydelig fortykning av sekundærlamellene. Fortykningen ser ut til å skyldes både økt størrelse på celler (hypertrofi) og økt mengde celler (hyperplasi). Effektene kan ses i Figur 14 og 15. Celletilstrømningen skyldes trolig en immunrespons. Histologiprøvene for kobber kontroll viste ingen tegn til morfologiske endringer.



Figur 14: 200x forstørring av gjellehistologi fra reke eksponert for mellomhøy dose i 6 timer. Viser tydelig tegn på hypertrofi.



Figur 15: 200x forstørring av gjellehistologi for reke eksponert for mellomlav dose i 6 timer. Viser tydelig tegn på hypeplasi.



Figur 16: Gjellevev hos kontrollreke infisert med parasitt. Tydelig skade på gjellevev.

Flere av reken hadde tegn på parasittære infeksjoner i gjellevevet; dette vist tydelig på histologiprøvene. En av kontrollreke med en slik infeksjon hadde også tydelig skadet gjellevev (Figur 16)

4. Diskusjon

4.1 Analysemetoder for måling av hydrogenperoksidkonsentrasjoner

Ved første feltforsøk ble det brukt Quantofix teststrimler for å måle hydrogenperoksidkonsentrasjoner. Dette var den første analysemetoden brukt i forbindelse med prosjektet. Årsaken til at metoden ble valgt var at den egnet seg svært godt til bruk i felt. Fordi det fantes lite litteratur om samme type forsøk var det også vanskelig å vite hvilke konsentrasjoner en kom til å finne. Svakheter ved analysemetoden er i hovedsak nøyaktighet. Det oppleves som vanskelig å vurdere hvorvidt fargeutslaget på teststrimlen er nøyaktig lik, lyser eller mørkere enn fargene på den medfølgende fargeskalaen. Et annet problem som oppsto i felt var at hydrogenperoksidkonsentrasjonene var så lave at de ikke lot seg registrere av strimlene som hadde range fra 0,5-25 mg/L.

Etter bruk av Quantofix teststrimler ble det vurdert som nødvendig med en metode med høyere nøyaktighet som også var svært mobil. Chemetrics-sett ble vurdert som svært praktiske og enkle i bruk.

Sett 5513 har range fra 0-3mg/L og egner seg derfor godt til måling av lave konsentrasjoner av hydrogenperoksid. Dette medfører også at det måtte utføres en del fortyngninger når hydrogenperoksidkonsentrasjonene var kjent å være over 3 mg/L. Settet ble brukt ved alle toksisitetsforsøk og i disse forsøkene var de fleste konsentrasjonene som skulle måles på over 3 mg/L. Fortyngninger av vannprøvene medfører redusert nøyaktighet av prøven. Sett K-5543 har bredere deteksjonsområde enn sett K-5513. Prøver med konsentrasjoner mellom 0 og 6 mg/L kan analyseres spektrofotometrisk med dette settet. Kun i feltforsøket i april ble dette settet brukt til og da kun til prøver med en antatt konsentrasjon mellom 0 og 5 mg/L. Ingen fortyngninger ble dermed utført ved bruk av dette settet.

Ved bruk av sett K-5513 må to reagenser tilsettes vannprøven, deretter må prøven stå i 6 minutter før ampullen kan knekkes av i prøven. Ampullen skal så stå ca. 1 min før den avleses av spektrofotometeret, som igjen tar 1 minutt. Sammenlagt tar fortyngning, videre klargjøring og analysing av prøven ca. 10 minutt. I en situasjon hvor det er behov for å analysere mange prøver på relativt kort tid blir tidsperspektivet problematisk. Sett K-5543 behøver ingen klargjøring av prøven før ampullen kan knekkes av i den. Til sammen tar analysing av en prøve med sett K-5543 1-2 minutter hvilket forenkler analysing av store mengder prøver.

Tabell 2: Range og nøyaktighet for sett K-5513 for gitte instrumenter og konsentrasjonsområder. I denne studien ble V-2000- brukt i analyser med sett K-5513. Tabell er hentet fra Chemetrics.com (Chemetrics a).

Instrument Platform	Test Range, ppm	Accuracy (expressed as ppm at concentrations across the test range)			
		0 ppm	0.15 ppm	0.75 ppm	2.25 ppm
Spectrophotometer	0 - 3.00	≤ 0.04	+/- 0.05	+/- 0.15	+/- 0.23
V-2000	0 - 3.00	≤ 0.04	+/- 0.05	+/- 0.15	+/- 0.23
V-3000 Series	0 - 3.00	≤ 0.04	+/- 0.05	+/- 0.15	+/- 0.23

Tabell 3 Range og nøyaktighet for sett K-5543 for gitte instrumenter og konsentrasjonsområder. I denne studien ble V-2000- og I-2016 SAM-spektrofotometer bruk til analyser med sett K-5543. Tabell er hentet fra Chemetrics.com (Chemetrics d, 2013)

Instrument Platform	Test Range, ppm	Accuracy (expressed as ppm at concentrations across the test range)			
		0 ppm	0.50 ppm	1.50 ppm	4.50 ppm
Spectrophotometer	0 - 6.00	≤ 0.10	+/- 0.08	+/- 0.30	+/- 0.45
V-2000	0 - 6.00	≤ 0.10	+/- 0.08	+/- 0.30	+/- 0.45
V-3000 Series	0 - 6.00	≤ 0.10	+/- 0.08	+/- 0.30	+/- 0.45
I-2016 SAM	0 - 6.00	≤ 0.10	+/- 0.08	+/- 0.30	+/- 0.45

Tabell 1 og 2 viser deteksjonsområder og feilgrenser for de kjemiske settene brukt i denne studien. Ved bruk av instrument V-2000 har begge sett feilgrenser på $\pm 10\%$ over 75% av totalt deteksjonsområde, $\pm 20\%$ over 25 % av fullt deteksjonsområde og $\pm 30\%$ ved deteksjonsgrensen. Fra tabell 1 og 2 er deteksjonsgrensen satt til 0,15 mg/L, dersom en tar hensyn til de oppgitte feilmarginene. Denne verdien har ikke latt seg bekrefte av annen litteratur fra Chemetrics. Dersom det stemmer at konsentrasjoner 0,15 mg/L er nedre deteksjonsgrense for settet vil det innebære unøyaktighet ved de laveste målte konsentrasjonene i forsøk.

En rekke mulige interferenser er oppgitt for sett K-5513 og sett K-5543 (Chemetrics a; Chemetrics d, 2013). Tilstedeværelse av kobber kan gi positivt utslag for prøvene. Kobberimpregnerte nøter ble brukt under toksisitetforsøk, lignende nøter blir også brukt i merdanleggene feltforsøkene ble utført rundt. Kobber kan altså ha gitt en mulig interferens gjennom denne studien. Det er vanskelig å si hvor stort utslag interferensen eventuelt kan ha gitt. Ut fra målte konsentrasjoner underveis i studien er det lite som tyder på en positiv interferens fra kobber. Dette vises eksempelvis godt på vannprøvene tatt fra kontrollkar og kobber-kontroll under toksisitetforsøk som stort sett viste de samme konsentrasjonene av H₂O₂ (tabell 25).

Permanganattitreringen vil ikke bli diskutert i vesentlig grad da resultater fra denne metoden brukt i oppgaven kommer av analyser utført av ansatte i Akzo Nobel. Permanganattitrering er en vanlig metode brukt til analyser av hydrogenperoksid. Årsaken til at metoden ikke ble tatt i bruk mer i denne studien skyldes delvis praktiske årsaker. Titrering krever mer utstyr enn de spektrofotometriske metodene nevnt. I tillegg er ikke kaliumpermanganattitreringen nøyaktig ved lave konsentrasjoner (Brandhuber & Korshin, 2009).

4.2 Feltforsøk

I denne oppgaven har et sentralt poeng vært å bestemme hydrogenperoksidkonsentrasjoner i sjøvann etter badebehandlinger i merd. Hydrogenperoksid har lenge vært sett på som det mest miljøvennlige avlusningsmiddelet fordi det ved nedbrytning gir vann og oksygen. På en annen side har det vært en klager fra rekefiskere som hevder at bruk av hydrogenperoksid i merd har ført til stor dødelighet hos reker. Lite forskning har derimot blitt gjort på nivåer av hydrogenperoksid i sjøvann etter badebehandlinger i merd.

Forskning gjort på bakgrunnsnivåer av hydrogenperoksid i sjøvann har vist at konsentrasjonene varierer gjennom døgnet. I tillegg ser man normalt lavere konsentrasjoner lengre ned i vannsøylen (Wu, Wong, Wu, Shiah, & Dai, 2015). En studie utført i Sargassohavet i Nord-Atlanteren fant bakgrunnsnivåer av hydrogenperoksid på opp til 0,005mg/L. Denne studien viste også at det var gjennomsnittlige konsentrasjoner endres i forhold til årstid (Miller & Kester, 1994).

Kontrollprøver fra første feltforsøk ble ikke tatt da analysemetoden ikke er var sensitiv nok til å fange opp svært lave hydrogenperoksidkonsentrasjoner. Kontrollprøvene tatt før slipp av presenning i feltforsøkene i april varierer noe (tabell 13-24), Sannsynligvis skyldes høye hydrogenperoksidkonsentrasjoner i kontrollprøvene lekkasjer fra presenningen. På grunn av variasjonen i kontrollprøvene er det vanskelig å si noe om naturlige nivåer av hydrogenperoksid i området. Det virker derimot trolig at lekkasjer fra presenningen brukt under merdbehandlingene kan ha ført til høye konsentrasjoner i kontrollprøvene. Kontrollprøver burde ha blitt tatt lengre borte fra anlegget.

4.2.1 Feltforsøk oktober

I feltforsøk utført i oktober så en lave hydrogenperoksidkonsentrasjoner etter slipp av presenning brukt under badebehandling i merd. Ved første behandling ble det ikke observert konsentrasjoner over 10 mg/L etter første behandling og ingen konsentrasjoner over 25 mg/L etter andre behandling. Konsentrasjonsmålingene var i hovedsak under deteksjonsgrensen til målemetoden hvilket tyder på en rask spredning eller nedbrytning av hydrogenperoksid etter utslipp fra merd. Etter første behandling ser det ut til å være liten sammenheng mellom tid, dybde og målte konsentrasjoner (tabell 7-9). I andre behandling ser en derimot at de høyeste konsentrasjonene konsekvent er å finne øverst i vannsøylen, altså ved 10 og 20 meters dybde (tabell 10 og 11). Ettersom båt C hadde problemer med pumpesystemet ved andre avlusning, kan man ikke si om samme trend vises her.

Etter første feltforsøk ble analysemetoden revurdert. Quantofix teststrimler egner seg ikke til analyser av vannprøver hvor høy nøyaktighet er viktig. Årsaken til at teststrimlene ble brukt i første forsøk var fordi de er svært praktiske til feltbruk. Det var noe usikkerhet rundt hvor lenge vannprøvene kunne stå før hydrogenperoksidkonsentrasjonene ble redusert i vesentlig grad og det var derfor ønskelig å analysere prøvene umiddelbart. Teststrimlene er også enkle og raske i bruk hvilket er en vesentlig fordel når store antall prøver skal analyseres.

Ved første avlusning i oktober ble båtene plassert spredt rundt merden (Figur 1). Ved å plassere båtene spredt kunne en se om det var en retningsbestemt spredning fra anlegget. Ved andre avlusning ble alle båtene plassert nord for merden. Strømmålingene rundt anlegget varierte, men de kunne tyde på at det var en i hovedsak nordgående strøm. I tillegg hadde en fått estimater av strømrretning fra oseanografer ved Havforskningsinstituttet før forsøk som også indikerte en nordgående strøm.

Båtene burde spesielt ved første avlusning ha ligget nærmere merdanlegget. En del hensyn må derimot tas til arbeidere og båter brukt i og rundt oppdrettsanlegget. Fiske må også drives minst 100 m fra oppdrettsanlegg (Fiskeridirektoratet, 2015), det er derfor ikke urimelig å ta vannprøver 60 m fra anlegget. Det kan imidlertid være mulig at vannprøver ble samlet over en for kort tidsperiode til at spredningen rakk å nå båtene. De jevnt over høyere konsentrasjonene etter andre avlusning tyder på bedre plasseringer i forhold til spredningen av hydrogenperoksid, men fordi kontrollprøver ikke ble tatt kan en ikke utelukke akkumulering av hydrogenperoksid fra første avlusning.

