

**En undersøkelse av brentkalks effekt
på frittlevende stadier av lakselus,
og om virkningen har en sammenheng med
partikkelstørrelse og reaktivitet, T₆₀**

Masteroppgave i farmasi

Rosini Nguyen



Universitet i Bergen

Senter for farmasi

Seacalx

Juni 2018

Sammendrag

I Norge gir lakselusen (*Lepeophtheirus salmonis*) alene tap på flere hundre millioner kroner hvert år for lakseoppdretterne på grunn av dødelighet, tap av tilvekst, samt nedgradering av kvalitet og utgifter til behandling og arbeid. Og vi opplever et økende resistensproblem med lakselusa. Legemiddelresistens har ført til at bruk av mekanisk avlusning er femdoblet på ett år, og man er bekymret for fiskevelferden (1). Dagens avlusningsmetoder er rettet mot de fastsittende lustadiene samt internsmitten i opprettsanlegg, derfor bør behandling av de frittlevende stadiene av lakselus undersøkes. Undersøkelser viser at brentkalk kan være et miljøvennlig alternativ til dagens behandlingsalternativer uten negative virkninger på non target organismer.

Seacalx har i sitt innledende arbeid utført dose-eksponeringstid-respons assay av partikulært brentkalk på frittlevende lusestadier. Reaktivitet (T_{60} verdien) og partikkelstørrelsen antas å være viktige parametre for brentkalks effekt. Med bakgrunn i dette, er målet for denne oppgaven å undersøke om virkningen av brentkalk har en sammenheng med partikkelstørrelsen reaktiviteten, T_{60} . Eksponeringstid og dose benyttet i denne undersøkelsen er valgt på grunnlag av tidligere dose-eksponeringstid-respons assay.

Kornstørrelsesfordeling blir bestemt for at 3 ulike partikkelstørrelser brukes videre til in-vitro forsøk. Resultatet viser at alle de fire undersøkte kvalitetene av brentkalk er innenfor grenseverdien med hensyn til partikkelfordeling definert i Seacalx spesifikasjonen for legemiddel (vedlegg 1).

Undersøkelser i denne oppgaven viser at effekten av brentkalk på frittlevende stadier av lakselus reduseres med økende partikkelstørrelse. Den minste partikkelstørrelsen (< 0.15 mm) gir tilnærmet 100 % mortalitet, mot 80 % for den største partikkelstørrelsen. Dette indikerer at partikkelstørrelsene påvirker effekten av brentkalk på de tre frittlevende stadiene av lakselus.

Ulike reaktiviteter, derimot påvirker ikke brentkalk effekt på stadiene av lakselusen.

Forord

Denne masteroppgaven ble utført hos Seacalx AS, Sea Lice Research Center (SLRC) og Senter for farmasi, klinisk institutt 2, Laboratorium.

Først og fremst vil jeg takke min veileder Fride Iversen og alle dere hos Seacalx. Dere har tatt imot meg med åpne armer. Jeg har fått beste velkomst og følt jeg er en av dere. Jeg ønsker å takke Seacalx for muligheten til å skrive denne masteroppgaven.

Takk til min andre veileder professor Svein Haavik for veiledning og korrekturlesing. Takk til alle dere som har hjulpet meg og ressurser jeg har fått tilgang til i Klinisk 2, Laboratorium

Jeg ønsker å rette en stor takk til Anna Komisarczuk hos SLRC for veiledningen og alt av hjelp. Per Gunnar fortjener også en stor takk for alt av arbeid. Dere har bidratt til å gjennomføre dette forsøket lettere.

Bergen, Juni 2018

Rosini Nguyen

Innholdsfortegnelse

Sammen drag	3
Forord	4
Innholdsfortegnelse	5
Forkortelser	7
1. Innledning	8
1.1 Bakgrunn, oppdrettsnæringen	8
1.2 Lakselusen.....	9
1.2.1 Lakselusens livssyklus	9
1.2.2 Lakselusens anatomi og biologi.....	10
1.2.3 Vanntemperaturens påvirkning på utviklingshastigheten og spredningen av lakselus...11	
1.2.4 Lakselusens resistensutvikling.....	12
1.2.5 Medikamentelle behandlingsmetoder.....	14
1.2.6 Ikke medikamentelle behandlingsmetoder.....	15
1.3 Fiskens immunrespons ved infeksjoner.....	16
1.4 Seacalx.....	18
1.5 Brentkalk.....	19
1.5.1 Kalksyklussen.....	20
1.5.2 Produksjon av brennkalk.....	20
1.5.3 Kjemi og egenskaper.....	21
1.5.4 Brennkalkens reaktivitet, T ₆₀ -verdi.....	23
1.6 Biossay.....	24
1.7 Oppgavens formål.....	25
2. Materiale og metode	26
2.1.1 Brentkalk.....	26
2.1.2 Instrumenter og utstyr.....	26
2.1.3 Analyseparameter og betingelser.....	27
2.2 Sikting av brennkalk.....	28
2.3 Måling av reaktivitet, T ₆₀	29
2.4 <i>In-vitro</i> forsøk hos SLRC.....	30
2.4.1 Førsøksdyr.....	30
2.4.2 Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.....	31
2.4.3 Resultat tolking.....	32
2.4.4 Forsøksoppsett.....	32
2.4.5 Statistisk signifikans.....	34

3. Resultat	35
3.1 Sikting av Brentkalk.....	35
3.2 Måling av reaktivitet, T_{60}	38
3.3 Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.....	39
3.3.1 Undersøkelse om brentkalkens effekt har en sammenheng mellom reaktivitet og partikkelstørrelse.....	39
3.3.2 Undersøkelse av forskjeller i brentkalkens effekt mot alle frittlevende stadiene av lakselus.....	42
3.3.3 Statistisk signifikans.....	45
4. Diskusjon	46
4.1 Sikting av brentkalk.....	46
4.2 Måling av reaktivitet, T_{60}	47
4.3 Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.....	49
4.3.1 Undersøkelse om brentkalks effekt har en sammenheng mellom reaktivitet og partikkelstørrelse....	49
4.3.2 Undersøkelse av forskjeller i brentkalks effekt mot alle frittlevende stadiene av lakselus..	51
5. Konklusjon	53
6. Videre arbeid	54
7. Referanser	55
8. Vedlegg	60
Vedlegg 1.....	60
Vedlegg 2.....	61
Vedlegg 3.....	63
Vedlegg 4.....	65
Vedlegg 5.....	68
Vedlegg 6.....	69

Forkortelser

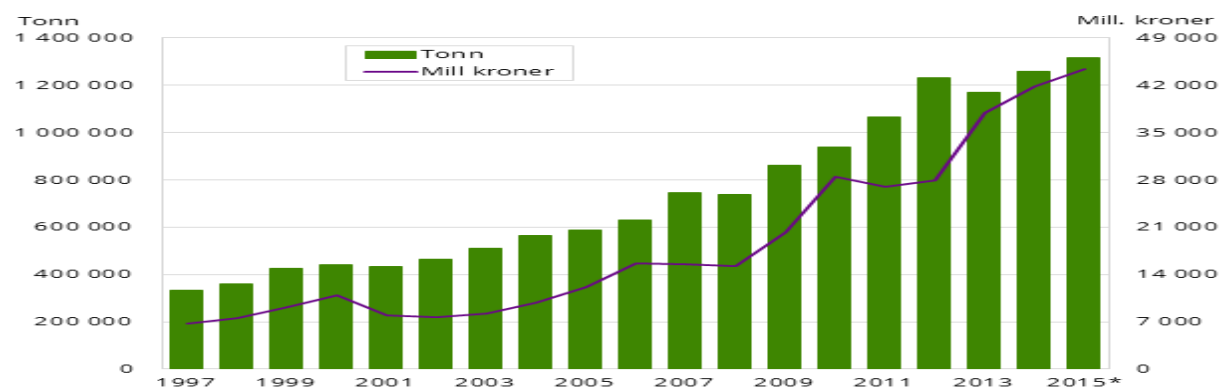
Forkortelse	Betydning
CaO	Kalsiumoksid
Ca(OH) ₂	Kalsiumhydroksid
CaCO ₃	Kalsiumkarbonat
H ₂ O ₂	Tungt vann
SLRC	Sea Lice Research Center
S	Standardavvik
rpm	Omdreiningstall per minutt
DiH ₂ O	Deionisert vann
g	Gram
kg	Kilo
mm	Millimeter
DER-assay	Dose-eksponeringstid-respons assay
CO ₂	Karbondioksid
GMP	Good Manufacturing Practice
Spec	Spesifikasjon
IMP	Integrated pest management
NKF	NorFraKalk

1. Innledning

1.1 Bakgrunn, oppdrettsnæringen

Det begynte på Hitra i 1969 da laksesmolt ble satt i merder i sjøen. Resultatene fra laksepionerene var gode allerede første året, og det store gjennombruddet for norsk lakseoppdrett kom i begynnelsen av 1970-årene. Den nye næringen hadde de følgende tiårene en eventyrlig utvikling, men også med noen tunge perioder underveis. Norge eksporterte i 2002 ca. 94 % av den produserte fisken, og EU var og er det viktigste markedet for norsk lakseeksport (2). De siste tiårene har næringen vokst kraftig, og Norge er nå verdens største eksportør av oppdrettslaks (3). Som illustrert i figur 1, ble det i 1997 produsert 330 000 tonn oppdretts laks til en verdi av 7 milliarder kroner, mens i 2015 ble det solgt 1.39 millioner tonn fisk til en verdi av 46,7 milliarder kroner fra norske oppdrettsanlegg (6). Oppdrettsnæringen har utvilsomt positive virkninger på norsk økonomi, men på den andre siden er den også årsak til et stadig økende problem med lakselus (58).

Figur 1. Solgt mengde og førstehåndsverdi av laks



Kilde: Statistisk sentralbyrå.

Figur 1: Viser oppdrettsnæringen vokser firedobles siden 1997 til 2015 (6)

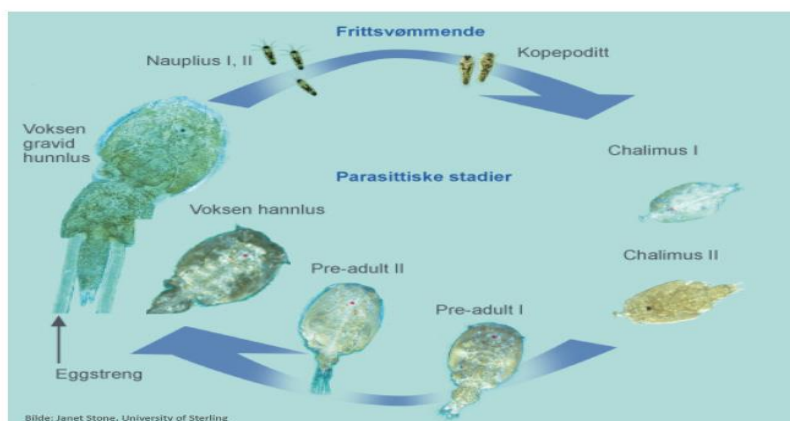
I dag produseres det store mengder oppdrettslaks og regnbueørret i oppdrettsanleggene sammenlignet med antall vill sjøørret og laks i hele landet. Dette gjør at det utvikles mye mer lakselus nå enn tidligere (3). Det er en sammenheng mellom økt produksjon av fisk og høyere forekomst av lakselus. Økning av oppdrettsfisk i sjøen gir større smitteproduksjon per fisk og dermed akselererer smittepresset (59). Kunnskap om lusens biologi, livssyklus og samspill mellom parasitt og vertsorganisme er grunnleggende for å kunne bekjempe lakselus. Slik kunnskap gir økt forståelse av hvordan mekanismene av eksisterende legemidler fungerer. En helhetlig bekjempelsesstrategi kan bidra til å identifisere nye angrepspunkter mot lusen, og forhåpentligvis også motvirke resistensutvikling (5).

1.2 Lakselusen

Lakselusen (*Lepeophtheirus salmonis*) er et parasittisk krepsdyr. Lusen lever av vertens slim, hud, vev og blod. Hunnlusene slipper eggene sine fritt i vannet og larvene (nauplier) driver med strømmen og utvikler seg til parasittære stadier (kopepoditter) som kan infisere laks og sjøørret. Fisken skades imidlertid mest av preadulte og adulte lus. Denne parasitten gir de norske oppdretterne betydelig økonomisk tap i form av behandlingsutgifter og redusert tilvekst (4,7).