Det kanskje mest vesentlige aspektet er derimot volumet hydrogenperoksid har å spre seg i. Presenningen laksen blir behandlet i er liten i forhold til fjordvolumet, og dersom hydrogenperoksid spres i fjorden vil man få en voldsom fortykning av behandlingskonsentrasjon. Merdene behandlet ved feltforsøk i oktober 2016 var sirkelformede og hadde en diameter på 60 m. Notene var også ca. 60 m dyp. Presenningen brukt under avlusningen var ca. 10 m dyp. Behandlingsvolumet var på ca. 10 000 m³. Fjorden var ca. 190 m dyp i området.

Dersom en begrenser fordelingsvolumet til hydrogenperoksid etter slipp av presenning til nærmeste båt ved første avlusning, som lå 40 m fra anlegget, gir det en radius på 70 m fra midten av merden. Ettersom en så de høyeste hydrogenperoksidkonsentrasjonene øverst i vannsøylen kan en avgrense dybden til 30 m. Det nye fordelingsvolumet blir da 461 580 m³. Ved en jevn spredning av hydrogenperoksid fra merdbehandlingen ville det ha gitt konsentrasjoner på ca. 30 mg/L i estimert volum. Estimert nytt volum er lavere enn det faktiske i tillegg antas det en homogen fordeling av hydrogenperoksid som er usannsynlig i praksis. Ettersom man tar punktmålinger kan det være at man mister en puls med høye konsentrasjoner som beveger seg ut fra merden.

4.2.2 Feltforsøk April

På grunnlag av resultater fra feltforsøk i oktober ble studiedesignet forbedret til feltforsøkene i april. Anlegget det ble tatt feltforsøk rundt i april bestod av 6 rektangulære merder hvor hver enkelt merd var ca. 25m bred og 50 m lang. Tre avlusninger ble gjennomført, med behandlingskonsentrasjoner på 2,3, 1,7 og 1,8 g/L. Ønsket behandlingskonsentrasjon var 2 g/L, hvilket er en høy konsentrasjon, men ble vurdert som rimelig på grunn av sjøtemperatur på 6-7 °C. Det ble ikke sluppet fordose i merden for å avgjøre behandlingsvolum før den endelige administreringen fant sted. I stedet ble behandlingsdose administrert umiddelbart basert på et antatt volum hvilket ga en konsentrasjon på 2,3 g/L ved første behandling. Antatt behandlingsvolum ble endret til andre og 3 behandling hvilket ga lavere hydrogenperoksidkonsentrasjoner.

Etter første behandling så en konsentrasjoner over 700 mg/L ved 5 og 10 m etter henholdsvis 6 og 15 min (tabell 14 og 15). Ved feltforsøk i oktober ble ingen konsentrasjoner på over 25 mg/L observert (tabell 10), også denne konsentrasjonen ved 10 meters dybde.

De høyeste konsentrasjonene ble generelt observert fra 5-20 meters dyp ved båt B og C som begge lå ved sørenden av merden, henholdsvis 0 og 5 meter fra merdkanten. I forhold til observert strømmretning gir det mening at de høyeste konsentrasjonene ble observert ved disse posisjonene. Igjen ser man som ved forsøkene i oktober hovedsakelig lave konsentrasjoner som ikke kan skilles fra bakgrunnsnivåer. Etter de observerte konsentrasjonene på over 700 mg/L ser man en gradvis, men rask nedgang i konsentrasjon ved samme pumpestasjoner og dybder ved senere tidspunkt.

Etter andre behandling ser en noe høyere konsentrasjoner ved posisjon A og B (tabell 17 og 18), som begge lå like ved merdkanten. Ved posisjon A ble det kun tatt vannprøver ved dybder fra 30 til 60 m. Kun ved denne avlusningen ble det funnet høye konsentrasjoner så dypt. Prøven på over 700 mg/L ved posisjon A ble tatt ved 60 m dyp etter 8 minutter (tabell 11) hvilket indikerer at hydrogenperoksid bruker tid på å bevege seg vertikalt i vannsøylen. Ettersom første og andre behandling ble gjennomført samme dag kan det ha vært en akkumulering av hydrogenperoksid fra de to behandlingene som førte til at man fikk en høyere gjennomsnittskonsentrasjon etter andre behandling (41,04 mg/L) enn etter første (19,65 mg/L).

Tredje avlusning ble gjennomført påfølgende dag og konsentrasjonsmålinger fra denne behandlingen viser lavere konsentrasjoner enn etter de to foregående behandlingene. Høyeste konsentrasjon observert etter tredje avlusning var på 69,21 mg/L ved posisjon B etter 25 minutter (tabell 16), hvilket er 10 ganger lavere enn høyeste observasjoner observert etter første og andre behandling. Gjennomsnittskonsentrasjonen på 1,61 mg/L etter disse behandlingene var også lavere enn for de to foregående behandlingene (henholdsvis 19,65mg/L og 41,04 mg/L).

Det ble undersøkt hvorvidt det var muligheter for å modellere spredningen av hydrogenperoksid i sjøvann, men dette lot seg ikke gjøre. Spredningen til partikler i sjøvann er svært komplekse prosesser som påvirkes av forhold som partikkelegenskaper, strøm- og værforhold, dybde og så videre. Undersøkelser gjort på spredningen av fargestoff i sjø viser en hurtigere spredning horisontalt enn vertikalt (Inall, Aleynik, & Neil, 2013; Stashchuk, Vlasenko, Inall, & Aleynik, 2014). Også resultatene fra feltforsøkene utført i forbindelse med dette prosjektet indikerer en raskere horisontal spredning. En del av hensikten med prosjektet er å finne ut om de konsentrasjoner av hydrogenperoksid man observerer etter merdbehandlinger er høye nok til å skade «non-target»-organismer. Det kunne derfor ha vært en fordel å ta vannprøver over en lengre tidsperiode ettersom man da ville fått et bedre inntrykk kronisk eksponering. Ettersom hydrogenperoksid beveger seg raskere horisontalt enn vertikalt ville en ved analyser over lengre tid fått mer informasjon om bunnforhold hvilket er spesielt relevant i forhold til reker.

Spredningen av hydrogenperoksid ser altså etter alle feltforsøk ut til å skje relativt raskt. I visse tilfeller ble det observert høye konsentrasjoner som kan tenkes å være skadelig for «non-target»-organismer, men disse observasjonene ble alltid fulgt av en rask fortytning. På grunn av en raskere spredning horisontalt enn vertikalt er det også vanskelig å si om noen organismer kommer til å bli utsatt for forhøyede hydrogenperoksidkonsentrasjoner over lang nok tid etter en merdbehandling til at de er skadelige. Langtidseksponeringen «non-target»-organismer blir utsatt for burde derimot undersøkes. Oppdrettsanlegg består som regel av flere merder. Ved tilfeller av AGD og lakselus i oppdrettsanlegg behandles ofte alle merdene i anlegget, hvilket kan gi opptil flere eksponeringer daglig over flere dager.

PNEC («predicted no-effect concentration») er den estimerte høyeste konsentrasjonen av en forbindelse som er forventet å ikke gi uheldige konsekvenser uavhengig av miljø (Institute for Health and Consumer Protection, 2009). Dersom en sammenligner resultatene fra feltforsøk med den estimerte PNEC-verdien til hydrogenperoksid i vann på 0,01mg/L ser de målte konsentrasjonene urovekkende ut (Institute for Health and Consumer Protection, 2003). Samtlige av de observerte konsentrasjonene er over PNEC-verdien, også kontrollprøvene tatt ved T=-5 min ved feltforsøkene i april. Resultatene fra feltforsøk i oktober lar seg ikke sammenligne på grunn av begrensningene til målemetoden. Studier har derimot målt bakgrunnskonsentrasjoner i sjøvann som er tilnærmet lik PNEC-verdien eller høyere (Miller & Kester, 1994). Det er dermed ikke urimelig å stille spørsmål om PNEC-konsentrasjonen bør reevalueres.

4.3 Nedbrytningsforsøk

Nedbrytningsforsøk utført viser at hydrogenperoksid har lang halveringstid. Temperatur har en tydelig effekt på halveringstiden til forbindelsen (tabell 31). Lengste halveringstid ble funnet å være over 28 døgn (677 timer) ved 8,7 °C og startkonsentrasjon på 21,55 mg/L. Korteste halveringstid var på ca. 3,5 døgn (83 timer). Det er stor spredning i halveringstidene funnet og flere studier bør utføres. Nedbrytningsforsøkene her ble utført med sandfiltrert sjøvann. Sjøvann rundt merdanlegg har trolig høyere konsentrasjon av organisk materiale, og det kunne ha derfor vært interessant å undersøke halveringstid med sjøvann fra et oppdrettsanlegg. Hydrogenperoksid er svært reaktivt og vil brytes ned raskere ved høy tilstedeværelse av organisk materiale.

4.4 Toksisitetsforsøk

4.4.1 Forsøksdesign

Få studier har foreløpig blitt gjort på giftigheten til hydrogenperoksid for «non-target»-organismer i sjø. Et relevant studie undersøkte LC₅₀-verdier for *Homarus Americanus*, *Crangon Septemspinosa* og mysider (Burrige et al., 2014). Av disse artene er nok resultatene for *Crangon Septemspinosa* de mest aktuelle for denne oppgaven ettersom det har vært ønsket om å undersøke effekter hos reker. LC₅₀-verdien for arten ble funnet å være 3182 mg/L ved 1 times eksponering (Burrige, Lyons, Wong, MacKeigan, & VanGeest, 2014).

Når man studerer akutt toksisitet er det vanlig å studere effekter ved korttidseksponering ved 24, 48 eller 96 timer. I forbindelse med denne oppgaven ble det vurdert som uhensiktsmessig med svært lange eksponeringsperioder da resultater vil ha lav økologisk validitet.

Vurderingen ble gjort basert på resultatene fra første feltforsøk hvor en fant en tilsynelatende rask fortykning av hydrogenperoksid som tilsier en lav sannsynlighet for at reker rundt merdanlegg vil bli eksponert lengre enn ca. én time per merdbehandling. For å gjenskape noe som kunne minne om en naturlig fortykning ble det bestemt at vannutskiftingen i karet skulle slås på etter 1 time.

Bruken av vannutskiftingen viste seg å gi variasjoner i eksponeringstider i de forskjellige karene; dette kan ses ut fra konsentrasjonsmålingene fra forsøket i tabell 25. Dersom det hadde latt seg gjøre å stille vannutskiftingen nøyaktig lik ville det ha gitt repliserbare resultater. Ujevnheten mellom vannutskiftingens hastighet i de forskjellige karene var derimot større enn først forventet hvilket resulterte i ukjente eksponeringstider. I eksperimentene utført i uke 6 og 7 ble rekene flyttet raskt over i recovery-kar med rennende sjøvann etter eksponeringen. To replikater av en 1-timeseksponering og en 6-timeseksponering viste lignende resultater.

Det ble ønsket å oppnå konsentrasjoner med en fortynningsfaktor på 10 i forhold til normal behandlingsdose (1,5g/L) i forsøk gjennomført i uke 49. I uke 6 og 7 ble en fortynningsfaktor på 7 i forhold til behandlingsdose brukt. Basert på konsentrasjonsanalysene (tabell 25,7 og 28) viste det seg derimot at de oppnådde konsentrasjonene ikke var nøyaktige like de ønskede. Karet rekene ble eksponerte i har et relativt omfattende rørsystem som frakter vann inn og ut. Volumet på dette rørsystemet varierer fra kar til kar samtidig som det gjør vannvolumet i hvert enkelt kar tidvis ustabil. Ettersom alle vannkonsentrasjoner er godt dokumentert anses ikke problematikken med tilpasninger av konsentrasjonene som et problem.

Forsøksdyrene brukt til toksisitetforsøket i uke 49 hadde tidligere blitt brukt som kontrollgruppe i et annet eksponeringsforsøk. Rekene hadde gått i kar i flere måneder siden nevnte eksponeringsforsøk og viste ingen observerbare tegn på effekt fra forsøket. En eventuell konfunderende effekt fra tidligere behandling ble vurdert som liten. Til forsøk utført i februar ble det fisket nye reker. Disse rekene ble fraktet fra Havforskningsinstituttet til forskningsstasjonen i Matre i januar. En del reker døde under frakt, og i starten av akklimatisering i Matre. Rekene ble akklimatisert i minst 2 uker før de ble brukt i forsøk. Det måtte tas hensyn til den begrensede mengden forsøksdyr i designet av toksisitetforsøkene.

4.4.2 Resultater

Resultatene fra forsøk gjennomført i uke 49 ga svært uventede resultater. Tabell 26 viser oversikten over dødelighet og påvirkning etter forsøket. I karene med høydose H₂O₂ og karene med kobbernøter var det høy grad av dødelighet og påvirkning (tabell 26). Resultatene stemmer dårlig overens med andre toksisitetsstudier på rekearter. BurrIDGE et al estimerte en LC₅₀-verdi på 3182 mg/L for *Crangon septemspinosa* etter 1 times eksponering for H₂O₂ (BurrIDGE et al., 2014). I en studie gjennomført ved Havforskningsinstituttet på *Praunus flexuosus* og *Palaemon elegans* kunne det ikke kalkuleres en LC₅₀-verdi for 1 timeseksponering med hydrogenperoksid (Brokke, 2015). På grunn av for få observasjoner kunne ingen LC- eller EC-verdier kalkuleres for denne eksponeringer. Resultatene peker derimot mot en langt lavere LC₅₀-verdi. Samtidig indikerer resultatene en svært toksisk effekt av kobbernøtene i seg selv.

To åpenbare faktorer antas å være årsaken til den uventede høye dødeligheten. Først og fremst ble den reelle eksponeringstiden lengre enn planlagt; forsøket bør derfor ikke anses som en 1-timeseksponering. For det andre fikk rekene gå fritt i karene under dette forsøket. En beslutning tatt for å redusere stress for rekene. Det at rekene fikk gå fritt medførte også at de hadde direkte kontakt med kobbernøtene under hele eksponeringen, og denne direkte kontakten ser ut til å medføre høy toksisitet. Det er ikke urimelig å tenke at reker også kan komme i direkte kontakt med nøter i sjø, men i all hovedsak oppholder de seg på bunnsediment langt dypere enn merdanlegget strekker. Det er også verdt å nevne at hydrogenperoksidkonsentrasjonen i høydosekaret med kobbernot ble svært høy (265,70 mg/L) hvilket i seg selv kunne ha ført til den høye dødeligheten i dette karet.

For 1-timeseksponeringene gjennomført i uke 6 og 7 lot det seg heller ikke gjøre å beregne en LC₅₀-verdi. Dette stemmer overens med de tidligere nevnte studier (Brokke, 2015; BurrIDGE et al., 2014). Effekten av kobbernot i karene så også ut til å ha minimal effekt på reken når rekene ble plassert i bur, hvilket støtter opp under teorien om at det var den direkte kontakten med nøtene som førte til høy dødelighet i uke 49.

For 6-timeseksponeringene ble LC₅₀-verdi kalkulert til å være 169,84 mg/L (tabell 34). Det har ikke lyktes å finne studier å sammenligne resultatene fra 6-timerseksponeringen med. Det ble vurdert som nyttig å utføre en eksponering som var lengre enn 1 time. Dersom man gjennomfører behandlinger i flere merder samme dag kan «non-target»-organismer i verste fall utsettes for forhøyede hydrogenperoksidkonsentrasjoner over flere timer. Konfidensintervallet er noe bredere enn ønskelig (tabell 34). Ideelt sett skulle det i dette forsøket, som i de øvrige eksponeringene, ha vært flere eksponerte reker.

EC₅₀-verdier ble kalkulert på grunnlag av antall døde reker og reker med nedsatt aktivitetsnivå. Ingen sammenlignbare studier har blitt funnet til å sammenligne EC₅₀-verdiene med. For forsøket gjennomført i uke 49 kunne ikke EC₅₀-verdier kalkuleres. For 1-timeseksponeringene i uke 6 og 7 ble EC₅₀-verdien funnet å være på 47,80 mg/L (tabell 32), øvre grense for 95% konfidensintervall for denne verdien er derimot så høy at nøyaktigheten til resultatet bør vurderes som svak. For 6-timeseksponeringene ble EC₅₀-verdiene estimert til å være 10,48 mg/L (tabell 33) og konfidensintervallet for denne verdien er langt smalere enn for 1-timeseksponeringene. En vesentlig svakhet ved EC₅₀-verdiene er resultatene de er basert på. Alle aktivitetsendringer dokumentert hos rekene baserte seg på subjektive observasjoner. Atferdsendringene ble vurdert nøye, men akkurat hvor grensen for påvirket og ikke påvirket gikk kunne være vanskelig å vurdere. Igjen hadde det vært ønskelig med flere replikater, og en mer standardisert måte å tallfeste påvirkning på for sikrere data.

Dersom en sammenligner resultater fra toksisitetstests med de fra feltforsøk kan det tenkes at det er liten fare for akutt toksisitet hos rekearten *Pandalus montagui* rundt oppdrettsanlegg. Rekene oppholder seg i hovedsak på bunnsediment og få lave konsentrasjoner ble målt lengst ned i vannsøylen. Ved feltforsøk gjennomført i april ble det derimot målt en hydrogenperoksidkonsentrasjon på over 700 mg/L ved 60 meters dyp i et område hvor fjorden var ca. 80 m dyp. Det kan ikke utelukkes at en hydrogenperoksidkonsentrasjon på over 700 mg/L kan være skadelig for reker.

I praksis er det også vesentlig å stille spørsmål ved hvorvidt LC- eller EC-verdiene er av størst relevans. Det er viktig å vite hvilke konsentrasjoner av hydrogenperoksid som dreper reken, men i naturlig habitat kan det også tenkes at en påvirket eller svært påvirket reke nærmest kan likestilles en død reke. Dersom reken viser redusert mobilitet og reaksjonsevne vil den være et enklere byttedyr, samt at den vil ha redusert evne til å skaffe mat.

4.5 Effektmål

For å få en indikasjon på subletale effekter hos rekene ble det gjennomført et GSH-assay, i tillegg ble gjellelev undersøkt mikroskopisk. Kun reker som var levende ved opptak fra recovery-kar etter 6-timereksponeringen ble brukt.

4.5.1 GSH

Hydrogenperoksid kan føre til oksidativt stress hos en organisme (Coyle et al., 2006). Det ble derfor forsøkt undersøkt hvorvidt vevsprøver fra rekene eksponert for hydrogenperoksid i toksisitetsforsøket viste tegn på oksidativt stress.

Et assay ble kjørt for å kvantifisere glutation-konsentrasjoner i rekenes hepatopaneas. Resultatene fra assayet viser lite sammenheng mellom eksponeringsforhold og gjennomsnittlig glutation-konsentrasjon (figur 9). Dunnet-test ble utført på resultatene for å undersøke om noen av behandlingsgruppene var signifikant forskjellige fra kontroll, noe de viste seg å ikke være. Resultatene fra en Tukey-test viste at det heller ikke var noen statistisk signifikante forskjeller mellom hver enkelt av gruppene.

Ved høye nivåer av frie radikaler vil glutation-produksjonen hos en organisme oppreguleres, dersom mengden frie radikaler er høyere enn syntetiseringen av glutation vil oksidativt stress kunne oppstå hos en organisme (Zhu et al., 2011). Et forventet resultat fra glutation-assayet vil altså kunne ha vært at mellomdosene hadde høyest nivå, mens høydoserekene, hvor det var høy dødelighet, ville man ha sett tegn til deplesjon. Figur 9 kan tyde på et svakt slikt mønster. Flere prøver måtte derimot ha blitt analysert dersom for å bekrefte om det var noen sammenheng mellom glutationnivåer hos rekene og H₂O₂-konsentrasjoner. Det er også vært å nevne at reken ble fordelt etter høydose, mellomhøy dose, mellomlav dose osv., og ikke etter spesifikke konsentrasjoner. Dette ble gjort fordi konsentrasjonsforskjellene mellom replikatene var så små at ingen forskjeller i effekt var forventet.

4.5.2 Histologi

Histologiprøvene viste tydelige forskjeller mellom kontroll og behandlingsgrupper. Fordi det ikke ble tatt ut nok prøver til histologi kunne ingen resultater kvantifiseres på grunnlag av dem. Histologiprøvene gir derimot en interessant pekepinn mot hvilke effekter det er som fører til død hos reker eksponert for hydrogenperoksid.

Flere av rekeene hadde tydelige parasittære infeksjoner som vistes godt på histologiprøvene. Disse kan være en konfunderende årsak til gjelleskader. Figur 16 viser en parasitt i gjellevevet hos en av kontrollrekeene. Morfologiske endringer i gjellevev hos kontrollreke ble kun observert hos denne reken. Det kan ikke utelukkes at parasittære infeksjoner har bidratt skade på gjellevev hos flere av rekeene, da flere hadde parasittære infeksjoner.

5. Konklusjon

I denne oppgaven har det blitt gjort omfattende feltstudier som har undersøkt spredningen av hydrogenperoksid ved utslipp fra merd. Resultatene viste en i hovedsak rask fortykning. De høyeste H₂O₂-konsentrasjonene ble i hovedsak observert høyt opp i vannsøylen hvilket tyder på en raskere horisontal enn vertikal spredning. Resultatene indikerer at det er liten fare for akutt toksisitet hos «non-target»-organismer etter en enkelt merdbehandling grunnet en veldig rask fortykning. Nedbrytningsforsøk viste halveringstider for hydrogenperoksid fra ca. 3 til 28 dager. Sjøtemperatur hadde en tydelig effekt på halveringstiden.

Toksisitetsforsøk ga LC₅₀-verdi for *Pandalus montagui* eksponert for hydrogenperoksid i 6 timer på 170 mg/L (95% KI < 50, 2398>). LC₅₀-verdier for de øvrige eksponeringene kunne ikke kalkuleres. en EC₅₀-verdien for 6-timerseksponeringene var 10 (95% KI < 5, 18>), og for 1 timeseksponeringen i uke 6 og 7 var den på 48 mg/L (95% KI: < 5,52, 483460>). EC₅₀-verdier kunne ikke kalkuleres for toksisitetsforsøk utført i september. Ingen konklusjoner kunne trekkes ut fra resultater fra GSH-assayet. Histologiprøvene indikerer en skadelig effekt av hydrogenperoksid på gjellene til *Pandalus montagui* ved konsentrasjoner fra ca. 3,5 mg/L ved 6 timers eksponering.

6. Videre forskning

Videre forskning bør gjøres på spredningen av hydrogenperoksid fra merd. Da det kreves et stort apparat å få utføre slike feltforsøk bør det utarbeides gode modelleringer som kan estimere spredningen av hydrogenperoksid ved utslipp i sjø. Å designe et feltforsøk som kan fange opp helheten i spredningen til hydrogenperoksid virker lite gjennomførbart. En bedre tilnærming virker å være gode spredningsmodeller som kan verifiseres ved feltforsøk.

Det bør gjennomføres mer omfattende kartlegging hydrogenperoksids toksiske effekter på «non-target»-organismer. I denne studien ble kun blomsterreker brukt som forsøksdyr. Det hadde også vært interessant med toksisitetsdata fra eksponeringsforsøk med hydrogenperoksid i kombinasjon med andre avlusningsmidler.

Fordi oppdrettsanlegg gjerne behandler flere merder over 1 eller flere dager ville det ha vært interessant å se hvordan gjentatte korte eksponeringer påvirker «non-target»-organismer framfor langtidseksponeringer på 24 eller 96 timer.

Flere analyser av subletale effekter hos «non-target»-organismer bør gjennomføres da disse kan informasjon om eventuelle langtidseffekter hos organismene.