1.2.1 Lakselusens livssyklus

Som illustrert i figur 2, består *L. salmonis* livssyklusen av åtte utviklingstadier med syv skallskifter imellom. De to naupliastadiene og kopepodittstadiet er frittlevende i vannet, de fem andre stadiene er parasittære og trenger en vert for å overleve (10). Fra hunnens eggstrenger klekkes nauplia I larver som flyter fritt i vannmassene, og utvikler seg til kopepoditter som kan infisere fisken ved at den fester seg på fisken med to antennepar, deretter med en kitintråd før den skifter skall og blir chalimus I. Chalimus stadiene henger forankret i kitintråden, spiser i hovedsak slimlag, hud og fiskevev inntil den skifter skall og blir preadult. De to preadulte stadiene samt adult stadiet kan bevege seg over hele fisken og spiser i hovedsak blod. Voksne hanner holder rundt preadulte hunners bakkropp, til hunnen blir kjønnsmoden og kan parre seg. Hunnen legger egg i to eggstrenger som henger fra kjønnssegmentet. En hunn kan lage opptil elleve par eggstrenger, hver med flere hundre egg etter en befruktning (4). Etter at eggene har klekket, frigis nauplier som sprer seg passivt med vannmassene. Strømningsforholdene vil derfor avgjøre hvor stort område de sprer seg over (4,11)

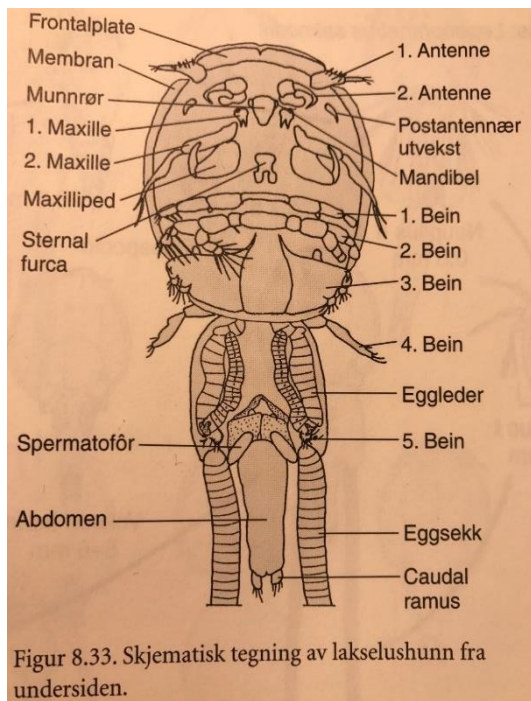


Figur 2. Lakselusens livssyklus (11)

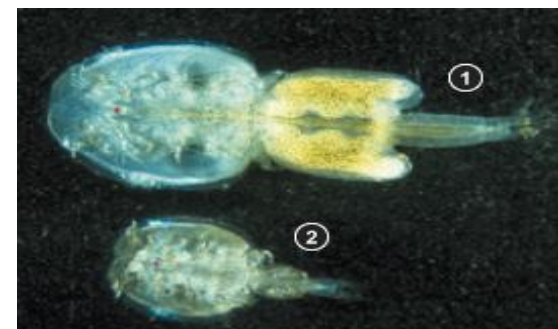
1.2.2 Lakselusens anatomi og biologi

Lakselusfamilien er kjennetegnet ved at hode, bryst og tre segmentene med bein er vokst sammen til et beskyttende skjold kalt cefalothorax. Skjoldet er kitinholdig og fungerer som en sugeskopp for bedre feste til fisken. Undersiden av skjoldet består av munnleder, griperedskaper (to antennepar og to maxillepar), og svømmebein. Hannlus modnes raskere enn hunnen og er mindre. Voksne hunnlus er omtrent dobbelt så store som voksne hannlus (4,11)

Figur 3-5 viser anatomisk forskjell av en voksen hunnlus sammenlignet med en voksen hannlus.



Figur 3. Skjematisk oversikt av lakselushunn fra undersiden (4)



Lakselus foretar syv skallskifter i løpet av livssyklusen, hvor to er i frittlevende stadier og fem i fastsittende stadier på fisken (12).

1.2.3 Vanntemperaturens påvirkning på utviklingshastigheten og spredningen av lakselus

Lakselusen er et vekselvarmt dyr og har derfor alltid samme temperatur som omgivelsene. Utviklingshastigheten for alle stadiene, inkludert eggproduksjon er avhengig av temperaturen i sjøen, hvor en høy temperatur resulterer i hurtigere utvikling (4,13). Jo varmere sjøtemperatur (opptil 15 °C), jo flere generasjoner lakselus kan utvikles per år og dermed øke lakselusens formeringspotensial. Lakesluslarvene spres imidlertid mest effektivt ved lave temperaturer. Samtidig vet vi at varmere vær kan øke ferskvannsavrenningen i fjordene våre, noe som øker spredningen av lakselusen (14). Ved sjøtemperaturer på 10 °C tar det henholdsvis 35 dager fra infeksjon av fisken til lusene er voksne mens ved 15 °C bruker lakselusen bare 18 dager til samme stadiet (14). For de frittlevende nauplius- og kopepodittlarvene er sesongstyrte endringer i sjøtemperaturen veldig viktige for utviklingshastigheten og dermed hvor lenge de potensielt kan overleve. Dette betyr at ved lave temperaturer i sjøen (vinter og vår) bruker de lengre tid på å nå det parasittære stadiet enn når vannet blir varmere (sommer og høst) hvor perioden fra klekking av egget til kopepodittstadiet er kort (16).

Undersøkelser viser at den lengste overlevelsen av infestjose larver ble funnet ved 7-10 °C. Ved 3 °C var det ingen produksjon av kopepoditter, og ved 5 °C var infeksjonssuksessen sterkt redusert (15). Utviklingen av eggproduksjon er også sterkt temperaturavhengig. En hunn som vokser opp ved 12°C kan lage 10 par eggstrenger før en hunn ved 7°C har laget en. Hunner kan leve i 140 dager, og det tyder på at de overvintrer på verten og forårsaker nye infeksjoner om våren (4).

Vertstetthet og temperatur påvirker smittepress av lakselus. Det er vist størst forekomst av lus i områder med høy produksjonstetthet av laksefisk. Høye sjøtemperaturer eskalerer utvikling av smittepress. Flere verter og høye temperaturer fører dermed til større smittepress både mellom oppdrettsfisk og mot ville laksefisk (7).

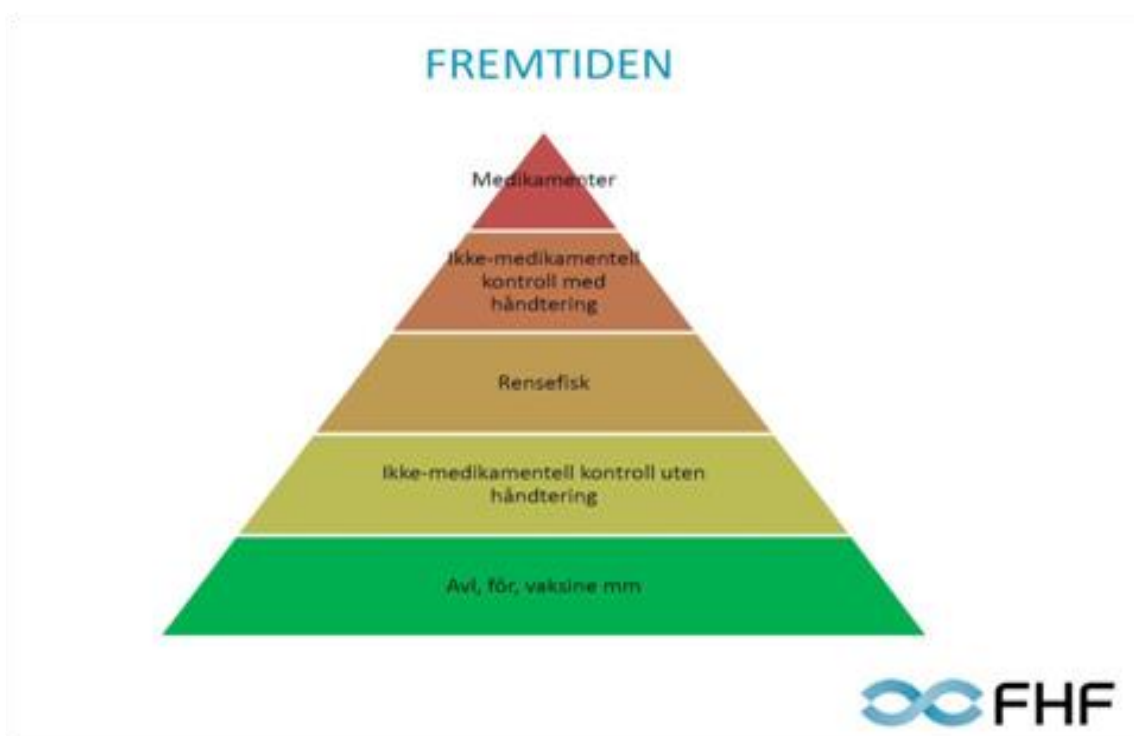
1.2.4 Lakselusens resistensutvikling

Resistens hos lakselus har vært kjent i Norge siden 1990-tallet, men begynte å bli et alvorlig problem rundt 2007. Resistens defineres som arvbar motstandsdyktighet mot ytre agens. Å være resistent betyr derfor at en organisme motstår behandling med et middel som tidligere har vært effektiv til å fjerne organismen. Utvikling av resistens kan skje hos alle sykdomsfremkallende organismer som et resultat av behandling. Resistensmekanismer hos lakselus kan blant annet være mutasjon i Na⁺-kanalen, hvor den cellulære transporten av legemiddelet er blokkert, økt produksjon av enzymer som inaktiverer legemiddelet og/eller mutasjon i et gen som koder for et enzym. Resultatet er at legemiddelets angrepspunkt endres. Denne genmutasjonen blir overført til neste generasjon, og blir derfor driver for resistens (23).

Hvis resistens hos lakselus først har oppstått i et område, vil den ofte komme fort tilbake dersom en på nytt starter behandling med et tidligere middel det har vært utviklet resistens imot. Flere studier har vist en betydelig økning i resistens mot eksisterende legemidler (18-22). I noen områder i Norge har lusepopulasjonene utviklet multiresistens (dobbel eller trippel resistens), altså overlever de behandling med to eller tre ulike legemidler. Konsekvensen av multiresistens i lakselusbestandene er at det blir stadig vanskeligere å begrense lakseluspopulasjonen på oppdrettsfisk som igjen medfører en kraftig økning i antallet lakselus. Dette vil igjen føre til store skader på både oppdretts- og villfisk med tap av villfiskpopulasjoner, og nedsatt produksjonsvolum i akvakultur som sannsynlige konsekvenser (17). Det er derfor viktig å utføre toksikologiske biossays resistenstester før man bestemmer seg for behandlingsmetode. Dette for å sikre at valgt behandling vil gi tilstrekkelig effekt (23)

Forskning viser at resistent lakselus er like vanlig på vill sjøørret som på oppdrettslaks. En genmutasjon som gjør lakselus resistent mot organofosfatsmidler er like vanlig i lus på vill sjøørret som i lus fra oppdrettsanlegg. Siden lus på villfisk ikke utsettes for avlusingsmidler, viser resultatene at store deler av lusene på vill sjøørret stammer fra oppdrettsanlegg. Dette indikerer at grunnen til at man finner så mye av mutasjoner på lus fra villfisk, er at oppdrettsfisk over tid har vært den dominerende kilden til lusesmitte i områder med mye oppdrett (24).

Utover resistensutviklingen står næringen overfor en rekke andre utfordringer, både økonomiske, miljømessige og relatert til fiskevelferd. For å løse dette har Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) opprettet en behandlingspyramide mot lakselus resistens. Figur 6 skisserer at fremtids lusekontroll i hovedsak skal skje ved forebygging og ikke-medikamentell behandling. Bruk av medikamenter skal begrenses (25). Det bør fokuseres på legemidler med mindre påvirkning på fiskehelse og miljø. Figur 6 skisserer at fremtidens lusekontroll skal i hovedsak skje ved forebygging og ikke medikamentell behandling, og at bruk av medikamenter skal begrenses (25).



Figur 6. Næringens behandlingspyramide viser ikke-medikamentelle metoder for forebygging og kontroll av lakselus (25)

I tillegg finnes en helhetlig behandlingsstrategi som er basert på prinsippene om « integrated pest management» (IMP) for å kunne kontrollere lakselusnivået. Dette omfatter forebygging, samt organisatorisk, biologisk og kjemisk kontroll. IMP forutsetter hensiktsmessig geografisk plassering av lokaliteter, koordinerte brakklegginger, koordinerte avlusninger med kjemiske, biologiske og mekaniske behandlinger. Formålet med en slik strategi er å redusere legemiddelbruk, resistensutvikling, miljøpåvirkning, samt å øke fiskevelferd (26).

1.2.5 Medikamentelle behandlingsmetoder

Legemidler til avlusning anvendes for å holde lusenivået under tiltaksgrensen. Felles for disse legemidlene er at de er mer toksiske for lakselusen enn for laksefisken, og det er kun et fåtall legemidler som virker mot, og som er godkjent for avlusning av laksefisk i Norge. Disse er angitt i tabell 1 under. Medikamentelle behandlingsmetoder foregår i hovedsak i to former som badebehandling og fôrbehandling.

Badebehandling er tilsetning av et legemiddel til det vannet som laksefisken oppholder seg i for å fjerne lakselus fra fisken. Badebehandling kan gjøres på to måter. Enten gjennomføres den med lukket presenning rundt merden. Fisken må da trenge for å redusere behandlingsvolumet. Alternativt så pumpes all fisken i merden over i en brønnbåt for behandling i lukket enhet med redusert vannvolum. Formålet med redusert vannvolum er at mengde legemiddel kan reduseres. Fôrbehandling er tilsetning av et legemiddel til det fôret som gis til fisken i merdene. Fôr tilsatt legemiddel gis normalt i een til to uker avhengig av blant annet sjøtemperatur og type legemiddel (27).

Tabell 1. Oversikt over legemiddelgruppe, preparatnavn og administrasjonsmetoder og virkningsmekanisme for godkjente legemidler til bekjempelse av lakselus. Tabellen er satt sammen med bakgrunn i SPC for de ulike avlusningsmidlene (28-34)

Legemiddelgruppe	Legemiddel	Preparatnavn	Administrasjon	Virkningsmekanisme
Avemectiner	Emamektin	Slice vet	Fôrbehandling	Aktiverer glutamat ionekanaler, påfølgende hemming av neuronet med paralyse til følge
Benzoyluraforbindelser	Diflubenzuron Teflubenzuron	Releeze vet. Ektobann vet	Fôrbehandling	Hemmer kintinsyntesen og forhindrer skallskiftet
Desinfeksjonsmidler	Hydrogenperoksid (H ₂ O ₂)	Nemona Paramove	Badebehandling	Ikke fullstendig klarlagt. Effekt antas å være etsing, og sprenging av lusens vevsstruktur når H ₂ O ₂ dissosiere til vann og O ₂ .
Organofosfater	Azametifos	Azasure	Badebehandling	Hemmer acetylkinolinesterase i kolinerge synapser, påfølgende lammelser
Pyretroider	Deltametrin Cypermetrin	Alpha Max Betamax vet.	Badebehandling	Hemmer signaloverføringen i nervesystem, påfølgende paralyse

1.2.6 Ikke medikamentelle behandlingsmetoder

Det eksisterer en rekke ikke-medikamentelle behandlingsmetoder. Hovedsaklig biologiske metoder (rensefisk) og mekaniske metoder som behandling med varmtvann og spyling med ferskvann, men også permaskjørt og planktonduk. Sistnevnte metode går ut på å strekke en presenning eller duk rundt de øverste delene av merden slik at mulighetene for at lakselus får feste seg på fisken begrenses.

Økt resistens mot flere av de eksisterende avlusningsmidlene, gjør at bruken av ikke-medikamentelle behandlinger øker. Antallet medikamentelle behandlinger gikk ned med 41 % fra 2015 til 2016. Antallet ikke-medikamentelle behandlinger derimot økte med 535 %, fra 185 behandlinger i 2015 til 1174 behandlinger i 2016. Ikke-medikamentelle-behandlinger krever mer håndtering av fisken som fører til at mer laks dør. Totalt sett er svignet på 20% av laks etter utsett i sjø, og dette svignet øker ytterligere ved bruk av ikke-medikamentelle mekaniske metoder som påvirker fiskevelferden.

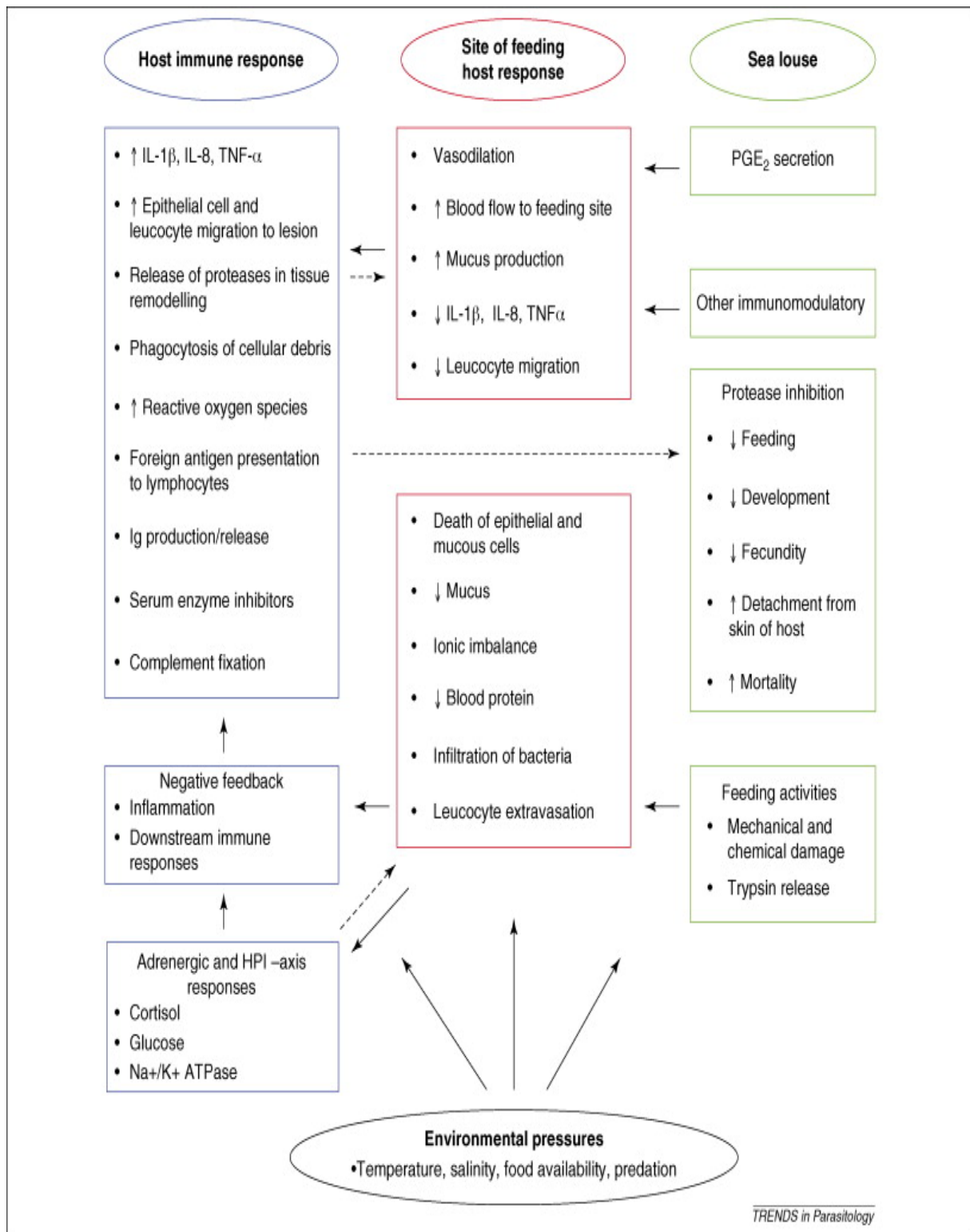
I en spørreundersøkelse som er offentliggjort av Veterinærinstituttet i 2016 oppgir 93% av fiskehelsepersonell at de opplever betydelig dødelighet ved ikke-medikamentelle avlusningsmetoder mens begrenset til 65% ved bruk av medikamentelle metoder. Dette indikerer at dødelighet ved ikke-medikamentelle behandlinger kan være høyere enn ved medikamentelle behandlinger (35).

Dagens behandlingsbilde viser utfordringer med økt resistensen mot allerede eksisterende medikamentelle behandlinger og negative innvirkning på fiskehelsen ved bruk av de mekaniske ikke-medikamentelle behandlingene. Det er tydelig et stort behov for effektive, skånsomme og miljøvennlige behandlingsalternativer i den norske oppdrettsbransjen. Dette gjenspeiles i stor aktivitet innen forskningsfeltet, og mens man venter på slike avlusningsmidler bør man i utgangspunktet ikke bruke en behandlingsmetode mer enn gang i løpet av en produksjonssyklus (36)

1.3 Fiskens immunrespons ved infeksjoner.

Immunforsvaret beskytter fisken mot skadelige patogener som virus, bakterier og parasitter. Forsvaret består av celler, molekyler og organer som sammen dreper eller inaktiverer patogenene. Fiskens hud og gjeller inneholder et varierende antall leukocytter, B-celler og plasmaceller. Om disse cellene kan stimuleres lokalt, er uvisst, men det er påvist at antigener kan tas opp over hud og gjelleepitel og trolig gi en lokal induksjon av antistoffrespons. Fiskens blod inneholder en rekke molekyler som inngår i immunmekanismene og dermed i immunforsvaret. Antistoffer og komplementfaktorer som inkluderer lektiner og C-reaktivt protein, har evne til å opsonisere (*proteiner fra immunsystemet binder seg til overflaten av mikroorganismer, og som på den måten fører til økt fagocytose. Dette fører til at bakteriene blir uskadeliggjort og er meget viktige i kroppens forsvar mot infeksjoner*) mikroorganismer. Andre molekyler som cytokiner fungerer ved å øke immuncellenes evne til å nøytralisere eller eliminere antigener (4). Laksens fysiologiske og immunologiske respons ved en lakselusinfeksjon, er angitt i figur 7.

Når lusen beiter på laksen, fører dette til både mekanisk og kjemisk skade. Dette fører til redusert epitel- og slimceller og blodsmolekyler. Denne negative feedback trykker immunrespons hos laksefisken ved å motvirke endringene som å gi økt oksygen, epitel- og immunceller. Videre reduserer lakselusens appetitt og utvikling, samt øker andelen lakselus som dør eller faller fra (37).



Figur 7. Oversikt over laksefiskens fysiologiske og immunologiske respons ved lakselusinfeksjon (37)

1.4 Seacalx

Seacalx er et gründerselskap, lokalisert i Bergen som utvikler og tilbyr bærekraftige og miljøvennlige kalsiumbaserte løsninger til oppdrettsnæringen. Første produkt er basert på partikulært brentkalk. Formål om å utvikle brentkalk til et avlusningsmiddel.

Ideen om å bruke partikulært brentkalk mot lakselus ble unnfanget av forskere på HI etter at de i 2013 startet et forsøk i Porsangerfjorden med brentkalk for å fjerne kråkeboller på havbunnen. Når brentkalk ble dosert på vannoverflaten, og partiklene sank mot bunnen, ble det observert at fisk svømte inn og ut av kalkskyen uten å ta skade. Brentkalk viste seg å være effektiv mot kråkeboller, og spørsmålet om brentkalk til behandling av lakselus dukket opp (38).

Innledende forsøk ved SLRC ved UiB, har vist at brentkalk er effektiv på lakselus i ulike stadier. Seacalx har den tiden fokusert på effekten på frittlevende stadier og har gjennom ulike *in-vitro* studier bekreftet denne effekten. Selskapet har også undersøkt virkningsmekanismen og utviklet nye hypoteser etterhvert som erfaringsdata fra SLRC har blitt tilgjengelig

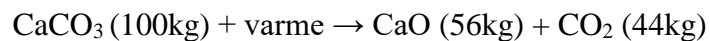
Seacalx er nå i gang med klinisk utprøving i felt, som er en viktig fase i utviklingen av et legemiddel.

Om brentkalk viser seg å være effektiv mot lakselus, kan dette være et nytt avlusningsmiddel som bidrag mot resistensproblematikk og miljøutfordringer, noe oppdrettsnæringen trenger.

1.5 Brentkalk

Kalkstein er en sedimentær bergart som hovedsakelig består av kalsiumkarbonat (CaCO_3). Ren kalk er hvit, men avhengig av hvilke andre mineraler som opptrer som forurensninger og mengden av disse, vil fargen variere fra gul, rød og grå til helt svart. Kalkstein dannes hovedsakelig i havet og er et produkt av døde koraller, snegler, muslinger, trilobitter, brachiopoder og alger (40).

Brentkalk (CaO) produseres ved brenning av knust kalkstein (CaCO_3). Under brenningen spaltes kalsiumkarbonatet og CO_2 frigjøres i en endoterm reaksjon:

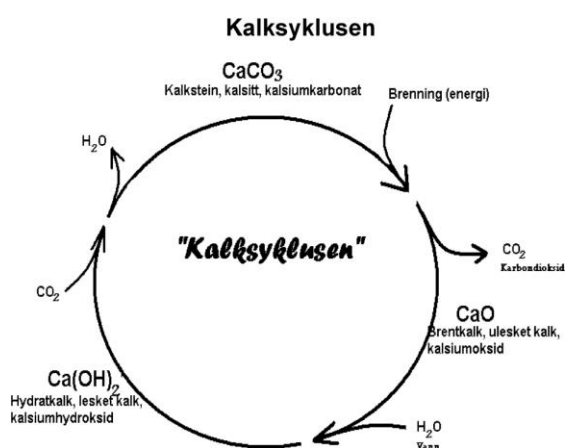


Når brent kalk reagerer med vann dannes kalsiumhydroksid (Ca(OH)_2), mens kalsiumhydroksid reagerer med CO_2 danner CaCO_3 (39). Ulike kvaliteter av brentkalk kan produseres utfra ulike egenskaper ved kalksteinen som brennes samt andre faktorer som styres under brenningen. Brentkalk i denne oppgaven er produsert fra kalkstein i Tromsdalen. Denne kjennetegnes ved at den er en svært ren forekomst med kalkinnhold over 98,5 %. På grunn av kalksteinens gode kvalitet er den velegnet til brentkalk og hydratkalk til mange viktige bruksområder i Norge. Brentkalk brukes til behandling av drikkevann, til kalking av forsuret vassdrag og elver, den brukes også som fasadeplater til produksjon av isolasjon og byggmaterialer (40).

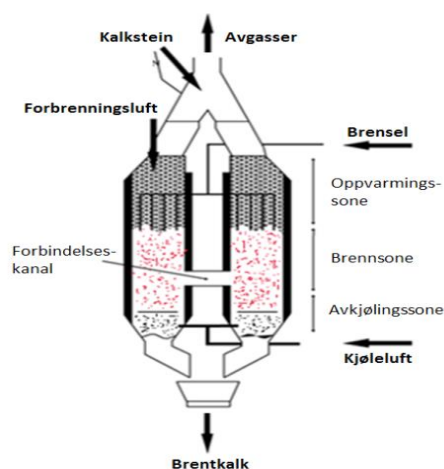
Brentkalk har lenge vært bruk i Japan, Canada og Stillehavet i California til å bekjempe forekomst av kråkeboller for å re-etablere tareskogen på havbunnen (38). Store deler av tareskogen i Nord-Norge ble nedbeitet av kråkeboller på 1970-tallet, og siden har vedvarende store bestander av kråkeboller opprettholdt en naken og artsfattig sjøbunn. Tareskogen er produktiv og artsrikk, og er derfor svært viktig for livet i kystsonen. Mange akvatiske organismer er avhengig av tareskogen for sin eksistens, og kråkeboller utgjør derfor en stor trussel for økosystemet. De siste årene har brentkalk vært bruk til å bekjempe kråkeboller i Porsangerfjorden med gode resultater. I områder som har vært nedbeitet i 40 år ble tareskogen re-etablert allerede et år etter behandling (38). Når brentkalk kommer i kontakt med vann oppstår det en kraftig pH-stigning som virker etsende på kråkebollenes overflate, og etser hull på membranen. Dette skaper et akutt osmoseproblem, som etter kort tid fører til død på grunn av sekundære infeksjoner. Behandlingen med brentkalk har vist seg artspesifikk, ettersom non-target organismer som krabber, fisk, skjell, snegler og hummer ikke affiseres (38,41,42)

1.5.1 Kalksyklusen

Kalksyklusen er betegnelsen på de prosessene som beskriver omdannelsen av kalkstein til brentkalk til hydratkalk og tilbake til kalkstein igjen (se figur 8). Brentkalk dannes når kalkstein brennes ved 1100-1200°C og det frigjøres CO₂ i en endoterm reaksjon (43). Kvaliteter som overflateareal og porøsitet av brentkalken er sterkt knyttet til kalsineringsprosessen. CO₂ frigjøres under kalsineringen gir en porøs struktur som lett reagerer med vann (61). Brentkalk er meget temperaturstabil, men reagerer raskt med vann og danner hydratkalk Ca(OH)₂ i en eksoterm reaksjon (43).



Figur 8. Kalksyklusen (44)



Figur 9. Brentkalkovn (46)

1.5.2 Produksjon av brentkalk

Seacalx benytter seg av partikulært brentkalk som er produsert av Franzefoss Minerals på Hylla i Trøndelag. Knust kalkstein brennes ved ca. 1100-1200 °C i brennsone i en tosjaktsovn (se figur 9). På veien ned til bunnen av ovnen kjøles kalksteinen ned til ca. 150°C før den slipper ut av ovnen. Det tar i underkant av et døgn fra kalksteinen går inn i toppen av ovnen til den kommer ut igjen som brentkalk i bunnen av ovnen. Den brente kalken knuses, siktes eller males videre til ønsket partikkelstørrelse (45).