8. Referanser

- Aandahl, P. T. (2016). Laks og ørret for 50 milliarder i 2015. Retrieved from <http://www.seafood.no/Nyheter-og-media/Nyhetsarkiv/Pressemeldinger/Laks-og-%C3%B8rret-for-50-milliarder-i-2015>
- Adams, M. B., Crosbie, P. B. B., & Nowak, B. F. (2012). Preliminary success using hydrogen peroxide to treat Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with experimentally induced amoebic gill disease (AGD). *Journal of Fish Diseases*, 35(11), 839-848. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01422.x
- Agency, U. S. E. P. (1983). *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*. Cincinnati, OH: EPA.
- Bader, H., Sturzenegger, V., & Hoigné, J. (1988). Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD). *Water Research*, 22(9), 1109-1115. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(88\)90005-X](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(88)90005-X)
- Bakketeig, I., Gjørseter, H., Hauge, M., Sunnset, B. H., & Toft, K. Ø. (2015). *Havforskningsrapporten 2015 : ressurser, miljø og akvakultur på kysten og i havet* (Vol. 1-2015). Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2 Suppl 1), 3-8.
- Brandhuber, P. J., & Korshin, G. (2009). *Methods for the Detection of Residual Concentrations of Hydrogen Peroxide in Advanced Oxidation Processes* Retrieved from file:///C:/Users/mabafa/Downloads/04-019-01%20(5).pdf
- Brokke, K. (2015). Mortality caused by de-licing agents on the non-target organisms chameleon shrimp (*Praunus flexuosus*) and grass prawns (*Palaemon elegans*) - Master thesis in marine biology. Retrieved from
- Bruno, D. W., & Raynard, R. S. Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Aquaculture International*, 2(1), 10-18. doi:10.1007/bf00118529
- Burridge, L. E., Lyons, M. C., Wong, D. K. H., MacKeigan, K., & VanGeest, J. L. (2014). The acute lethality of three anti-sea lice formulations: AlphaMax[®], Salmosan[®], and Interox[®]Paramove[™]50 to lobster and shrimp. *Aquaculture*, 420-421, 180-186. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.041>
- Celander, M. C. (2011). Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4, Supplement), 72-77. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.002>
- Chemetrics. (2013). Technical Data Sheet, Hydrogen Peroxide, DPD method. Retrieved from https://www.chemetrics.com/index.php?route=product/product/download&file=pdf/peroxide_dpd.pdf
- Chemetrics a. Peroxide Vacu-vials[®] Kit, Cat. No. K-5513.
- Chemetrics c. (2013). Technical Datasheet - Hydrogen Peroxide, Ferric Thiocyanate Method. Midland, VA: Chemetrics.
- Chemetrics d. (2013). Technical Data Sheet, Hydrogen Peroxide, DPD method. Retrieved from https://www.chemetrics.com/index.php?route=product/product/download&file=pdf/peroxide_dpd.pdf
- Clark, G., Powell, M., & Nowak, B. (2003). Effects of commercial freshwater bathing on reinfection of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with Amoebic Gill Disease. *Aquaculture*, 219(1-4), 135-142. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00020-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00020-6)
- Coyle, C. H., Martinez, L. J., Coleman, M. C., Spitz, D. R., Weintraub, N. L., & Kader, K. N. (2006). Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(12), 2206-2213. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.017>
- Crosbie, P. B. B., Bridle, A. R., Cadoret, K., & Nowak, B. F. (2012). In vitro cultured *Neoparamoeba perurans* causes amoebic gill disease in Atlantic salmon and fulfils Koch's postulates.

- Karlsbakk, E. (2015). Amøbisk gjellesykdom (AGD) - litt om den nye plagen. In I. E. Bakketeig, H. Gjørseter, M. Hauge, B. H. Sunnset, & K. Ø. Toft (Eds.), *Havforskningsrapporten 2015* (pp. 220). Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Karlsen, Ø., Johnsen, I. A., Skardhamar, J., Sandvik, A., Albretsen, J., Nilsen, J. R., . . . Bjørn, P. A. (2016). Risikovurdering Lakselus - 2015. In Ø. K. T Svåsand, BO Kvamme, LH Stien, GL Taranger, KK Boxaspen, (Ed.), *Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2016* (pp. 17-54). Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Kiemer, M. C. B., & Black, K. D. (1997). The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo solar* L. *Aquaculture*, 153(3-4), 181-189. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00037-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00037-9)
- lakselusbekjempelse, F. o. (2012). *Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg*. Retrieved from <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140?q=lakselus>.
- Lusedata.no. (2012). *Terapiveileder: Medakamentell behandling av lakselus i oppdrettsanlegg* K. Rykhus (Ed.)
- maps, G. (2016).
- Mattilsynet. (2016). *Lakselusrapport: Vinteren og våren 2015*
- Miljødirektoratet. (2014). Kobber og andre kjemikalier i fiskeoppdrett. Retrieved from <http://www.miljostatus.no/tema/hav-og-kyst/fiskeoppdrett/kobber-og-andre-kjemikalier-i-fiskeoppdrett/>
- Miller, W. L., & Kester, D. R. (1994). Peroxide variations in the Sargasso Sea. *Marine Chemistry*, 48(1), 17-29. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203\(94\)90059-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203(94)90059-0)
- Mo, T. A., Hytterød, A. B., & Hansen, H. (2015). *Utvikling av amøbegjellesykdom (AGD) hos laks i tre oppdrettsanlegg i 2013-2014*. Retrieved from Oslo:
- MSD Animal Health. (2009). Splice vet. - SPC. Retrieved 22.05.2016, from Statens legemiddelverk <http://slv.no/ layouts/Preparatomtaler/Spc/1999-04254.pdf>
- National Center for Biotechnology Information. (2015). PubChem Compound Database; Hydrogen Peroxide. Retrieved from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydrogen_peroxide#section=Top
- Norte dos Santos, C. C., Leef, M., Adams, M., & Nowak, B. (2013). Changes in the interbranchial lymphoid tissue in fish affected by amoebic gill disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6), 1669. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.108>
- oppdrettsnotforurensning, F. o. (2003). *Forskrift om regulering av forurensning fra vask og impregnering av oppdrettsnøter*. Retrieved from <https://lovdata.no/dokument/LTI/forskrift/2002-11-28-1669>.
- Parsons, H., Nowak, B., Fisk, D., & Powell, M. (2001). Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 195(3-4), 205-210. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00567-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00567-6)
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., . . . Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, 51(3), 283-297. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0047-6374\(90\)90078-T](http://dx.doi.org/10.1016/0047-6374(90)90078-T)
- Poppe, T., Bergh, Ø., Espelid, S., & Nygaard, S. (1999). *Fiskehelse og fiskesykdommer*. Oslo: Universitetsforlaget AS.
- Powell, M. D., Parsons, H. J., & Nowak, B. F. (2001). Physiological effects of freshwater bathing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a treatment for amoebic gill disease. *Aquaculture*, 199(3-4), 259-266. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00573-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00573-7)
- Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). *Lipid Peroxidation* A. Catala (Ed.) *Chapter 1: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, Lipid Peroxidation* Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination>.
- Ringwood, Hoguet, Keppler, Gielazyn, Ward, & Rourk. (2003). *Cellular Biomarkers (lysosomal Destabilizatin, Glutathione & Lipid Peroxidation) in Three Common Estuarine Species: A*

- Methods Handbook* Retrieved from <http://www.mrl.cofc.edu/pdf/Miscpubs/ringwood-methods.pdf>
- Ringwood, A. H., & Conners, D. E. (2000). The effects of glutathione depletion on reproductive success in oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 50(1–5), 207-211. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00069-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00069-6)
- Sandmo, E., & Lorentzen, S. (2015, 15.12.2015). Dumper lakselus som våkner til liv igjen. NRK. Retrieved from <http://www.nrk.no/trondelag/dumper-lakselus-som-vakner-til-liv-igjen-1.12704545>
- Skarbøvik, E., Austnes, K., Allan, I., Stålnacke, P., Høgåsen, T., Nemes, A., . . . Beldring, S. (2014). *Elvetilførsler og direkte tilførsler til norske kystområder – 2013* Retrieved from <http://www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M264/M264.pdf>
- Solberg, C., Sæthre, L., & Julshamn, K. (2002). The effect of copper-treated net pens on farmed salmon (*Salmo salar*) and other marine organisms and sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1–12), 126-132. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00296-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00296-X)
- Stashchuk, N., Vlasenko, V., Inall, M. E., & Aleynik, D. (2014). Horizontal dispersion in shelf seas: High resolution modelling as an aid to sparse sampling. *Progress in Oceanography*, 128, 74-87. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2014.08.007>
- Stoian, I., Oros, A., & Moldoveanu, E. (1996). Apoptosis and Free Radicals. *Biochemical and Molecular Medicine*, 59(2), 93-97. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/bmme.1996.0072>
- Sømme, L. S. (2013a). Reker - Store norske leksikon. Retrieved from <https://snl.no/reker>
- Sømme, L. S. (2013b). Store Norske Leksikon - Blomsterreke. Retrieved from <https://snl.no/Blomsterreke>
- Taylor, R. S., Muller, W. J., Cook, M. T., Kube, P. D., & Elliott, N. G. (2009). Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture*, 290(1–2), 1-8. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.030>
- Thonhaugen, M. (2015, 05.03.2015). Oppdrettsneringa står i fare for å miste kontrollen. NRK. Retrieved from <http://www.nrk.no/nordland/-oppdrettsnaeringa-star-i-fare-for-a-miste-kontrollen-1.12242815>
- Torsvik N, M. S., Nedreaas K, (Ed.) (1995). *Fiskeribiologi*. Aurskog: Landbruksforlaget.
- Veldhoen, N., Ikonomou, M. G., Buday, C., Jordan, J., Rehaume, V., Cabecinha, M., . . . Helbing, C. C. (2012). Biological effects of the anti-parasitic chemotherapeutant emamectin benzoate on a non-target crustacean, the spot prawn (*Pandalus platyceros* Brandt, 1851) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 108, 94-105. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.015>
- Vengen , E. E., & Erstad, V. (2009). Notvaskeri skulda for miljøkriminalitet. Retrieved from <http://www.nrk.no/sognogfjordane/notvaskeri-skulda-for-miljokrim-1.6717709>
- Veterinærinstituttet. (2015). Fakta om: Amøbegjellesykdom (AGD). Retrieved from <http://www.vetinst.no/Faktabank/Amoebegjellesykdom-AGD/%28language%29/nor-NO>
- Villamena, F. A. (2013). *Molecular Basis of Oxidative Stress : Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis (1)*. Somerset, US: Wiley.
- Willis, K. J., & Ling, N. (2003). The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to planktonic marine copepods. *Aquaculture*, 221(1–4), 289-297. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00066-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00066-8)
- Wu, M., Wong, G. T. F., Wu, Y.-c., Shiah, F.-K., & Dai, M. (2015). Hydrogen peroxide in tropical shelf Waters: The Northern South China Sea Shelf. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 117, 143-154. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.027>
- Zhu, J., Krom, B. P., Sanglard, D., Intapa, C., Dawson, C. C., Peters, B. M., . . . Jabra-Rizk, M. A. (2011). Farnesol-Induced Apoptosis in *Candida albicans* Is Mediated by Cdr1-p Extrusion and Depletion of Intracellular Glutathione. *PLoS ONE*, 6(12), e28830. doi:10.1371/journal.pone.0028830

Vedlegg 1

Excel-arbeidsbok for Utrekning av EC₅₀-verdier med XLSTAT.

EC₅₀ 1 time med vannutskifting uke 49.

XLSTAT 2016.02.27732 - Dose effect analysis - Start time: 10.05.2016 at 12:11:49 / End time: 10.05.2016 at 12:11:50
 Observation weights: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$E\$27:\$E\$31 / 4 rows and 1 column
 Response variable(s): Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$F\$27:\$F\$31 / 4 rows and 1 column
 Quantitative: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$C\$27:\$C\$31 / 4 rows and 1 column
 Model: Logit
 Confidence interval (%): 95
 Stop conditions: Iterations = 100 / Convergence = 0,000001
 Maximization of the likelihood function using the Newton-Raphson algorithm

Summary statistics

Summary statistics:

Variable	Observations	with missing	without missir	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Påvirket	4	0	4	0,000	15,000	7,750	7,320
Log(C(mg/L))	4	0	4	-1,456	2,196	0,529	1,374

Regression of variable Påvirket:

Goodness of fit statistics (Variable Påvirket):

Statistic	Independent	Full
Observation:	60	60
Sum of weight	60,000	60,000
DF	59	57
-2 Log(Likelihood)	83,111	7,349
R ² (McFadden)	0,000	0,912
R ² (Cox and S)	0,000	0,717
R ² (Nagelkerke)	0,000	0,957
AIC	85,111	13,349
SBC	87,205	19,632
Iterations	0	101

Test of the null hypothesis H0: Y=0,517 (Variable Påvirket):

Statistic	DF	Chi-square	Pr > Chi ²
-2 Log(Likelihood)	2	75,762	< 0,0001
Score	2	0,000	
Wald	2	0,000	1,000

Type II analysis (Variable Påvirket):

Source	DF	i-square (Wald)	Pr > Wald	i-square (LR)	Pr > LR
Log(C(mg/L))	1	0,000	0,989	75,762	< 0,0001

Model parameters (Variable Påvirket):

Source	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi ²	Lower bound	Upper bound	Odds ratio	95% Lower bound	95% Upper bound
Intercept	-4,633	152,370	0,001	0,976	-303,272	294,006			
Log(C(mg/L))	17,412	1306,352	0,000	0,989	-2542,990	2577,814			

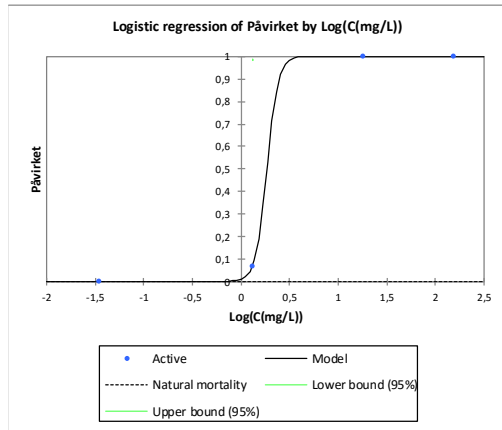
Natural mortality: 0

Equation of the model (Variable Påvirket):

$$\text{Påvirket} = 0 + 1 * (1 / (1 + \exp(-(-4,63344169647688 + 17,4124182034819 * \text{Log}(C(\text{mg/L}))))))$$

Predictions and residuals (Variable Påvirket):

Observation	Weight	Log(C(mg/L))	Påvirket	pred(Påvirket)	Independent	Weight	Std. residual	Lower bound	Upper bound	95%	95%
Obs1	15	-1,45593196	0,000	0,000	7,750	0,000	0,000	0,000	-4,004	0,000	15,000
Obs2	15	0,11660774	1,000	1,034	7,750	0,067	0,069	-0,035	-3,488	0,002	14,594
Obs3	15	1,26126287	15,000	15,000	7,750	1,000	1,000	0,001	3,746	0,000	15,000
Obs4	15	2,19589965	15,000	15,000	7,750	1,000	1,000	0,000	3,746	0,000	15,000



Probability analysis with the fitted model (Variable Påvirket):

Probability	C(mg/L)	Lower bound	Upper bound	95%	95%
0,01	1,005				
0,05	1,250				
0,10	1,380				
0,20	1,536				
0,30	1,650				
0,40	1,749				
0,50	1,845				
0,60	1,947				
0,70	2,064				
0,80	2,217				
0,90	2,468				
0,95	2,724				
0,99	3,388				

EC₅₀ 1 time uke 6 og 7.