QL-100-AF er arbeidsnavnet til Seacalx sitt fremtidige avlusningsmiddel. QL-100-AF har en spesifisering (spec) med definert krav til reaktivitet, partikkelstørrelse, kompleksometrisk titrering, potensiometrisk titrering, karbonanalyse og glødetap (vedlegg 1). Spesifikasjonen er bestemt ut fra tidligere erfaringsdata for effekt og sikkerhet. Brentkalk må produseres i henhold til de spesifikke kravene som oppfyller standarden for farmasøytisk tilvirkning av legemidler (Good Manufacturing Practice, GMP).

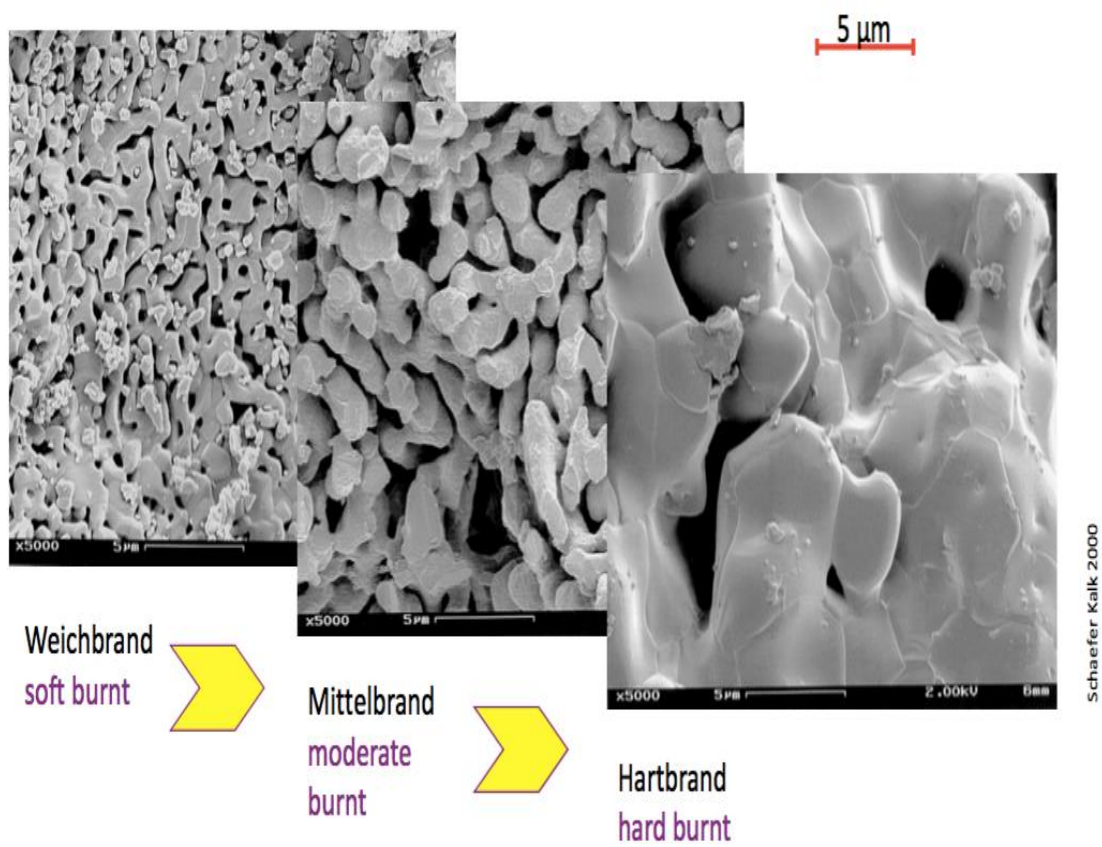
1.5.3 Kjemi og egenskaper

Brentkalk er et krystallinsk stoff, og er hvitt ved reneste form som inneholder rundt 95% CaO, urenheter kan gi mørkere farge på stoffet. Ulike egenskaper ved kalksteinen som brennes og faktorer under brenning fører til forskjellig type reaktivitet ved brennkalken. Brentkalk er stabil ved alle temperaturer men er reaktiv med vann, og er sterkt hydoskopisk, så luftfuktighet kan destabilisere effekt av brennkalk, under omdanning til $\text{Ca}(\text{OH})_2$. På grunn av kalsiumoksidens hydoskopiske egenskaper, er det veldig viktig brennkalken må pakkes i passende emballasje og håndteres på en slik måte at den ikke reduserer eller mister sin reaktivitet. Brentkalk må derfor oppbevares i full, lufttett emballasje, slik at stoffet ikke utsettes for luft (47,48).

Løseligheten til brennkalk i vann reduseres med økende temperatur. Oppløsningshastigheten til brennkalk påvirkes av flere faktorer som temperatur, partikkelstørrelse, reaktivitet, spesifikk overflate og tilstedeværelse av ioniserte salter (47).

Hydratiseringen av kalk er en kjedereaksjon. Når vann trenger inn i kalkpartiklens porer dannes det varme ved hydratisering. Denne varmen gir en ekspanderende kraft på innsiden av partiklene, noe som kan dele partikkelen i små biter og disse kan dermed reagere videre. Partikkelstørrelsen og brenngraden er viktige faktorer for reaktivitet. Liten partikkelstørrelse kombinert med en letbrent kalkkvalitet, vil gi en stor spesifikk overflate for vann å kunne reagere med, og dermed resultere i høy reaktivitet. Dette kan forklare at store partikler med hardbrent brennkalk (produseres ved høy temperatur, er mindre porøs og har høyere tetthet) er de mindre reaktive og hydratiseres langsomt i forhold til en porøs, letbrent brennkalk som vil være svært reaktiv (se figur 10).

Det er også observert en effekt som kalles drowning. Denne kan oppstå ved tilsetning en liten mengde brennkalk i store mengder av vann. Dette innebærer at overflaten av kalkpartiklene hydratiseres, og hindrer dermed vann å trenge inn i partiklene, noe som fører til reaksjonen stopper. Drowning er vanligst ved hardbrent og lite reaktiv kalk (47).



Figur 10. Oversikt over brentkalk i ulike brenngrader. Figur hentet fra schaefer kalk 2000.

1.5.4 Brentkalks reaktivitet, T₆₀-verdi

Reaktiviteten til brennkalk bestemmes i henhold til en standardisert kalorimetrisk metode, NS-EN 459-2:2010. Metoden måler tiden det tar å øke temperaturen fra 20°C i vannet til 60°C ved tilsetning av 150g brennkalken til 600g vann, og kalles T₆₀ (49). Metodens prosedyre er mer detaljert beskrevet mer under punkt 2.3 *måling av reaktivitet*. Seacalx benytter T₆₀-verdi opp til 180 sekund i legemiddel spesifikasjonen (vedlegg 1).

En best utnyttelse av kalken får man ved at mest mulig kalk er tilgjengelig for ønsket reaksjon. En rask reaksjon får man ved små partikler og lett brennkalk. Mettet løsning ved 0 °C være på 1,85 g/l (som hydratkalk) mot 0,77 g/l ved 100 °C. Leskeforsøkene som er utført på laboratoriet viser at kalken forandrer karakter ved lesking under varme temperaturer. Leskeresten blir observert mindre for alle prosessene der man enten har høy starttemperatur eller høy konsentrasjon. Forsøkene tyder på at lesking ved 50 - 60°C med en viss startkonsentrasjon kalk i blandingen kan være optimalt (50).

Leskingen skjer ved at vannet reagerer først på de områdene som er lettest tilgjengelig. Ved hydrering ekspanderer partikkelen og den sprekker opp, vannet finner da nye veier og lesker videre. Dette skjer inntil det ikke er mer brennkalk som kan reagere, og dette punktet finnes ved at temperaturen i systemet begynner å falle.

Dersom leskingen skjer for raskt (for lite vann), brennes brennkalk partikkelen og det dannes partikler med liten spesifikk overflate og store partikler. Ved en liten mengde brennkalk i store mengde av vann, drukner brennkalk partikkelen ved at det dannes et hardt skall av hydratkalk med en kjerne av brennkalk, denne hindrer dermed vann å trenge inn i partiklene, noe som fører til reaksjonen stopper (50). Dette kalles «Drowning» og er vanligst ved hardbrent og lite reaktiv kalk (47).

1.6 Bioassay

Bioassay (forkortet form av biologisk analyse) eller biologisk standardisering er en type vitenskapelig eksperiment som vanligvis utføres for å måle effekten av et stoff på en levende materiale (dyr, organer eller celler) test som måler effektene et stoff har på levende materiale (dyr, organer eller celler), og er viktig for utviklingen av nye stoffer og i overvåkning av miljøforurensende forbindelser. Det er to kategorier av disse testene. *In-vitro* tester bruker isolerte vev av levende materialer som for eksempel celler, og *In-vitro* tester bruker hele organismen (51,53).

Bioassays kan brukes til å estimere et stoffs styrke ved å observere farmakologiske effekter både *in-vitro* og *in vivo* og sammenligne effekten av disse stoffene med kjent styrke av en standard. Det kan være et nyttig verktøy i oppdagelse av biologisk aktive stoffer og har en viktig anvendelse for estimering av følsomhet og spesifisitet av farmakologiske applikasjoner (52).

Et bioassay ved behandling mot lakselus bør gjennomføres på grunnlag av sensitivitetsundersøkelse i populasjonen. Gjennomføring av bioassay krever innsamling av levende lus fra populasjonen som skal undersøkes, og en viss grad av kjennskap til fastsettelse av utviklingsstadier hos lusa. Bioassay går i korte trekk ut på å behandle lus med forskjellige konsentrasjoner, lese av behandlingseffekt og gjøre en kort statistisk beregning. Resultatet vil gi en indikasjon på populasjonens følsomhet for midlet det ble testet mot (60).

I dette tilfellet, et bioassay med brentkalk bestemmes følsomhet til ovenfor de frittlevende stadiene av lakselus for en bestemt dose av brentkalk med ulike partikkelstørrelser og reaktivitet, T_{60} -verdi.

1.7 Oppgavens formål

Dose og eksponeringstid med brentkalk i denne oppgaven er basert på resultater fra tidligere etablert dose-eksponeringstid-respons assay, hvor en behandlingstid på 10 minutter og dose på 0,3 gram viste å være effektiv på frittlevende stadier av Nauplia II. Det ble ikke differensiert på partikkelstørrelse eller reaktivitet i disse innledende bioassays, denne oppgavens formål er derfor å undersøke om virkningen av brentkalk på de frittlevende stadiene av lakselus har en sammenheng med partikkelstørrelse og reaktivitet, T_{60} .

Oppgavens formål består i to deler:

Del 1: Utføre sikteanalyse (kornfordeling) og måle reaktivitet, T_{60} -verdien av brentkalk

Del 2: Undersøke brentkalkens effekt på alle de frittlevende stadiene av lakselus, samt om virkningen har en sammenheng med partikkelstørrelse og reaktivitet, T_{60} -verdi.

2. Materiale og metode

2.1.1 Brentkalk

Tabell 2. Oversikt over brennkalk produkter brukt i forsøkene

Produkt nr.	Batchnummer	Produsent	Pakke dato	Reaktivitet, T ₆₀	Partikkelstørrelse
1	NFK 13.05.16 0,3 duk	NFK (NorFraKalk)	August 2016	34 sek	0.1 - 0.6 mm
2	Sekk 1965	VKA (Verdalskalk)	Januar 2018	64 sek	0.1 - 0.6 mm
3	Oppd-002469	VKA (Verdalskalk)	Januar 2018	97 sek	0.1 - 0.6 mm
4	Oppd-002468	VKA (Verdalskalk)	Januar 2018	177 sek	0.1 - 0.6 mm

2.1.2 Instrumenter og utstyr

Tabell 3. Oversikt over instrumenter og utstyr brukt for sikteanalyse og måling av reaktivitet, T₆₀

Analysering ble utført i Senter for farmasi, klinisk institutt 2, Laboratorium

Instrument	Produsent
Siktemaskin	Fritsch
Sikter	Fritsch
Analysevekt	OHAUS Traveler
Dewar termos, 1000 ml	Fritsch
Lokk til termos	Fritsch
Termometer (0 – 100 °C)	Fritsch
Rørepinne, diameter på 60 mm	Fritsch
Stativ for røreverk og termos	Fritsch
1000 ml Duran	Sigma-Aldrich

Tabell 4. Oversikt over instrumenter og utstyr brukt i *in-vitro* forsøkene i SLRC

Instrument	Produsent
Inkubator for lakselus	-
Lysmikroskop	Leica Stereo Microscope, Leica
Plastbeholder (500 ml)	SLRC
Micropipette, 1000 ml	Sigma-aldrich
Analysevekt	OHAUS Traveler

2.1.3 Analyseparameter og betingelser

Tabell 5. Oversikt over parameter og betingelser brukt i *in-vitro* forsøkene i SLRC

Analyseparameter	Spesifikasjoner
Partikkelstørrelse	< 0.15 mm 0.2 mm - 0.3 mm 0.4 mm - 0.6 mm
Reaktivitet, T60-verdien	T60 = 34 sek T60 = 97 sek T60 = 177 sek
Frittlevende stadiene til lakselus	Nauplia I Nauplia II, dag 2 Nauplia II, dag 4 Kopepoditt
Sjøvann	Temperatur: 10 °C pH : 8.0 Saltholdighet : 34.5 ppt
Antall larver	20-30
Konsentrasjon	1 larve/ 20 ml sjøvann
Behandlingstid	10 minutter
Dosering av brentkalk	0.3 gram

2.2 Sikting av brentkalk

Metoden er basert på Norsk Standard NS-EN 933.

Tabell 6. Oversikt over siktesatser i bruk ved sikting av brentkalk

Produkt	Prøvemengde	Sikter i mm	Amplitude	Intervall	Tid (min)
Brentkalk	250 g	0.1- 0.15 - 0.20 - 0.25 - 0.3 - 0.4 - 0.6 - 0.8	1.0	15	2

Det var fire batch av brentkalk med fire ulike reaktivitet ble valgt for sikteanalyse. To paralleller av hver batch ble analysert. Reaktiviteter var fra høyeste til minst reaktiv på følge 34 sek, 64 sek, 97 sek og 177 sek.

250 g av brentkalk ble veidd opp og tørrsiktet på siktemaskin med angitt sikter med rekkefølge at største sikt skulle være øverst av siktetårnet og minste sikt nederst. Siktemaskinen ble innstilt i henhold til tabell 7. Tomme sikter var veidd hver for seg og siktene med brentkalk ble montert på siktemaskin. Brentkalk på hver sikt ble veidd etter 2 minutter.

Alle mengder av Brentkalk på siktene ble summet og sammenlignet med totalvekt av brentkalk, dersom vekttap var mer enn 1% av den innveide massen måtte siktingen gjentas på nytt.

Tre aktuelle partikkelstørrelser i < 0.15 mm, 0.2 mm - 0.3 mm og 0.4 mm - 0.6 mm ble oppbevart i tette reagensrør i plast med lokk. Reagensrørene måtte være fulle av brentkalk, minst mulig luft tilsted i rørene for å bevare stoffets reaktivitet. De tre valgte partikkelgruppene av hver batch med 3 ulike reaktiviteter av brentkalk ble brukt videre til *in-vitro* forsøker hos SLRC. Dette med tanke på at det var lettere å kunne identifisere om virkningen av brentkalk hadde en sammenheng mellom reaktivitet og partikkelstørrelse.

2.3 Måling av reaktivitet, T₆₀

Metoden bygger på Norsk Standard NS-EN 459-2: 2010.

Formål med denne testen er å sjekke reaktiviteter, T₆₀-verdier mot T₆₀-verdier som var opplyst fra produsent Franzefoss Minerals. Dette er med tanke på at brentkalk blir knust under transportering, noe fører stoffet blir lett eksponert for luftfuktighet og får redusert sin effekt.

Måling av reaktivitet (og sikting av brentkalk) inngår i kvalitetskontrollplan som Seacalx setter krav for brentkalk sin spesifikasjonen (vedlegg 1).Reaktivitet inngår som en kvalitetsparameter.

Reaktivitet, T₆₀ til brentkalk bestemmes ved å måle temperaturøkningen som skjer ved reaksjonen med vann som en funksjon av tiden, og angis som tid det tar for å øke temperaturen fra 20⁰C til 60⁰C.



Figur 24. Dewarkar termos

Dewarkar termos ble fylt med 600 g DiH₂O med temperatur på 20 ± 0.5°C, og temperatur på 20 ± 0.2°C for farmasøytisk produkter *. Temperaturføler og rører satt inn i dewarkaret. Temperaturføleren satt ca. 160 mm ned fra øvre lokk. Rørehastighet var på 300 rpm ±10. Vanntemperatur var stabil før brentkalk ble tilsatt.

150 g av brentkalk ved temperatur 20 ± 1°C ** ble veidd inn, og tilsatt til dewarkaret. Tiden startet og satt på lokket med en gang. Tiden var avlest når temperaturen oppnådde 60°C. Denne T₆₀-verdien er reaktiviteten til brentkalk og er oppgitt i sek.

Det var fire batch av brentkalk ble målt av reaktivitet, T₆₀-verdier. Tre paralleller av hver batch ble målt.

*Før analyse av farmasøytiske produkter, skal termos kvalifiseres daglig og godkjennes i henhold til krav satt i NS-EN 459-2. Vannekvivalenter til termos skal bestemmes, hvor krav er 200-300 J/K. Kvalifisering av termos ble ikke utført i denne testen av reaktiviteten.

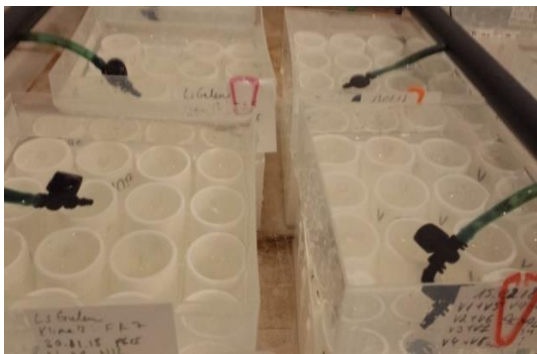
**Brentkalk ble innveidd ved romtemperatur ca.22°C, varmeskap var ikke tilgjengelig i laboratoriet.

2.4 *In-vitro* forsøk hos SLRC

2.4.1 Forsøksdyr

De tre frittlevende stadiene av lakselus, *L. salmonis* ble brukt i forsøkene var fra en sensitiv standardstamme, ikke resistent lusestamme. Lakselus ble klekket og fremavlet i inkubator hos SLRC.

Nauplia I var de larver som ble klekket ut første dag, og etter 30 timer skiftet de skall og ble til Nauplia II dag 2, så Nauplia II dag 4 (etter 4 dager). På dag 5 skiftet de skall og ble til kopepoditt. Det var disse tre stadiene av lakselus ble undersøkt i denne oppgaven.



Figur 11. Inkubatoroppsettet til klekking av eggtrenger i våtrom. Hvert oppsettet består av 16 nummererte kammer med planktonduk i bunn. Kamrene tilføres friskt sjøvann kontinuerlig.



Figur12.Brentkalk ble drysset over behandlingskar samt 4 små beholdere med friskt sjøvann klar til vasking av partikler.

2.4.2 Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.

Prosedyre er basert på Protokoll for DER-assay som ble utviklet etter pilotstudiene og pilotforsøkene (vedlegg 3).

Ca. 20 til 30 larver ble skånsomt overført til behandlingskar med 500 ml (88 cm² overflate) friskt sjøvann ved hjelp av mikropipette og batchnummer ble notert. Etter overføring fikk larvene to minutter til å akklimatisere seg med nytt miljø. Det ble sørget for lik lyssetting i behandlingskarene.

0.3 g av brentkalk ble innveid i eppendorfrør med lokk på analysevekt og ble rett etter drysset over behandlingskaret. Dette for å beregne tiden i kontakt med luft. Det ble startet ytterst, drysset i spiralform med klokken og avsluttet i sentrum av karet. Larvene ble overført til liten beholder med friskt sjøvannet etter 10 min. Slik ble larvene vasket fra partikler fire ganger via fire ulike beholdere med friskt sjøvann (se figur 12) Larvene ble vasket fra partikler og overført til respektive inkuberingskammer.

Det ble alltid brukt rene pipettespisser noe som var spesielt viktig med tanke på kontrollene. Det var også et mål å overføre færrest mulig partikler av brentkalk for å unngå eksponering.

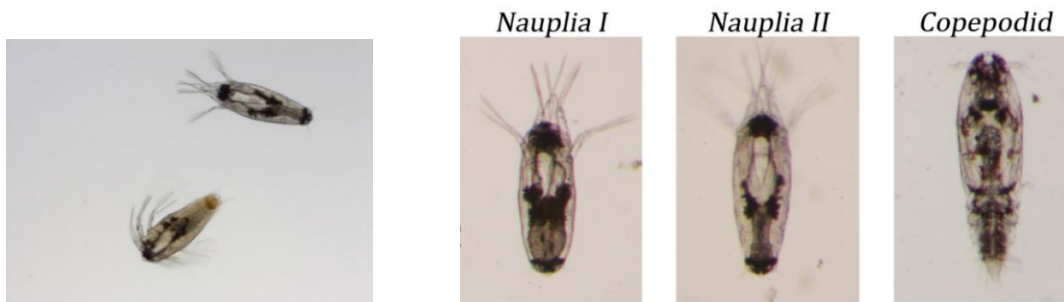
Larvene i kontrollene ble håndtert på samme måte som de behandlede gjennom hele forsøket. Når forsøket var ferdig ble larvene tilføres friskt sjøvann kontinuerlig. Larvene ble sjekket for overlevelse i lysmikroskop.

Langtidsoverlevelse ble studert og talt hver 24. time til endepunkt var oppnådd. Endepunkt for telling ble satt til når alle larvene enten var død eller var blitt til kopepoditter. Tellinger ble utført i lysmikroskop - Larver ble overført til petriskål, talt og sjekket nøye før de ble tilbakeført til inkubatoroppsettet.

Total ble det utført 36 forsøker, hvor det var fem paralleller og 1 kontroll inngått i hvert forsøk. Altså det ble 216 behandlinger utført ved in-vitro forsøk hos SLRC. Det tok ca. 30 minutter hver behandling.

2.4.3 Resultat tolking

Larvene ble klassifisert som levende (L) når larvene gjennomgikk skallskifte og ble til kopepoditt. Og larvene ble klassifisert som død eller forble Nauplia (D) når larvene ikke kunne utvikle seg videre til kopepoditt. Overlevelse ble dokumentert daglig.



Figur 13. Viser hvordan larvene ser ut, noe som kan lettere å identifiseres i mikroskop

Larven til venstre øverste viser en levende Nauplia II, og nedre er en død Nauplia II

2.4.4 Forsøksoppsett

Tabell 7. Oversikt over forsøksoppsett 1. Kombinasjon av den høyeste reaktiviteten på 34 sek med tre ulike partikkelstørrelser ble behandlet mot de tre frittlevende stadiene av lakselus

Reaktivitet, T ₆₀ (sek)	Partikkelstørrelse (mm)	Stadiene av lakselus	Behandlingstid (min)	Dose (g)
34	< 0.15	Nauplia I	10	0.3
34	< 0.15	Nauplia II dag 2	10	0.3
34	< 0.15	Nauplia II dag 4	10	0.3
34	< 0.15	Kopepoditt	10	0.3
34	0.2 - 0.3	Nauplia I	10	0.3
34	0.2 - 0.3	Nauplia II dag 2	10	0.3
34	0.2 - 0.3	Nauplia II dag 4	10	0.3
34	0.2 - 0.3	Kopepoditt	10	0.3
34	0.4 - 0.6	Nauplia I	10	0.3
34	0.4 - 0.6	Nauplia II dag 2	10	0.3
34	0.4 - 0.6	Nauplia II dag 4	10	0.3
34	0.4 - 0.6	Kopepoditt	10	0.3

Tabell 8. Oversikt over forsøksoppsett 2. Kombinasjon av den midterste reaktiviteten på 97 sek med tre ulike partikkelstørrelser ble behandlet mot de fire frittlevende stadiene av lakselus

Reaktivitet, T ₆₀ (sek)	Partikkelstørrelse (mm)	Stadiene av lakselus	Behandlingstid (min)	Dose (g)
97	< 0.15	Nauplia I	10	0.3
97	< 0.15	Nauplia II dag 2	10	0.3
97	< 0.15	Nauplia II dag 4	10	0.3
97	< 0.15	Kopepoditt	10	0.3
97	0.2 - 0.3	Nauplia I	10	0.3
97	0.2 - 0.3	Nauplia II dag 2	10	0.3
97	0.2 - 0.3	Nauplia II dag 4	10	0.3
97	0.2 - 0.3	Kopepoditt	10	0.3
97	0.4 - 0.6	Nauplia I	10	0.3
97	0.4 - 0.6	Nauplia II dag 2	10	0.3
97	0.4 - 0.6	Nauplia II dag 4	10	0.3
97	0.4 - 0.6	Kopepoditt	10	0.3

Tabell 9. Oversikt over forsøksoppsett 3. Kombinasjon av den minste reaktiviteten på 177 sek med tre ulike partikkelstørrelser ble behandlet mot de 4 frittlevende stadiene av lakselus

Reaktivitet, T ₆₀ (sek)	Partikkelstørrelse (mm)	Stadiene av lakselus	Behandlingstid (min)	Dose (g)
177	< 0.15	Nauplia I	10	0.3
177	< 0.15	Nauplia II dag 2	10	0.3
177	< 0.15	Nauplia II dag 4	10	0.3
177	< 0.15	Kopepoditt	10	0.3
177	0.2 - 0.3	Nauplia I	10	0.3
177	0.2 - 0.3	Nauplia II dag 2	10	0.3
177	0.2 - 0.3	Nauplia II dag 4	10	0.3
177	0.2 - 0.3	Kopepoditt	10	0.3
177	0.4 - 0.6	Nauplia I	10	0.3
177	0.4 - 0.6	Nauplia II dag 2	10	0.3
177	0.4 - 0.6	Nauplia II dag 4	10	0.3
177	0.4 - 0.6	Kopepoditt	10	0.3

2.4.5 Statistisk signifikans

T-test er en statistisk metode man bruker for å teste om det er signifikant forskjell mellom gjennomsnittet av to datasett. Når en t-test gjøres, blir det satt opp en nullhypotese: $H_0: \mu_1 = \mu_2$. Det sier altså at gjennomsnittet til de to datasettene er like. Denne nullhypotesen testes i t-testen. Dersom gjennomsnittet i dataene er like, ifølge t-testen, beholdes hypotesen. I motsatt fall forkastes hypotesen og sier at det er forskjell mellom de to datasettene. Forskjellen mellom dataene er statistisk signifikant.

Statistisk signifikans indikerer sannsynligheten for at den observerte forskjellen mellom datasettene skyldes tilfeldigheter. Når en hypotese skal forkastes eller ikke, må det velges et nivå for hvor stor forkastningsfeil villig til å akseptere. Det er vanlig å velge 5% signifikansnivå, $\alpha = 0,05$. Hvis nullhypotesen er riktig godtas 5% sjanse for å gjøre en forkastningsfeil.

P-verdien er sannsynligheten for at forskjellen mellom de to datasettene. Hvis $p < 0.05$ forkastes hypotesen => Signifikant, og det er sannsynlig at det er forskjell mellom to grupper, og at det ikke skyldes tilfeldigheter. Jo mindre p-verdien er, jo sikrere kan det være på at forskjellene ikke skyldes tilfeldigheter (54).

Til statistisk signifikans i denne oppgaven ble p-verdi bestemt ved hjelp av t-test funksjon i Excel (55,56). Dette ble benyttet til å undersøke forskjeller av brentkalks effekt fra ulike partikkelstørrelser og ulike stadier av lakselus. Sannsynligheten under t-testen i denne oppgaven ble valgt tosidig fordeling med to utvalg med lik varians.