XLSTAT 2016.02.27732 - Dose effect analysis - Start time: 10.05.2016 at 12:08:52 / End time: 10.05.2016 at 12:08:53
 Observation weights: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$E\$3:\$E\$12 / 9 rows and 1 column
 Response variable(s): Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$G\$3:\$G\$12 / 9 rows and 1 column
 Quantitative: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$C\$3:\$C\$12 / 9 rows and 1 column
 Model: Logit
 Confidence interval (%): 95
 Stop conditions: Iterations = 100 / Convergence = 0,000001
 Maximization of the likelihood function using the Newton-Raphson algorithm

Summary statistics

Summary statistics:

Variable	Observations with missing	without missing	d	Minimum	Maximum	Mean	std. deviation
Påvirket	9	0	9	0,000	15,000	3,918	6,173
Log(C (mg/L))	9	0	9	-1,301	2,295	0,700	1,261

Regression of variable Påvirket:

Goodness of fit statistics (Variable Påvirket):

Statistic	Independent	Full
Observations	134	134
Sum of weights	134,000	134,000
DF	133	131
-2 Log(Likelihood)	153,913	35,699
R ² (McFadden)	0,000	0,768
R ² (Cox and Snell)	0,000	0,586
R ² (Nagelkerke)	0,000	0,858
AIC	155,913	41,699
SBC	158,811	50,393
Iterations	0	101

Test of the null hypothesis H0: Y=0,261 (Variable Påvirket):

Statistic	DF	Chi-square	Pr > Chi ²
-2 Log(Likelihood)	2	118,214	< 0,0001
Score	2	-1,300	
Wald	2	-10,182	

Type II analysis (Variable Påvirket):

Source	DF	i-square (Wald)	Pr > Wald	i-square (LR)	Pr > LR
Log(C (mg/L))	1	-10,182		118,214	< 0,0001

Model parameters (Variable Påvirket):

Source	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi ²	Lower bound	Upper bound	Odds ratio	95% Lower bound	95% Upper bound
Intercept	-10,489	0,000	0,000	< 0,0001	0,000	0,000			
Log(C (mg/L))	6,241	65535,000							

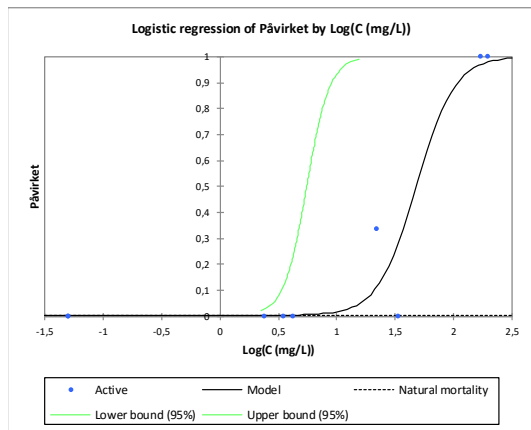
Natural mortality: 0,004

Equation of the model (Variable Påvirket):

$$\text{Påvirket} = 3,52392038584752E-03 + 0,996476079614153 * (1 / (1 + \exp(-(-10,4889503141745 + 6,24142043568072 * \text{Log}(C(\text{mg/L}))))))$$

Predictions and residuals (Variable Påvirket):

Observation	Weight	Log(C (mg/L))	Påvirket	red(Påvirket/Independentvirket/Weig Påvirket)/W	Std. residual	idial (Indepwer bound 9)	per bound 9				
Obs1	15	-1,30103	0,000	0,053	3,918	0,000	0,004	-0,231	-2,303	0,053	0,143
Obs2	15	-1,30103	0,000	0,053	3,918	0,000	0,004	-0,231	-2,303	0,053	0,143
Obs3	15	0,3838154	0,000	0,058	3,918	0,000	0,004	-0,241	-2,303	0,053	3,648
Obs4	15	0,5403295	0,000	0,065	3,918	0,000	0,004	-0,256	-2,303	0,053	4,705
Obs5	15	0,6283889	0,000	0,074	3,918	0,000	0,005	-0,273	-2,303	0,053	5,363
Obs6	15	1,3453737	5,000	1,695	3,918	0,333	0,113	2,695	0,636	0,145	10,684
Obs7	14	1,5301997	0,000	3,972	3,657	0,000	0,284	-2,355	-2,225	0,670	10,746
Obs8	15	2,2380461	15,000	14,553	3,918	1,000	0,970	0,679	6,514	12,699	14,922
Obs9	15	2,2953471	15,000	14,685	3,918	1,000	0,979	0,567	6,514	13,322	14,945



Probability analysis with the fitted model (Variable Påvirket):

Probability	C (mg/L)	Lower bound 95%	Upper bound 95%
0,01	7,494	1,804	3854,706
0,05	15,742	2,816	26780,477
0,10	21,026	3,354	56951,440
0,20	28,548	4,037	126355,535
0,30	34,905	4,562	213296,971
0,40	41,130	5,041	326984,005
0,50	47,798	5,523	483460,121
0,60	55,534	6,052	714350,779
0,70	65,386	6,686	1092564,840
0,80	79,789	7,550	1833793,635
0,90	107,634	9,065	3994293,961
0,95	141,808	10,731	8180470,310
0,99	260,734	15,585	39828137,410

EC₅₀ 6 timer uke 6 og 7.

XLSTAT 2016.02.27732 - Dose effect analysis - Start time: 10.05.2016 at 12:06:45 / End time: 10.05.2016 at 12:06:47
 Observation weights: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1!\$F\$14:\$F\$24 / 10 rows and 1 column
 Response variable(s): Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1!\$G\$14:\$G\$24 / 10 rows and 1 column
 Quantitative: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1!\$C\$14:\$C\$24 / 10 rows and 1 column
 Model: Logit
 Confidence interval (%): 95
 Stop conditions: Iterations = 100 / Convergence = 0,000001
 Maximization of the likelihood function using the Newton-Raphson algorithm
 Summary statistics

Summary statistics:

Variable	Observations	with missing	without missir	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Påvirket	10	0	10	0,000	15,000	5,600	6,172
Log(C(mg/L))	10	0	10	-1,301	2,216	0,455	1,246

Regression of variable Påvirket:

Goodness of fit statistics (Variable Påvirket):

Statistic	Independent	Full
Observation:	150	150
Sum of weigl	150,000	150,000
DF	149	147
-2 Log(Likeliit	198,212	80,720
R ² (McFadder	0,000	0,593
R ² (Cox and S	0,000	0,543
R ² (Nagelkerk	0,000	0,741
AIC	200,212	86,720
SBC	203,222	95,752
Iterations	0	16

Test of the null hypothesis H0: Y=0,373 (Variable Påvirket):

Statistic	DF	Chi-square	Pr > Chi ²
-2 Log(Likeliit	2	117,492	< 0,0001
Score	2	0,000	1,000
Wald	2	20,704	< 0,0001

Type II analysis (Variable Påvirket):

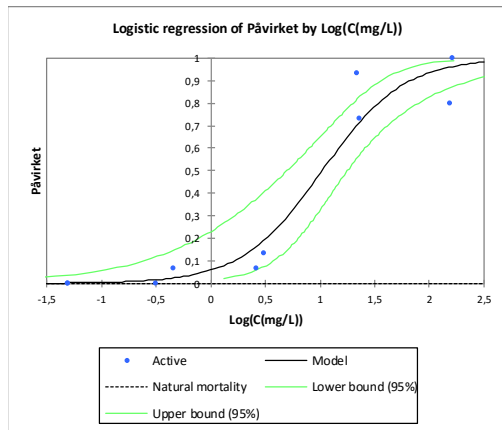
Source	DF	i-square (Wa	Pr > Wald	i-square (LF	Pr > LR
Log(C(mg/L))	1	20,704	< 0,0001	117,492	< 0,0001

Model parameters (Variable Påvirket):

Source	Value	Standard erro	ald Chi-Squa	Pr > Chi ²	Lower bound	Upper bound	Odds ratio	io Lower bou	Upper bound (95%)
Intercept	-2,769	0,796	12,091	0,001	-4,330	-1,208			
Log(C(mg/L))	2,714	0,596	20,704	< 0,0001	1,545	3,882	15,082	4,686	48,539

Predictions and residuals (Variable Påvirket):

Observation	Weight	Log(C(mg/L))	Påvirket	pred(Påvirket)	Independent	Weight	Weight	Weight	residual	95% bound	95% bound
Obs1	15	-1,30103	0,000	0,028	5,600	0,000	0,002	-0,166	-2,989	0,001	0,543
Obs2	15	-1,30103	0,000	0,028	5,600	0,000	0,002	-0,166	-2,989	0,001	0,543
Obs3	15	-0,50584541	0,000	0,235	5,600	0,000	0,016	-0,488	-2,989	0,029	1,748
Obs4	15	-0,3439018	1,000	0,361	5,600	0,067	0,024	1,076	-2,456	0,053	2,190
Obs5	15	0,42324587	1,000	2,476	5,600	0,067	0,165	-1,027	-2,456	0,905	5,676
Obs6	15	0,48287358	2,000	2,829	5,600	0,133	0,189	-0,547	-1,922	1,111	6,049
Obs7	15	1,33344727	14,000	10,506	5,600	0,933	0,700	1,970	4,484	8,302	12,226
Obs8	15	1,3569814	11,000	10,704	5,600	0,733	0,714	0,169	2,883	8,516	12,381
Obs9	15	2,19089172	12,000	14,399	5,600	0,800	0,960	-3,157	3,416	13,026	14,829
Obs10	15	2,21590181	15,000	14,437	5,600	1,000	0,962	0,765	5,018	13,097	14,844



Probability analysis with the fitted model (Variable Påvirket):

Probability	C(mg/L)	95% bound	95% bound
0,01	0,212	0,007	0,851
0,05	0,862	0,082	2,341
0,10	1,625	0,243	3,743
0,20	3,233	0,778	6,343
0,30	5,109	1,651	9,195
0,40	7,432	2,986	12,761
0,50	10,485	4,990	17,777
0,60	14,790	7,979	25,878
0,70	21,518	12,509	41,448
0,80	33,997	19,957	79,873
0,90	67,653	36,278	238,081
0,95	127,542	59,682	686,624
0,99	517,573	168,188	7595,846

Vedlegg 2

Excel arbeidsbok for Utrekning av LC₅₀-verdier med XLSTAT.