3. Resultater

3.1 Sikting av Brentkalk

Tabell 10 viser at kornfordeling av alle de fire brentklak produktene ligger innenfor grenseverdi for legemiddel som Seacalx setter kravet i brentkalk sin spesifisering. Grenseverdi for partikkelstørrelse i spesifiseringen er 1, 10 og 30 vekt % i henholdsvis for ≥ 0.8 mm, ≥ 0.6 mm og ≤ 0.1 mm (vedlegg 1).

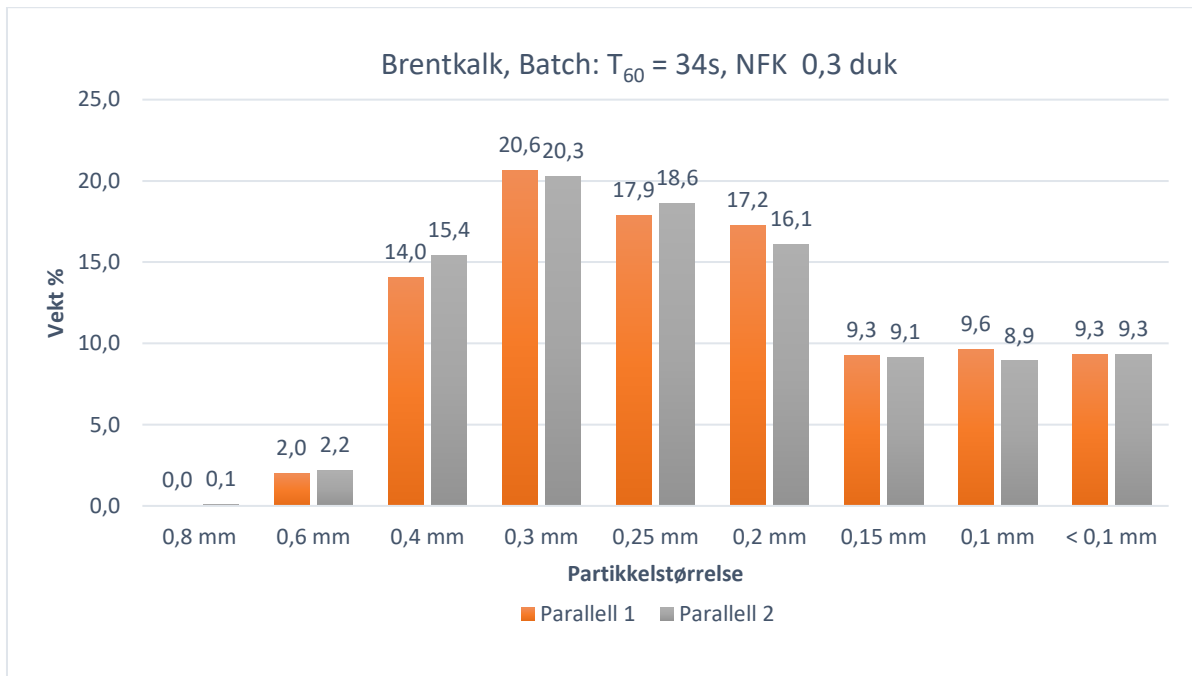
Tabell 10. Oversikt over mengde (vekt %) og standardavvik av brentkalk produkter som passerer siktåpning.

Resultater fra tabell 10 og figur (14-17) baserer seg på rådata fra vedlegg 3.

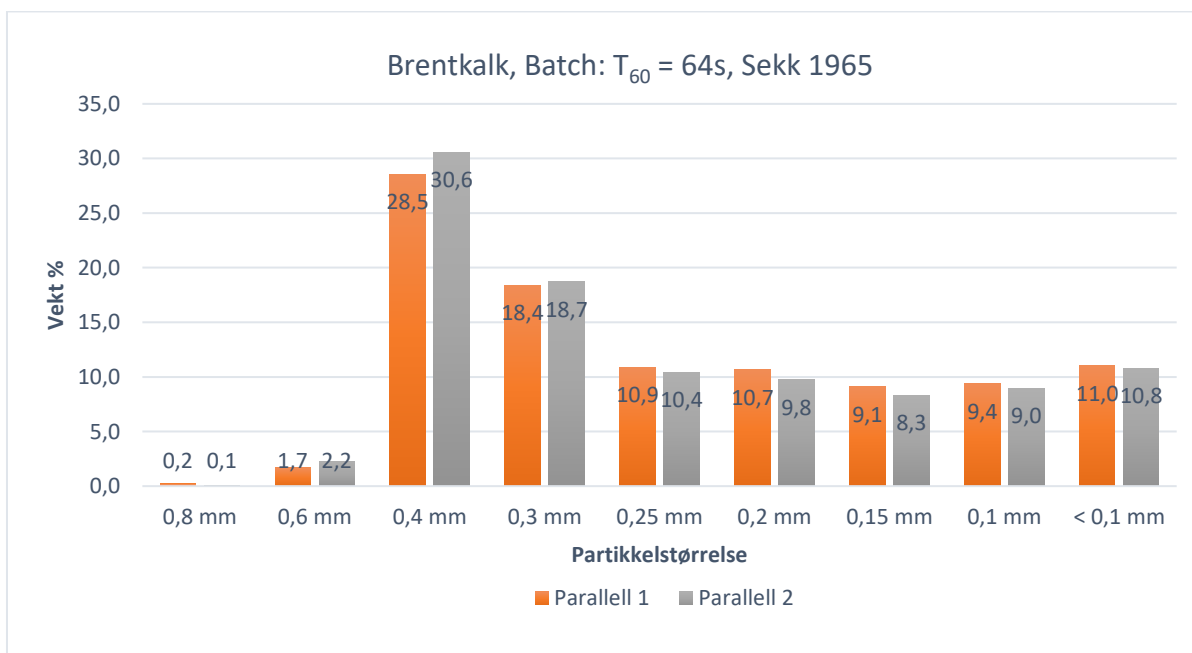
P 1= parallele 1; p 2 = parallele 2; Gj. = gjennomsnitt S = standardavvik

	Brentkalk, T ₆₀ = 34s NFK				Brentkalk, T ₆₀ = 64s Sekk 1965				Brentkalk, T ₆₀ = 97s Oppd-002469				Brentkalk, T ₆₀ = 177s Oppd-002468			
	Vekt %				Vekt %				Vekt %				Vekt %			
Partikkelstørrelse	p 1	p 2	Gj.	S	p 1	p 2	Gj.	S	p 1	p 2	Gj.	S	p 1	p 2	Gj.	S
0.8 mm	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
0.6 mm	2.0	2.2	2.1	0.1	1.7	2.2	2.0	0.4	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0
0.4 mm	14.0	15.4	14.7	1.0	28.5	30.6	29.6	1.4	4.9	5.1	5.0	0.1	7.7	8.4	8.1	0.5
0.3 mm	20.6	20.3	20.5	0.3	18.4	18.7	18.6	0.2	17.6	18.8	18.2	0.8	22.8	24.1	23.5	0.9
0.25 mm	17.9	18.6	18.3	0.5	10.9	10.4	10.7	0.3	17.0	16.5	16.8	0.4	17.1	17.0	17.1	0.1
0.2 mm	17.2	16.1	16.7	0.8	10.7	9.8	10.2	0.6	19.2	18.8	19.0	0.3	18.7	19.2	19.0	0.4
0.15 mm	9.3	9.1	9.2	0.1	9.1	8.3	8.7	0.6	15.6	15.4	15.5	0.1	14.2	13.2	13.2	0.7
0.1 mm	9.6	8.9	9.3	0.5	9.4	9.0	9.2	0.3	15.0	15.0	15.0	0.0	12.3	11.2	11.2	0.8
< 0.1 mm	9.3	9.3	9.3	0.0	11.0	10.8	10.9	0.2	10.5	10.3	10.4	0.1	7.0	6.6	6.8	0.2

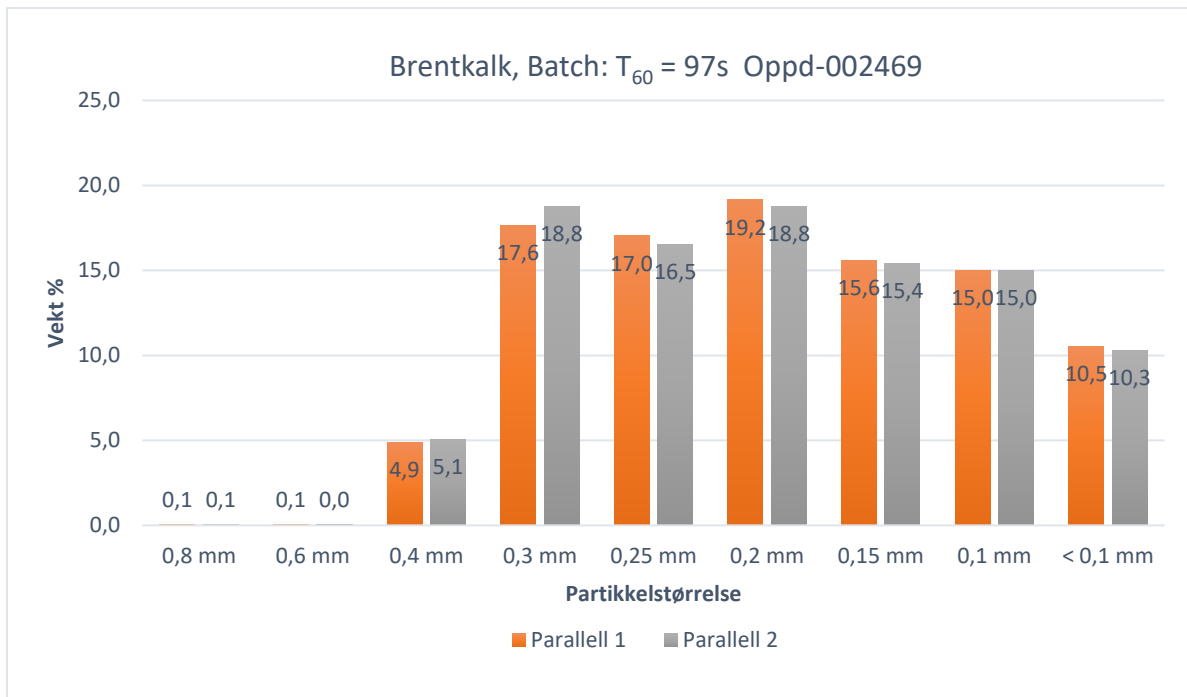
Figur 14-17 viser oversikt over siktnalyse av brentkalk med reaktivitet i henholdsvis på 34 sek, 64 sek, 97 sek og 177 sek. Diagrammer viser resultat av kornfraksjoner i vekt %. Det ble utført to paralleller for hver batch av brentkalk produkt. Sikter er fra 0.1 mm til 0.8 mm. Betingelser for sikting står i tabell 6.



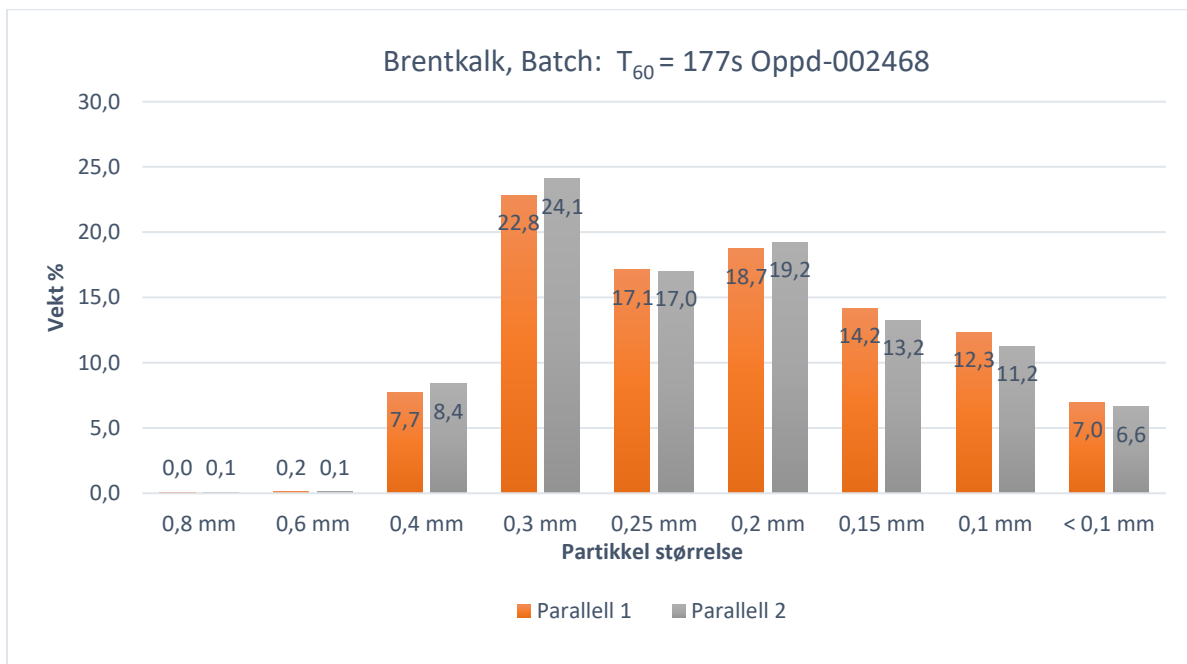
Figur 14



Figur 15



Figur 16.



Figur 17.

3.2 Måling av reaktivitet, T₆₀

Tabell 11 viser gjennomsnitt T₆₀-verdier av de fire brentkalk produktene. Det ble utført tre paralleller for hvert produkt.

Tabell 11. Oversikt over fire brentkalk produkter med opplyste reaktiviteter, samt resultat av nye reaktivitet, T₆₀ T₆₀ øker: antall sekunder avviker mellom den målte verdien og den opplyste T₆₀ -verdien fra batch (produsent).

Produkt nr.	Batch nummer		Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjen. T ₆₀ (sek)	T ₆₀ øker
1	T₆₀ = 34s NFK 0.3 duk	Innveid brentkalk ved romtemperatur (g)	150.0	150.1	150.1		
		Innveid destillert vann (g)	600.4 v/ 20.2 °C	600.2 v/ 20.1 °C	600.2 v/ 20.2 °C		
		Avlest T ₆₀ (sek)	133	131	133	132	98
2	T₆₀ = 64s Sekk 1965	Innveid brentkalk ved romtemperatur (g)	150.0	150.0	150.0		
		Innveid destillert vann (g)	600.2 v/ 20.1 °C	600.7 v/ 20.2 °C	600.4 v/ 19.8 °C		
		Avlest T ₆₀ (sek)	75	80	82	79	15
3	T₆₀ = 97s Oppd-002469	Innveid brentkalk ved romtemperatur (g)	150.0	150.1	150.1		
		Innveid destillert vann (g)	600.1 v/ 20.0 °C	600.2 v/ 20.1 °C	600.2 v/ 19.9 °C		
		Avlest T ₆₀ (sek)	100	99	102	100	3
4	T₆₀ = 177s Oppd-002468	Innveid brentkalk ved romtemperatur (g)	150.1	150.0	150.1		
		Innveid destillert vann (g)	600.0 v/ 20.2 °C	600.4 v/ 20.0 °C	600.4 v/ 20.0 °C		
		Avlest T ₆₀ (sek)	190	192	191	191	14

3.3 Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.

3.3.1 Undersøkelse om brentkalkens effekt har en sammenheng mellom reaktivitet og partikkelstørrelse

Tabell 12-14. Resultatene er basert på rådata fra 3 forsøksoppsettler fra vedlegg 4. Tabellene viser prosentgjennomsnitt (5-6 paralleller) og standardavvik for brentkalkens effekt (mortalitet) ved sammenhengen mellom de ulike reaktivitetene og partikkelstørrelsene. Figur 19-22 viser at mortalitet er sterkt knyttet til partikkelstørrelser. Resultatene bekrefter at effekten av brentkalk ved små partikler < 0.15 mm vil gi tilnærmet 100 %, 95 % ved mellomstore partikler og 80% ved store partikler på alle frittlevende stadiene av lakselus. Brentkalkens effekt reduserer med økende partikkelstørrelse.

Tabell 16a viser signifikante forskjeller av brentkalkens effekt på alle frittlevende stadiene av lakselus ved behandling med ulike partikkelstørrelsene.

Tabell 12: Gjennomsnitt av brentkalkens effekt i % med standardavvik fra forsøksoppsett 1.

Standardavvik ble beregnet ved hjelp av Excel.

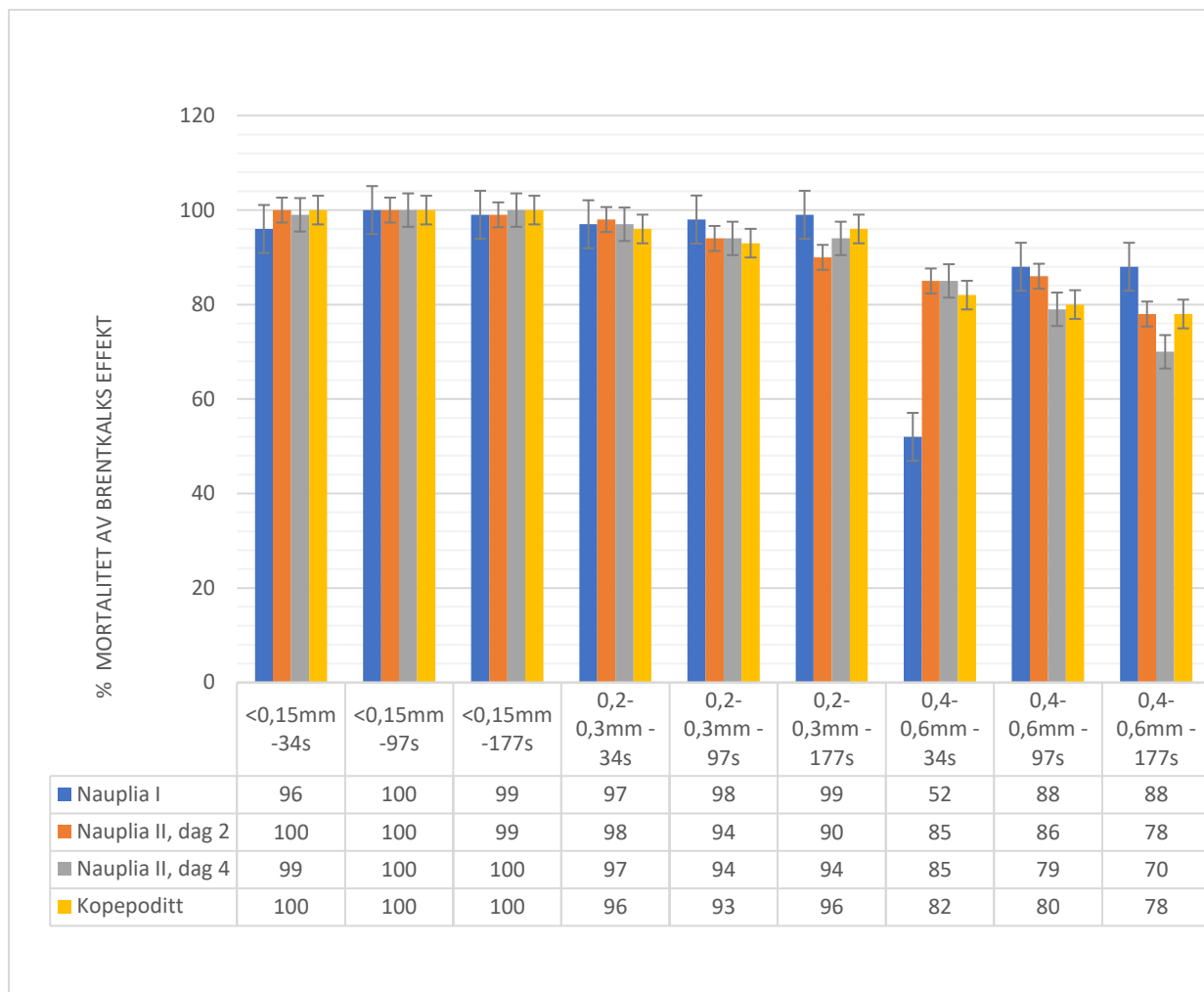
Reaktivitet-partikkelstørrelse	Frittlevende stadiene av lakselus	Gjennomsnitt Brentkalk effekt (%)	Standardavvik (%)
34 sek - < 0.15 mm	Nauplia I	96	4.1
34 sek - < 0.15 mm	Nauplia II dag 2	100	0.0
34 sek - < 0.15 mm	Nauplia II dag 4	99	1.5
34 sek - < 0.15 mm	Kopepoditt	100	0.0
34 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia I	97	2.3
34 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia II dag 2	98	2.9
34 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia II dag 4	97	2.3
34 sek – 0.2-0.3 mm	Kopepoditt	96	3.6
34 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia I	52	6.8
34 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia II dag 2	85	3.8
34 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia II dag 4	85	7.3
34 sek – 0.4-0.6 mm	Kopepoditt	82	7.2

Tabell 13: Gjennomsnitt for brentkalkens effekt med standardavvik fra forsøksoppsett 2.

Reaktivitet- Partikkelstørrelse	Frittlevende stadiene av lakselus	Gjennomsnitt Brentkalk effekt (%)	Standardavvik (%)
97 sek - < 0.15 mm	Nauplia I	100	0
97 sek - < 0.15 mm	Nauplia II dag 2	100	0
97 sek - < 0.15 mm	Nauplia II dag 4	100	0
97 sek - < 0.15 mm	Kopepoditt	100	0
97 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia I	98	2.7
97 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia II dag 2	94	2.3
97 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia II dag 4	94	4.2
97 sek – 0.2-0.3 mm	Kopepoditt	93	7.3
97 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia I	88	7.2
97 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia II dag 2	86	4.9
97 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia II dag 4	79	9.8
97 sek – 0.4-0.6 mm	Kopepoditt	80	6.1

Tabell 14: Gjennomsnitt for brentkalkens effekt med standardavvik fra forsøksoppsett 3.

Reaktivitet- Partikkelstørrelse	Frittlevende stadiene av lakselus	Gjennomsnitt Brentkalk effekt (%)	Standardavvik (%)
177 sek - < 0.15 mm	Nauplia I	99	1.9
177 sek - < 0.15 mm	Nauplia II dag 2	99	1.8
177 sek - < 0.15 mm	Nauplia II dag 4	99	1.8
177 sek - < 0.15 mm	Kopepoditt	100	0.0
177 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia I	99	1.6
177 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia II dag 2	90	4.7
177 sek – 0.2-0.3 mm	Nauplia II dag 4	94	7.6
177 sek – 0.2-0.3 mm	Kopepoditt	96	4.8
177 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia I	88	8.1
177 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia II dag 2	78	7.1
177 sek – 0.4-0.6 mm	Nauplia II dag 4	70	9.9
177 sek – 0.4-0.6 mm	Kopepoditt	78	5.2



Figur 18. Sammenligning av resultat av alle fire stadiene av lakselus ved sammenhengen mellom de ulike partikkelstørrelsene og reaktivitetene. Diagrammet viser mortalitet i %, samt standardavvik.

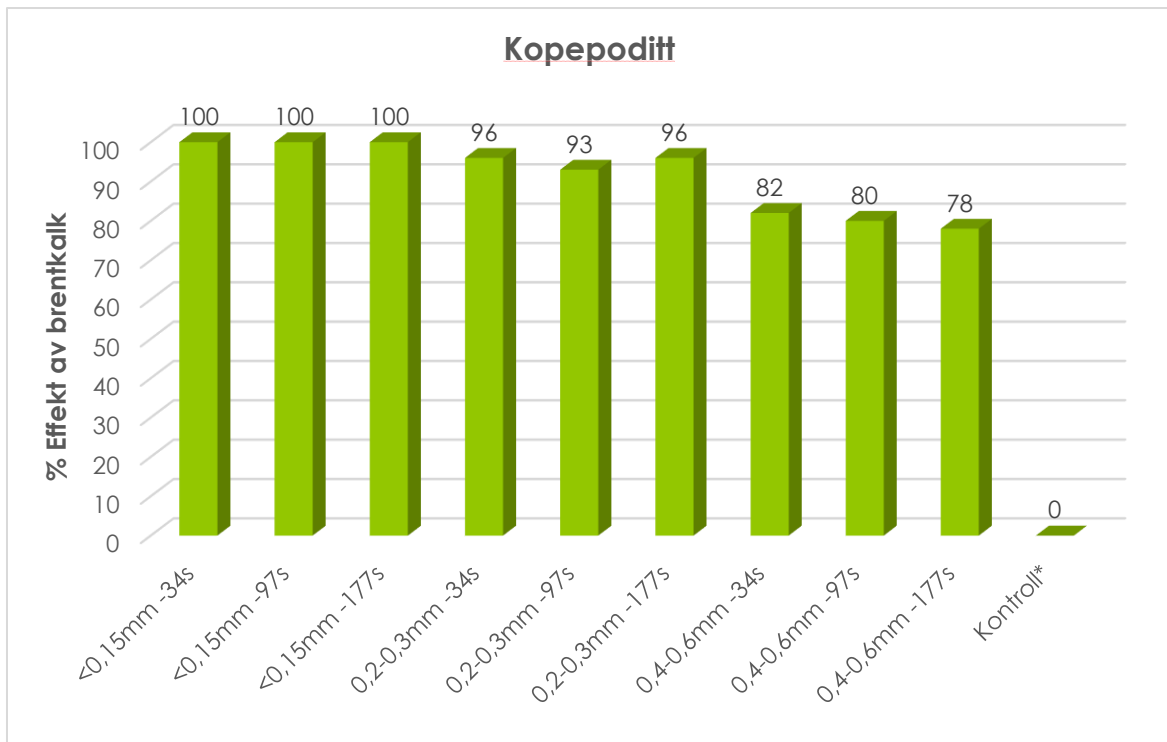
3.3.2 Undersøkelse av forskjeller i brentkalkens effekt mot alle frittlevende stadiene av lakselus.

Figur 18-22. Grafiske fremstilling er basert på data fra tabell 15. Figurene viser gjennomsnitt i % av brentkalks effekt på de fire stadiene ved sammenhengen mellom de partikkelstørrelse og reaktivitet. Resultat bekrefter tydelig at brentkalks effekt reduserer med økende partikkelstørrelse på alle de frittlevende stadiene av lakselus.

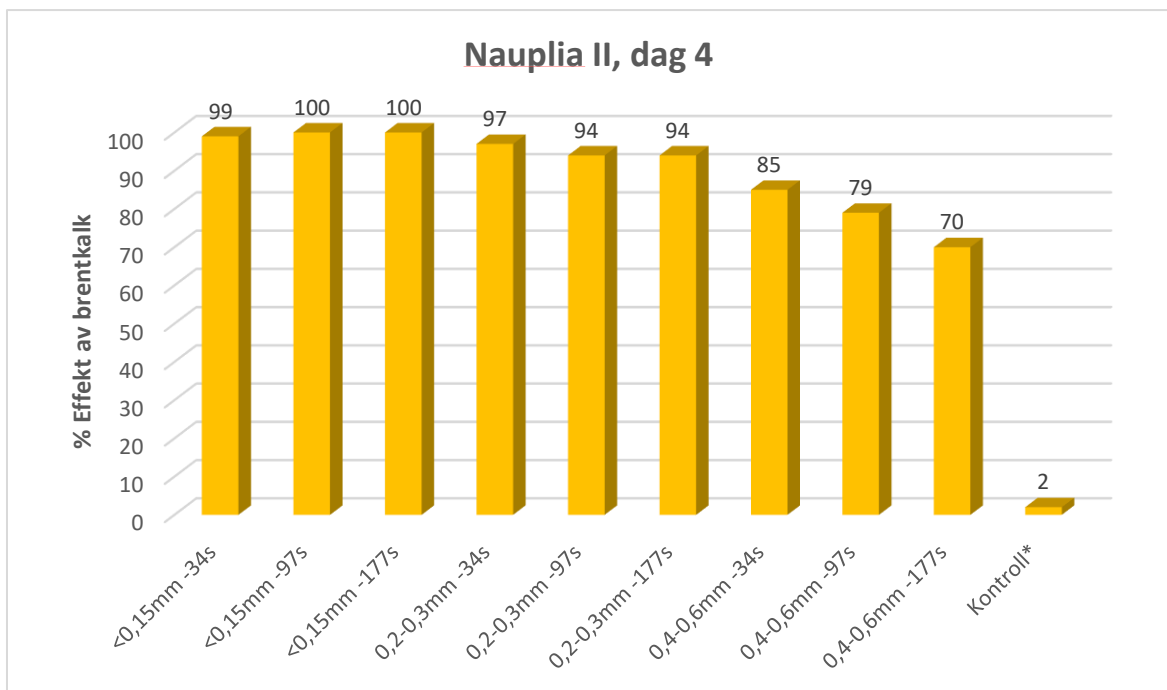
Brentkalk gir tilnærmet samme effekt (mortalitet) på alle fire frittlevende stadiene av lakselus. Det er ikke forskjell av brentkalks effekt på ulike stadiene av lakselus. Signifikant test viser i tabell 16b.