LC₅₀ 1 time med vannutskifting uke 49

XLSTAT 2016.02.27732 - Dose effect analysis - Start time: 10.05.2016 at 12:10:59 / End time: 10.05.2016 at 12:10:59
 Observation weights: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1!\$E\$27:\$E\$31 / 4 rows and 1 column
 Response variable(s): Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1!\$D\$27:\$D\$31 / 4 rows and 1 column
 Quantitative: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1!\$C\$27:\$C\$31 / 4 rows and 1 column
 Model: Logit
 Confidence interval (%): 95
 Stop conditions: Iterations = 100 / Convergence = 0,000001
 Maximization of the likelihood function using the Newton-Raphson algorithm

Summary statistics

Summary statistics:

Variable	Observations	with missing	without missing	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
døde	4	0	4	0,000	6,000	1,750	2,508
Log(C(mg/L))	4	0	4	-1,456	2,196	0,529	1,374

Regression of variable døde:

Goodness of fit statistics (Variable døde):

Statistic	Independent	Full
Observation:	60	60
Sum of weights	60,000	60,000
DF	59	57
-2 Log(Likelihood)	43,228	27,659
R ² (McFadden)	0,000	0,360
R ² (Cox and S)	0,000	0,229
R ² (Nagelkerke)	0,000	0,445
AIC	45,228	33,659
SBC	47,322	39,942
Iterations	0	101

Test of the null hypothesis H0: Y=0,117 (Variable døde):

Statistic	DF	Chi-square	Pr > Chi ²
-2 Log(Likelihood)	2	15,569	0,000
Score	2	0,000	
Wald	2	1,736	0,420

Type II analysis (Variable døde):

Source	DF	i-square (Wald)	Pr > Wald	i-square (LR)	Pr > LR
Log(C(mg/L))	1	1,736	0,188	15,569	< 0,0001

Model parameters (Variable døde):

Source	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi ²	Lower bound	Upper bound	Odds ratio	95% Lower bound	95% Upper bound
Intercept	-5,941	4,444	1,788	0,181	-14,650	2,768			
Log(C(mg/L))	2,531	1,921	1,736	0,188	-1,234	6,297	12,567	0,291	542,711

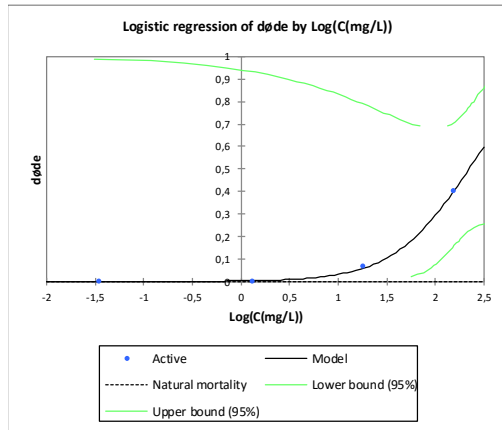
Natural mortality: 0

Equation of the model (Variable døde):

$$døde = 0 + 1 * (1 / (1 + \exp(-(-5,94104448563326 + 2,53106601233217 * \text{Log}(C(\text{mg/L}))))))$$

Predictions and residuals (Variable $d\phi de$):

Observation	Weight	Log(C(mg/L))	$d\phi de$	Pred($d\phi de$)	Independent	$d\phi de/Weight(d\phi de)/WeiStd.$	residual	idual (Indepower bound 95per bound 95			
Obs1	15	-1,45593196	0,000	0,001	1,750	0,000	0,000	-0,031	-1,408	0,000	14,840
Obs2	15	0,11660774	0,000	0,053	1,750	0,000	0,004	-0,230	-1,408	0,000	13,990
Obs3	15	1,26126287	1,000	0,903	1,750	0,067	0,060	0,106	-0,603	0,017	11,819
Obs4	15	2,19589965	6,000	6,081	1,750	0,400	0,405	-0,043	3,418	2,415	10,617



Probability analysis with the fitted model (Variable $d\phi de$):

Probability	C(mg/L)	wer bound 95per bound 95%
0,01	3,402	
0,05	15,273	
0,10	30,140	
0,20	63,029	
0,30	102,918	
0,40	153,835	
0,50	222,459	
0,60	321,696	
0,70	480,850	
0,80	785,166	
0,90	1641,921	
0,95	3240,184	
0,99	14545,809	

LC₅₀ 1 time uke 6 og 7.

XLSTAT 2016.02.27732 - Dose effect analysis - Start time: 10.05.2016 at 12:09:41 / End time: 10.05.2016 at 12:09:41
 Observation weights: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$E\$3:\$E\$12 / 9 rows and 1 column
 Response variable(s): Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$F\$3:\$F\$12 / 9 rows and 1 column
 Quantitative: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$C\$3:\$C\$12 / 9 rows and 1 column
 Model: Logit
 Confidence interval (%): 95
 Stop conditions: Iterations = 100 / Convergence = 0,000001
 Maximization of the likelihood function using the Newton-Raphson algorithm

Summary statistics

Summary statistics:

Variable	Observations	with missing	without missing	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Døde	9	0	9	0,000	1,000	0,336	0,474
Log(C (mg/L))	9	0	9	-1,301	2,295	0,700	1,261

Regression of variable Døde:

Goodness of fit statistics (Variable Døde):

Statistic	Independent	Full
Observation:	134	134
Sum of weight	134,000	134,000
DF	133	131
-2 Log(Likelihood)	28,728	27,574
R ² (McFadden)	0,000	0,040
R ² (Cox and Snell)	0,000	0,009
R ² (Nagelkerke)	0,000	0,044
AIC	30,728	33,574
SBC	33,626	42,267
Iterations	0	16

Test of the null hypothesis H0: Y=0,022 (Variable Døde):

Statistic	DF	Chi-square	Pr > Chi ²
-2 Log(Likelihood)	2	1,154	0,562
Score	2	0,000	1,000
Wald	2	0,506	0,776

Type II analysis (Variable Døde):

Source	DF	i-square (Wald)	Pr > Wald	i-square (Lack of Fit)	Pr > LR
Log(C (mg/L))	1	0,506	0,477	1,154	0,283

Model parameters (Variable Døde):

Source	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi ²	Lower bound	Upper bound	Odds ratio	95% Lower bound	95% Upper bound
Intercept	-4,409	3,125	1,991	0,158	-10,533	1,715			
Log(C (mg/L))	0,583	0,820	0,506	0,477	-1,023	2,190	1,792	0,359	8,934

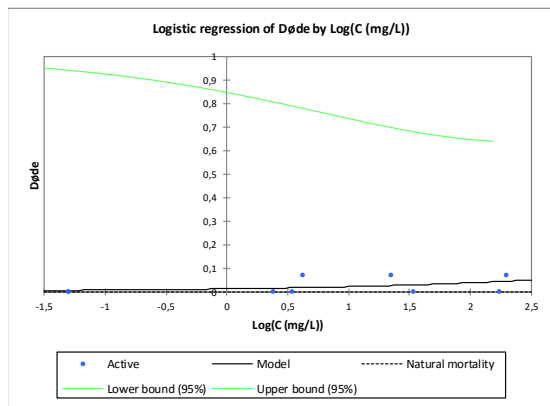
Natural mortality: 0

Equation of the model (Variable Døde):

$$Døde = 0 + 1 * (1 / (1 + \exp(-(-4,40920923040328 + 0,583353334619284 * \text{Log}(C(\text{mg/L}))))))$$

Predictions and residuals (Variable Døde):

Observation	Weight	Log(C (mg/L))	Døde	Pred(Døde)	IndependentDøde/Weight	Døde/Weight	Std. residual	idual (Indep	power bound 95	per bound 95	
Obs1	15	-1,30103	0,000	0,085	0,336	0,000	0,006	-0,292	-0,586	0,000	14,133
Obs2	15	-1,30103	0,000	0,085	0,336	0,000	0,006	-0,292	-0,586	0,000	14,133
Obs3	15	0,38381537	0,000	0,225	0,336	0,000	0,015	-0,478	-0,586	0,001	12,107
Obs4	15	0,54032947	0,000	0,246	0,336	0,000	0,016	-0,500	-0,586	0,001	11,844
Obs5	15	0,62838893	1,000	0,259	0,336	0,067	0,017	1,470	1,159	0,001	11,694
Obs6	15	1,34537373	1,000	0,390	0,336	0,067	0,026	0,991	1,159	0,005	10,491
Obs7	14	1,5301997	0,000	0,404	0,313	0,000	0,029	-0,645	-0,566	0,006	9,539
Obs8	15	2,2380461	0,000	0,644	0,336	0,000	0,043	-0,821	-0,586	0,017	9,578
Obs9	15	2,29534715	1,000	0,665	0,336	0,067	0,044	0,420	1,159	0,018	9,564



Probability analysis with the fitted model (Variable Døde):

Probability	C (mg/L)	wer bound 95per bound 95%
0,01	0,480	
0,05	324,301	
0,10	6192,181	
0,20	152041,483	
0,30	1276216,684	
0,40	7300053,170	
0,50	36173058,746	
0,60	179243924,460	
0,70	1025288413,656	
0,80	8606139276,051	
0,90	211313279820,278	
0,95	4034798457748,440	
0,99	2725608403580420,000	

LC₅₀ 6 t uke 6 og 7

XLSTAT 2016.02.27732 - Dose effect analysis - Start time: 07.05.2016 at 15:21:30 / End time: 07.05.2016 at 15:21:30
 Observation weights: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$F\$14:\$F\$24 / 10 rows and 1 column
 Response variable(s): Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$E\$14:\$E\$24 / 10 rows and 1 column
 Quantitative: Workbook = Pobit LC50.xlsx / Sheet = Ark1 / Range = 'Ark1'!\$C\$14:\$C\$24 / 10 rows and 1 column
 Model: Logit
 Confidence interval (%): 95
 Stop conditions: Iterations = 100 / Convergence = 0,000001
 Maximization of the likelihood function using the Newton-Raphson algorithm
 Summary statistics

Summary statistics:

Variable	Observations with missing	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Døde	10	0	10	0,000	8,000	2,500
Log(C(mg/L))	10	0	10	-1,301	2,216	0,455

Regression of variable Døde:

Goodness of fit statistics (Variable Døde):

Statistic	Independent	Full
Observations	150	150
Sum of weights	150,000	150,000
DF	149	147
-2 Log(Likelihood)	135,168	100,475
R ² (McFadden)	0,000	0,257
R ² (Cox and Snell)	0,000	0,206
R ² (Nagelkerke)	0,000	0,348
AIC	137,168	106,475
SBC	140,179	115,507
Iterations	0	16

Test of the null hypothesis H0: Y=0,167 (Variable Døde):

Statistic	DF	Chi-square	Pr > Chi ²
-2 Log(Likelihood)	2	34,693	< 0,0001
Score	2	0,000	1,000
Wald	2	6,128	0,047

Type II analysis (Variable Døde):

Source	DF	i-square (Wald)	Pr > Wald	i-square (LR)	Pr > LR
Log(C(mg/L))	1	6,128	0,013	34,693	< 0,0001

Model parameters (Variable Døde):

Source	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi ²	Lower bound	Upper bound	Odds ratio	95% Lower bound	95% Upper bound
Intercept	-3,061	1,178	6,749	0,009	-5,371	-0,752			
Log(C(mg/L))	1,373	0,555	6,128	0,013	0,286	2,460	3,946	1,331	11,699

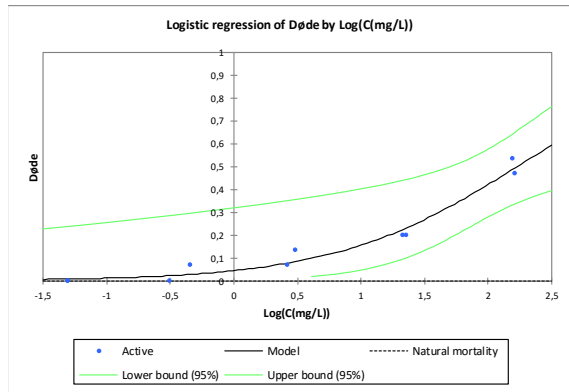
Natural mortality: 0

Equation of the model (Variable Døde):

$$Døde = 0 + 1 * (1 / (1 + \exp(-(-3,06120094624584 + 1,37271246900785 * \text{Log}(C(\text{mg}/L))))))$$

Predictions and residuals (Variable Døde):

Observation	Weight	Log(C(mg/L))	Døde	Pred(Døde)	Independent	Døde/Weight	WeiStd.	residual	idual (Indep	ower bound 95%	per bound 95%
Obs1	15	-1,30103	0,000	0,117	2,500	0,000	0,008	-0,343	-1,732	0,003	3,590
Obs2	15	-1,30103	0,000	0,117	2,500	0,000	0,008	-0,343	-1,732	0,003	3,590
Obs3	15	-0,50584541	0,000	0,343	2,500	0,000	0,023	-0,592	-1,732	0,020	4,296
Obs4	15	-0,3439018	1,000	0,426	2,500	0,067	0,028	0,893	-1,039	0,030	4,454
Obs5	15	0,42324587	1,000	1,159	2,500	0,067	0,077	-0,154	-1,039	0,191	5,283
Obs6	15	0,48287358	2,000	1,250	2,500	0,133	0,083	0,701	-0,346	0,220	5,354
Obs7	15	1,33344727	3,000	3,391	2,500	0,200	0,226	-0,241	0,346	1,463	6,618
Obs8	15	1,3569814	3,000	3,476	2,500	0,200	0,232	-0,291	0,346	1,533	6,664
Obs9	15	2,19089172	8,000	7,299	2,500	0,533	0,487	0,362	3,811	4,986	9,650
Obs10	15	2,21590181	7,000	7,427	2,500	0,467	0,495	-0,221	3,118	5,077	9,792



Probability analysis with the fitted model (Variable Døde):

Probability	C(mg/L)	wer bound 95%	Upper bound 95%
0,01	0,076	0,000	2,097E+00
0,05	1,216	0,000	1,041E+01
0,10	4,260	0,000	2,219E+01
0,20	16,601	0,009	5,452E+01
0,30	41,001	0,504	1,169E+02
0,40	86,033	9,270	3,377E+02
0,50	169,839	49,988	2,398E+03
0,60	335,284	117,602	3,902E+04
0,70	703,528	217,497	1,120E+06
0,80	1737,529	402,980	7,690E+07
0,90	6771,462	932,398	4,872E+10
0,95	23714,647	1950,366	1,926E+13
0,99	378017,917	9552,325	1,095E+19

Vedlegg 3

Prøve-ID, totalvekt, hepatopancreas-vekt og utregnet GSH-mengde fra GSH-assay. Prøver merket med rødt ble utelatt fra videre beregninger.

Kontroll

Prøve-ID	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	GSH in WW (nmol/g)
K8 17/02	3,06	0,01	151,21
K5 17/02	1,26	0,02	71,02
K6 17/02	5,07	0,02	346,50
K1 09/02	4,70	0,02	320,72
K10 09/02	1,28	0,03	204,04
K3 17/02	1,90	0,06	31,74
K6 09/02	2,95	0,07	199,78
K2 17/02	2,70	0,09	144,98
K10 17/02	1,43	0,11	20,93
K4 09/02	1,95	0,01	969,77
<i>Gjennomsnitt</i>	2,71	0,05	165,66

Lavdose

Prøve-ID	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	GSH in WW (nmol/g)
LD4 9/02	2,09	0,01	478,12
LD8 17/02	2,92	0,01	276,50
LD5 17/02	1,78	0,02	239,40
LD8 9/2	1,74	0,02	520,92
LD3 9/02	3,17	0,03	129,10
LD3 17/02	2,91	0,03	448,68
LD6 9/02	5,50	0,04	115,62
LD1 17/02	4,82	0,05	274,42
LD2 17/02	4,11	0,13	218,61
<i>Snitt</i>	3,23	0,04	300,15

Mellomlav dose

Prøve-ID	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	GSH in WW (nmol/g)
ML7 17/02	3,26	0,01	255,68
ML5 09/02	1,34	0,01	260,54
ML8 09/02	1,79	0,02	353,41
ML10 17/2	1,40	0,02	457,12
ML4 09/02	2,75	0,02	543,96
ML6 09/02	3,18	0,03	453,98
ML6 17/02	3,17	0,03	237,36
ML1 17/02	4,02	0,04	400,44
ML1 09/02	5,24	0,07	614,39
ML10 09/02	1,23	0,02	1077,20
ML3 09/02	1,71	0,01	1610,17
Gjennomsnitt	2,91	0,03	397,43

Mellomhøy dose

Prøve	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	(nmol/g)
MH7 09/02	2,39	0,01	405,86
MH3 17/02	2,21	0,01	33,61
MH7 17/02	3,28	0,02	121,31
MH1 09/02	4,80	0,03	679,19
MH9 17/02	1,26	0,04	164,69
MH6 17/02	5,85	0,05	337,76
MH6 09/02	4,36	0,06	427,46
MH2 17/02	1,77	0,16	330,46
MH3 09/02	1,68	0,02	969,18
MH5 17/02	1,36	0,02	-16,56
MH9 09/02	1,43	0,02	-68,09
Gjennomsnitt	3,24	0,05	312,54

Høydose

<i>Prøve</i>	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	(nmol/g)
<i>HD9 17/02</i>	1,06	0,01	168,87
<i>HD3 09/02</i>	2,51	0,02	168,88
<i>HD6 17/02</i>	4,16	0,02	938,11
<i>HD2 17/02</i>	3,17	0,02	315,48
<i>HD1 17/02</i>	3,88	0,04	205,62
<i>HD11 17/02</i>	5,52	0,05	250,44
<i>HD1 09/02</i>	5,81	0,06	777,86
<i>HD2 09/02</i>	4,80	0,10	405,88
<i>HD5 09/02</i>	1,35		
<i>Gjennomsnitt</i>	3,58	0,04	403,89

Kobber høydose

<i>Prøve</i>	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	(nmol/g)
<i>KCu2 17/02</i>	1,96	0,01	311,27
<i>KCu4 17/02</i>	1,55	0,01	28,47
<i>KCu3 17/02</i>	2,10	0,02	109,84
<i>KCu6 09/02</i>	4,06	0,03	365,72
<i>KCu1 17/02</i>	6,62	0,03	428,73
<i>KCu7 17/02</i>	2,99	0,03	484,36
<i>KCu5 09/02</i>	2,85	0,03	261,61
<i>KCu1 09/02</i>	4,46	0,03	213,04
<i>KCu4 09/02</i>	2,87	0,05	231,89
<i>KCu2 09/02</i>	4,22	0,05	372,06
<i>KCu6 17/02</i>	5,13	0,07	446,85
<i>KCu8 09/02</i>	2,07	0,01	1413,02
<i>Gjennomsnitt</i>	3,53	0,03	295,80

Kobber kontroll

Prøve	Totalvekt (g)	HP-vekt (g)	(nmol/g)
<i>HDCu2 17/02</i>	2,67	0,01	70,88
<i>HDCu8 17/02</i>	1,54	0,01	168,19
<i>HDCu9 17/02</i>	2,49	0,02	85,62
<i>HDCu10 17/02</i>		0,02	514,22
<i>HDCu7 17/02</i>	1,84	0,02	256,45
<i>HDCu5 09/02</i>	1,10	0,03	154,24
<i>HDCu3 09/02</i>	2,40	0,03	766,91
<i>HDCu6 17/02</i>	4,63	0,04	321,48
<i>HDCu1 09/02</i>	3,56	0,05	870,36
<i>HDCu4 09/02</i>	2,15	0,07	252,27
<i>HDCu2 09/02</i>	2,34	0,02	-47,48
<i>HDCu1 17/02</i>	3,65	0,01	-33,62
<i>Gjennomsnitt</i>	2,49	0,03	346,06

Vedlegg 4

Excel-arbeidsbok for Dunnet-test og Tukey-test av verdier fra GSH-assay.

XLSTAT 2016.02.27732 - ANOVA - Start time: 14.05.2016 at 20:32:44 / End time: 14.05.2016 at 20:32:56
 Y / Dependent variables: Workbook = GSH-resultater.xls / Sheet = Sheet2 / Range = Sheet2!\$C\$4:\$C\$68 / 64 rows and 1 column
 X / Qualitative: Workbook = GSH-resultater.xls / Sheet = Sheet2 / Range = Sheet2!\$B\$4:\$B\$68 / 64 rows and 1 column
 Constraints: a1=0
 Confidence interval (%): 95
 Tolerance: 0,0001
 Use least squares means: No

Summary statistics (Quantitative data)

Summary statistics (Quantitative data):

Variable	Observationwith missin	without missi	Minimum	Maximum	Mean	std. deviation	
GSH (nmo	64	0	64	20,934	938,113	315,861	202,463

Summary statistics (Qualitative data):

Variable	Categories	Counts	Frequencies	%
Behandling	Cu høydose	10	10	15,625
	Cu kontroll	11	11	17,188
	Høy dose	8	8	12,500
	Kontroll	9	9	14,063
	Lavdose	9	9	14,063
	Mellom høy	8	8	12,500
	Mellom lav	9	9	14,063

Correlation matrix:

	Behandling-Cu	handling-Cu	kontroll-Høy	andling-Kor	andling-Lav	andling-Mellom	andling-Mellom	GSH (nmol/g)
Behandling	1	-0,196	-0,163	-0,174	-0,174	-0,163	-0,174	0,065
Behandling	-0,196	1	-0,172	-0,184	-0,184	-0,172	-0,184	-0,045
Behandling	-0,163	-0,172	1	-0,153	-0,153	-0,143	-0,153	0,166
Behandling	-0,174	-0,184	-0,153	1	-0,164	-0,153	-0,164	-0,302
Behandling	-0,174	-0,184	-0,153	-0,164	1	-0,153	-0,164	-0,032
Behandling	-0,163	-0,172	-0,143	-0,153	-0,153	1	-0,153	-0,006
Behandling	-0,174	-0,184	-0,153	-0,164	-0,164	-0,153	1	0,164
GSH (nmo	0,065	-0,045	0,166	-0,302	-0,032	-0,006	0,164	1

Regression of variable GSH (nmol/g):

Goodness of fit statistics (GSH (nmol/g)):

Observatio	64,000
Sum of we	64,000
DF	57,000
R ²	0,132
Adjusted F	0,041
MSE	#####
RMSE	198,312
MAPE	100,286
DW	2,303
Cp	7,000
AIC	683,686
SBC	698,798
PC	1,081

Analysis of variance (GSH (nmol/g)):

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F	Pr > F
Model	6	#####	#####	1,444	0,214
Error	57	#####	#####		
Corrected	63	#####			

Computed against model Y=Mean(Y)

Model parameters (GSH (nmol/g)):

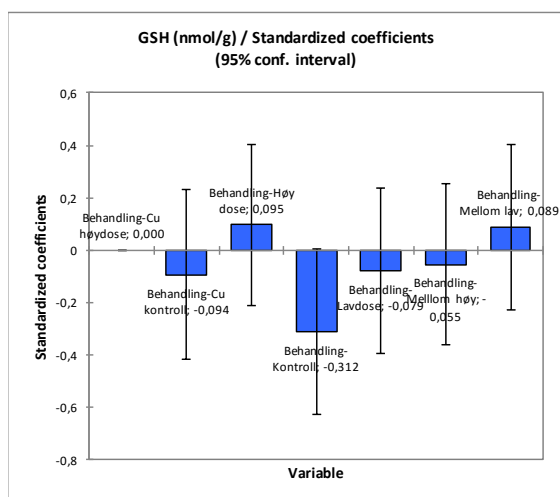
Source	Value	Standard error	t	Pr > t	Lower bound (95%)	Upper bound (95%)
Intercept	346,063	62,712	5,518	< 0,0001	220,485	471,641
Behandling	0,000	0,000				
Behandling	-50,260	86,649	-0,580	0,564	-223,771	123,251
Behandling	57,829	94,068	0,615	0,541	-130,538	246,196
Behandling	-180,405	91,118	-1,980	0,053	-362,865	2,056
Behandling	-45,910	91,118	-0,504	0,616	-228,370	136,551
Behandling	-33,519	94,068	-0,356	0,723	-221,886	154,848
Behandling	51,368	91,118	0,564	0,575	-131,093	233,829

Equation of the model (GSH (nmol/g)):

GSH (nmol/g) = 346,062556401419-50,2602123112757*Behandling-Cu kontroll+57,8288733765009*Behandling-Høy dose-180,404628294573*Behandling-Mellom lav+45,9102123112757*Behandling-Lavdose-33,5192123112757*Behandling-Mellom høy+51,3682123112757*Behandling-Kontroll

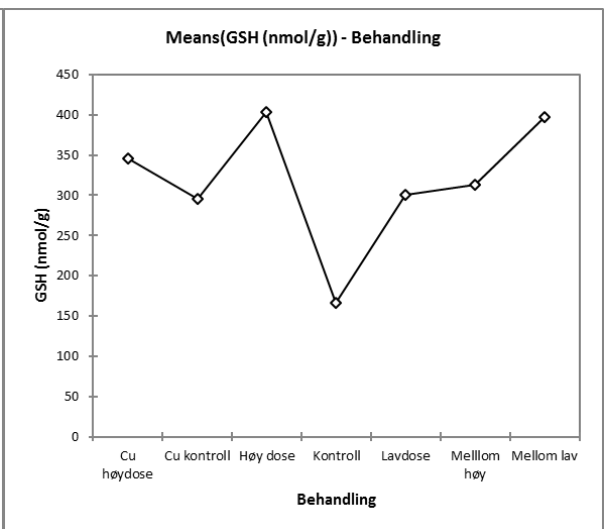
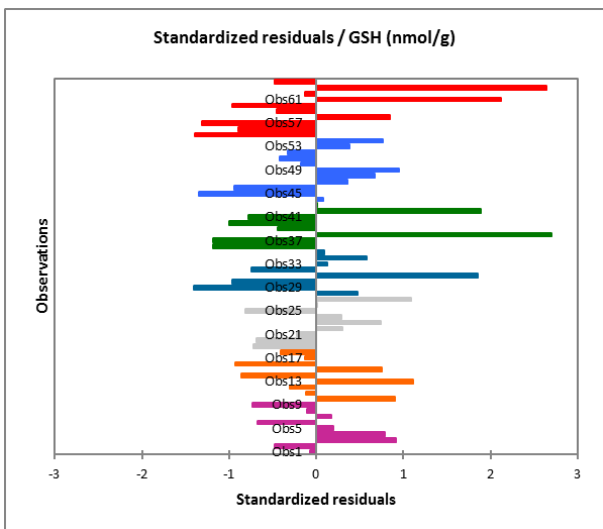
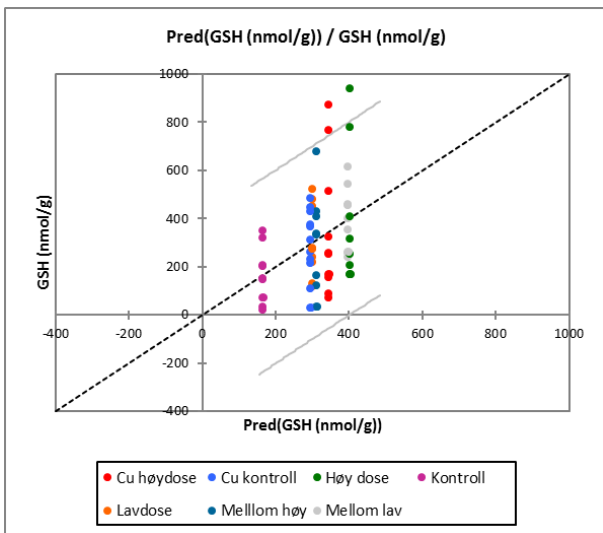
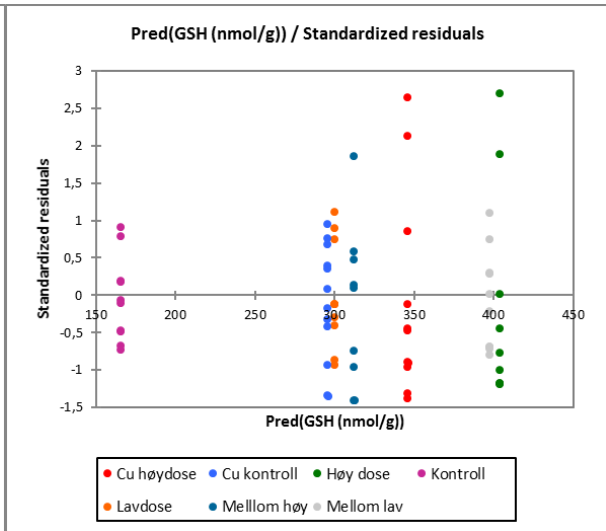
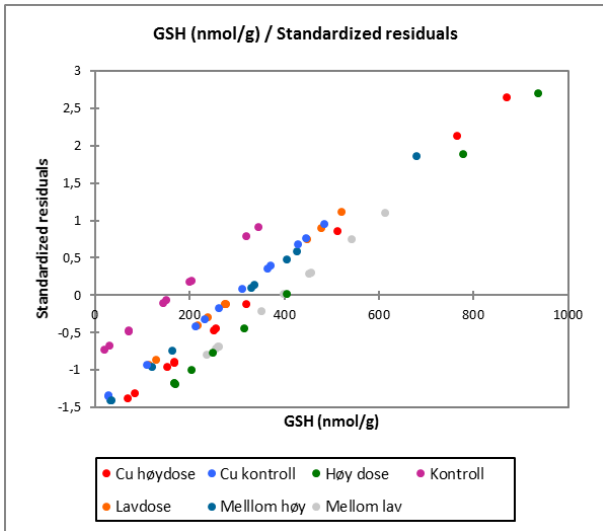
Standardized coefficients (GSH (nmol/g)):

Source	Value	Standard error	t	Pr > t	Lower bound (95%)	Upper bound (95%)
Behandling	0,000	0,000				
Behandling	-0,094	0,163	-0,580	0,564	-0,420	0,231
Behandling	0,095	0,155	0,615	0,541	-0,215	0,405
Behandling	-0,312	0,158	-1,980	0,053	-0,628	0,004
Behandling	-0,079	0,158	-0,504	0,616	-0,395	0,236
Behandling	-0,055	0,155	-0,356	0,723	-0,365	0,255
Behandling	0,089	0,158	0,564	0,575	-0,227	0,405



Predictions and residuals (GSH (nmol/g)):

Observator	Weight	iSH (nmol/g)	(GSH (nmol/g))	Residual	3std. residu	2ntized residu	on pred.	ound 95%	ound 95%	n pred.	(Oind 95%	(Oind 95%	(Observation)
Obs1	1	151,207	165,658	-14,451	-0,073	-0,077	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs2	1	71,016	165,658	-94,641	-0,477	-0,506	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs3	1	346,504	165,658	180,846	0,912	0,967	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs4	1	320,723	165,658	155,065	0,782	0,829	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs5	1	204,043	165,658	38,386	0,194	0,205	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs6	1	31,737	165,658	-133,921	-0,675	-0,716	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs7	1	199,778	165,658	34,120	0,172	0,182	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs8	1	144,979	165,658	-20,679	-0,104	-0,111	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs9	1	20,934	165,658	-144,724	-0,730	-0,774	66,104	33,287	298,029	209,039	-252,935	584,251	
Obs10	1	478,124	300,153	177,971	0,897	0,952	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs11	1	276,500	300,153	-23,653	-0,119	-0,127	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs12	1	239,400	300,153	-60,753	-0,306	-0,325	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs13	1	520,918	300,153	220,765	1,113	1,181	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs14	1	129,101	300,153	-171,052	-0,863	-0,915	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs15	1	448,680	300,153	148,527	0,749	0,794	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs16	1	115,624	300,153	-184,529	-0,931	-0,987	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs17	1	274,418	300,153	-25,735	-0,130	-0,138	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs18	1	218,613	300,153	-81,540	-0,411	-0,436	66,104	167,782	432,524	209,039	-118,440	718,746	
Obs19	1	255,682	397,431	-141,748	-0,715	-0,758	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs20	1	260,543	397,431	-136,888	-0,690	-0,732	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs21	1	353,407	397,431	-44,024	-0,222	-0,235	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs22	1	457,120	397,431	59,689	0,301	0,319	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs23	1	543,958	397,431	146,527	0,739	0,784	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs24	1	453,977	397,431	56,547	0,285	0,302	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs25	1	237,358	397,431	-160,073	-0,807	-0,856	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs26	1	400,436	397,431	3,005	0,015	0,016	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs27	1	614,394	397,431	216,964	1,094	1,160	66,104	265,060	529,801	209,039	-21,163	816,024	
Obs28	1	405,863	312,543	93,319	0,471	0,503	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs29	1	33,614	312,543	-278,929	-1,407	-1,504	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs30	1	121,310	312,543	-191,233	-0,964	-1,031	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs31	1	679,190	312,543	366,647	1,849	1,976	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs32	1	164,691	312,543	-147,852	-0,746	-0,797	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs33	1	337,758	312,543	25,215	0,127	0,136	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs34	1	427,463	312,543	114,919	0,579	0,619	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs35	1	330,456	312,543	17,913	0,090	0,097	70,114	172,143	452,944	210,341	-108,658	733,745	
Obs36	1	168,865	403,891	-235,026	-1,185	-1,267	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs37	1	168,884	403,891	-235,008	-1,185	-1,267	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs38	1	938,113	403,891	534,222	2,694	2,880	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs39	1	315,475	403,891	-88,416	-0,446	-0,477	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs40	1	205,616	403,891	-198,275	-1,000	-1,069	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs41	1	250,436	403,891	-153,456	-0,774	-0,827	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs42	1	777,858	403,891	373,966	1,886	2,016	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs43	1	405,884	403,891	1,993	0,010	0,011	70,114	263,491	544,292	210,341	-17,310	825,093	
Obs44	1	311,267	295,802	15,464	0,078	0,082	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs45	1	28,472	295,802	-267,331	-1,348	-1,414	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs46	1	109,839	295,802	-185,963	-0,938	-0,983	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs47	1	365,720	295,802	69,917	0,353	0,370	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs48	1	428,726	295,802	132,924	0,670	0,703	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs49	1	484,357	295,802	188,554	0,951	0,997	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs50	1	261,605	295,802	-34,197	-0,172	-0,181	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs51	1	213,045	295,802	-82,758	-0,417	-0,438	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs52	1	231,892	295,802	-63,910	-0,322	-0,338	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs53	1	372,057	295,802	76,254	0,385	0,403	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs54	1	446,847	295,802	151,045	0,762	0,799	59,793	176,068	415,536	207,130	-118,968	710,573	
Obs55	1	70,878	346,063	-275,184	-1,388	-1,463	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs56	1	168,185	346,063	-177,877	-0,897	-0,945	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs57	1	85,622	346,063	-260,441	-1,313	-1,384	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs58	1	514,222	346,063	168,159	0,848	0,894	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs59	1	256,449	346,063	-89,613	-0,452	-0,476	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs60	1	154,244	346,063	-191,819	-0,967	-1,020	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs61	1	766,911	346,063	420,849	2,122	2,237	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs62	1	321,478	346,063	-24,585	-0,124	-0,131	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs63	1	870,365	346,063	524,302	2,644	2,787	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	
Obs64	1	252,272	346,063	-93,790	-0,473	-0,499	62,712	220,485	471,641	207,991	-70,432	762,558	



Behandling / Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95% (GSH (nmol/g)):

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
Høy dose \	238,234	2,472	3,056	0,189	No
Høy dose \	108,089	1,173	3,056	0,901	No
Høy dose \	103,738	1,077	3,056	0,932	No
Høy dose \	91,348	0,921	3,056	0,968	No
Høy dose \	57,829	0,615	3,056	0,996	No
Høy dose \	6,461	0,067	3,056	1,000	No
Mellom lav	231,773	2,479	3,056	0,186	No
Mellom lav	101,628	1,140	3,056	0,913	No
Mellom lav	97,278	1,041	3,056	0,942	No
Mellom lav	84,887	0,881	3,056	0,974	No
Mellom lav	51,368	0,564	3,056	0,998	No
Cu høydos	180,405	1,980	3,056	0,438	No
Cu høydos	50,260	0,580	3,056	0,997	No
Cu høydos	45,910	0,504	3,056	0,999	No
Cu høydos	33,519	0,356	3,056	1,000	No
Mellom hø	146,885	1,524	3,056	0,729	No
Mellom hø	16,741	0,182	3,056	1,000	No
Mellom hø	12,390	0,129	3,056	1,000	No
Lavdose vs	134,495	1,439	3,056	0,779	No
Lavdose vs	4,351	0,049	3,056	1,000	No
Cu kontroll	130,144	1,460	3,056	0,767	No

Tukey's d critical value: 4,322

Category	Mean	Standard error	Lower bound	Upper bound	Groups
Høy dose	403,891	70,114	263,491	544,292	A
Mellom lav	397,431	66,104	265,060	529,801	A
Cu høydos	346,063	62,712	220,485	471,641	A
Mellom hø	312,543	70,114	172,143	452,944	A
Lavdose	300,153	66,104	167,782	432,524	A
Cu kontroll	295,802	59,793	176,068	415,536	A
Kontroll	165,658	66,104	33,287	298,029	A

Behandling / Dunnett (two sided) / Analysis of the differences between the control category Behandling-Kontroll and the other categories with a confidence interval of 95%:

Contrast	Difference	Standardized difference	Critical value	Pr > Diff	Significant
Kontroll vs	-238,234	-2,472	2,645	0,075	No
Kontroll vs	-231,773	-2,479	2,645	0,074	No
Kontroll vs	-180,405	-1,980	2,645	0,211	No
Kontroll vs	-146,885	-1,524	2,645	0,455	No
Kontroll vs	-134,495	-1,439	2,645	0,513	No
Kontroll vs	-130,144	-1,460	2,645	0,498	No