Tabell 15. Gjennomsnitt av brentkalks effekt og standardavvik for de fire stadiene av lakselus. Kontroll*: Prosentgjennomsnitt beregnet av 9 kontroller fra de 9 forsøkene for hvert stadie av lakselus. Det er 5-6 paralleller, samt 1 kontroll i hvert forsøk. Gjen.= gjennomsnitt S = standardavvik

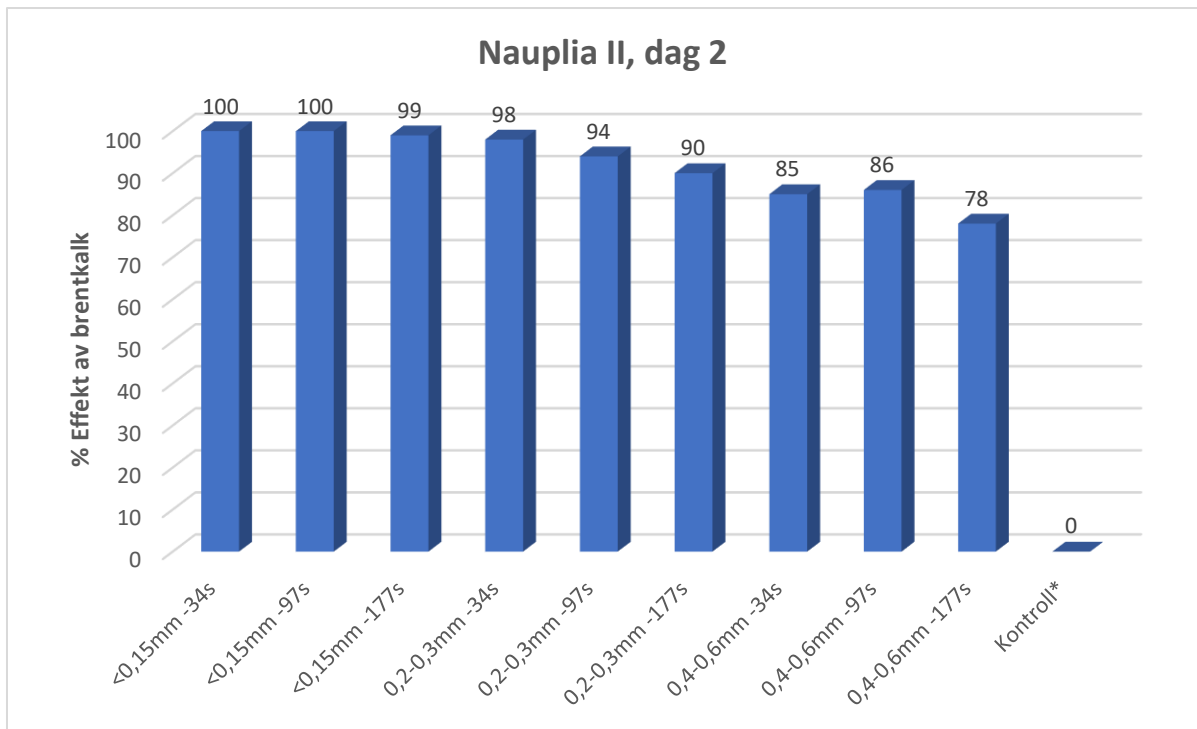
Reaktivitet-partikkelstørrelse	Kopepoditt		Nauplia II dag 4		Nauplia II dag 2		Nauplia I	
	Gjen. Brentkalks effekt (%)	S (%)	Gjen. Brentkalks effekt (%)	S (%)	Gjen. Brentkalks effekt (%)	S (%)	Gjen. Brentkalks effekt (%)	S (%)
34s <0.15 mm	100	0	99	1.5	100	0	96	4.1
97s <0.15 mm	100	0	100	0	100	0	100	0
177s <0.15 mm	100	0	100	1.8	99	1.8	99	1.9
34s - 0.2-0.3mm	96	3.6	97	2.3	98	2.9	97	2.3
97s - 0.2-0.3mm	93	7.3	94	4.2	94	2.3	98	2.7
177s -0.2-0.3mm	96	4.8	94	7.6	90	4.7	99	1.6
34s - 0.4-0.6mm	82	7.2	85	7.3	85	3.8	52	6.8
97s - 0.4-0.6mm	80	6.1	79	9.8	86	4.9	88	7.2
177s -0.4-0.6mm	78	5.2	70	9.9	78	7.1	88	8.1
Kontroll*	0		2		0		1	



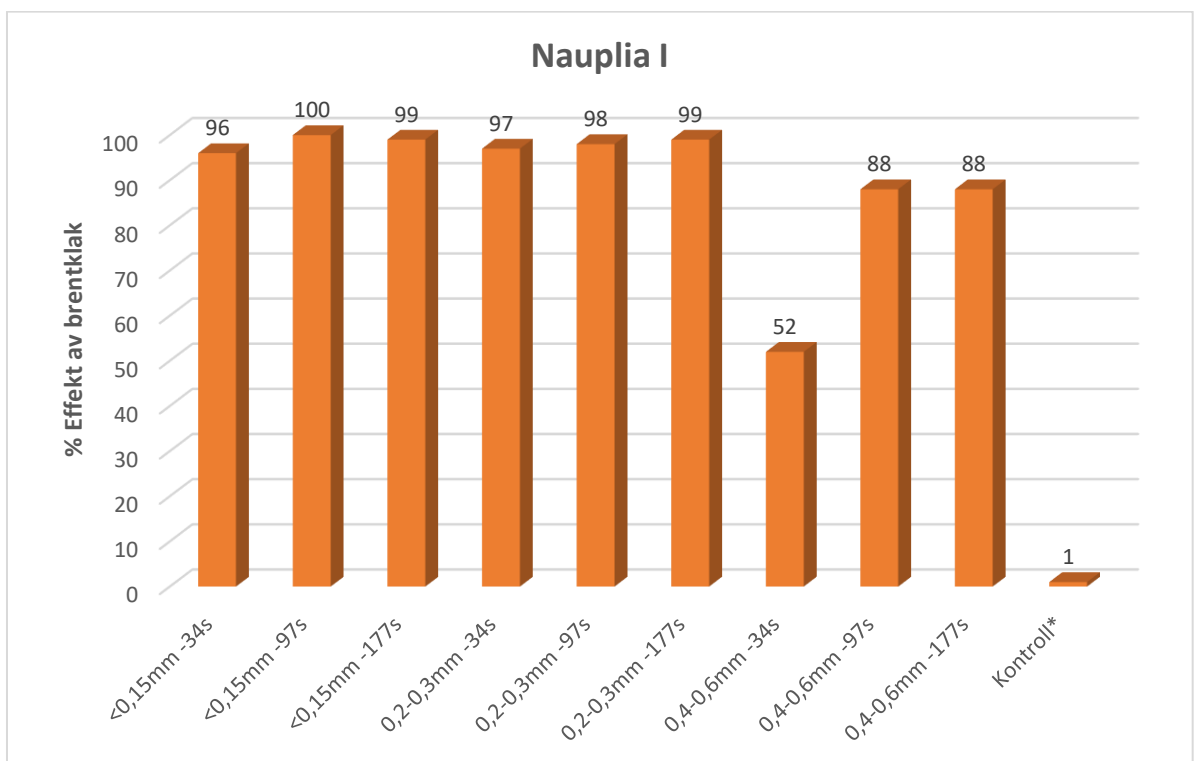
Figur 19.



Figur 20.



Figur 21.



Figur 22.

3.3.3 Statistisk signifikans

Tabell 16a. P-verdi bekrefter at det er signifikant forskjell mellom ulike partikkelstørrelser. Dette indikerer at partikkelstørrelser påvirker effekten av brentkalk.

Tabell 16b. P-verdi bekrefter at det ikke er forskjell virkningen av brentkalks effekt mellom ulike stadier av lakselus. Brentkalk påvirker likt mot alle de tre frittlevende stadiene av lakselus.

Tabell 16a og 16b. T-test utføres basert på to datasett, tosidig fordeling, og to utvalg med lik varians (54-56). Det blir valgt 5% signifikansnivå, $\alpha = 0.05$.

Datasettene for ulike partikkelstørrelser og ulike stadier av lakselus er hentet fra tabell 15.

Tabell 16 a.

Kopepoditt				
Reaktivitet-partikkelstørrelse	Gjennomsnitt Brentkalks effekt (%)		Sammenligning mellom to partikkelstørrelser	Signifikans
34s <0.15 mm	100	Datasett 1	Datasett 1 og Datasett 2	P = 0.007
97s <0.15 mm	100			
177s <0.15 mm	100			
34s - 0.2-0.3mm	96	Datasett 2	Datasett 2 og Datasett 3	P = 0.001
97s - 0.2-0.3mm	93			
177s -0.2-0.3mm	96			
34s - 0.4-0.6mm	82	Datasett 3	Datasett 1 og Datasett 3	P = 0.003
97s - 0.4-0.6mm	80			
177s -0.4-0.6mm	78			

Tabell 16b.

	Datasett 1 Kopepodiet	Datasett 2 Nauplia II dag 4	Datasett 3 Nauplia II dag 2	Datasett 4 Nauplia I		
Reaktivitet-partikkelstørrelse	Gjennoms. Brentkalks effekt (%)	Gjennoms. Brentkalks effekt (%)	Gjennoms. Brentkalk effekt (%)	Gjennoms. Brentkalks effekt (%)	Sammenligning mellom to stadier av lakselus	Signifikans
34s - <0.15 mm	100	99	100	96	Datasett1 & datasett2	P = 0,870
97s - <0.15 mm	100	100	100	100	Datasett1 & datasett3	P = 0.892
177s - <0.15 mm	100	100	99	99	Datasett1 & datasett4	P = 0.882
34s - 0.2-0.3mm	96	97	98	97	Datasett2 & datasett3	P = 0.766
97s - 0.2-0.3mm	93	94	94	98	Datasett2 & datasett4	P = 0.986
177s -0.2-0.3mm	96	94	90	99	Datasett3 & datasett4	P = 0.804
34s - 0.4-0.6mm	82	85	85	52		
97s - 0.4-0.6mm	80	79	86	88		
177s -0.4-0.6mm	78	70	78	88		

4. Diskusjon

4.1 Sikting av brentkalk

Det er to formål med denne analysen. Det første er å kontrollere partikkelstørrelser av brentkalk, ved å sjekke om kornfordeling av brentkalk ligger innenfor grenseverdi som Seacalx setter krav i spesifikasjonen (vedlegg 1). Det andre er å velge 3 aktuelle partikkelstørrelser (< 0.15 mm, 0.2-0.3 mm og 0.4-0.6 mm) som skal bruke videre til *In-vitro* forsøk hos SLRC.

Det er viktig at alle sikter skal visuelt kontrolleres på skader og tette hull. Sikter med skadet netting (løse tråder, mye rust) eller mange tette hull på større enn 5 prosent må kasseres. Disse kan gi rom for feilkilder, ved tørrsikting ved at finkornete partikler ligger igjen i siktene. Siktene som ble benyttet i denne sikteanalysen var nye, partikler passerte godt gjennom siktene, noe som antas å gi pålitelig resultater, og i dette tilfellet blir feilkildene mindre. Dessuten ble siktene behandlet skånsom ved å blåse brentkalk kornete som sitter igjen i siktåpninger med luftslange hver ny sikting.

Resultat ved sikting viser at den største andel av partikler er i partikkelstørrelse mellom 0.2-0.4 mm. Disse partikkelstørrelsene utgjør ca. 70 vekt % av produktet. Siden partikkelstørrelse er sterkt knyttet til brentkalks virkning på frittlevende stadier av lakselus, og små partikler gir tilnærmet 100% mortalitet, anbefaler Seacalx til å bruke ulike partikkelstørrelser ved feltforsøk.

Det er første gang at metoden blir brukt til å kvalitetskontrollere av kornfordeling. Tørrsikting av brentkalk i denne oppgaven ble utført manuelt. Anbefaling for stabilisering av metoden er å installere software slik at tørrsikting utføres som i metoden beskriver. Med beregning fra Software da unngår man feilkilde for lesing og beregning.

4.2 Måling av reaktivitet, T₆₀

Bestemmelse av reaktivitet er basert på 1 del brentkalk (150 g) til 4 deler destillert vann (600g), med følgende måling av temperaturøkning forårsaket av den eksoterme reaksjonen mellom vann og brentkalk. Temperaturøkning settes som funksjon mot tid for å nå 60 °C som kalles T₆₀. Viktige faktorer som påvirker resultat for reaktivitet av brentkalk er blant annet partikkelstørrelse og luft/fuktighet eksponering.

Produsent Franzfoss Minerals (Leverandør for brentkalk produkt) har testet produktets stabilitet etter luft-eksponering. Det viser at T₆₀-verdi øker fra 100 sek til 700 sek og videre til 1150 sek i henholdsvis 0, 1 og 5 døgn. Tilsvarende forsøk ble utført ved Sentrallaboratoriet FMI i 2012 med eksponeringstid opp til 183 dager (57). Metode kan avdekke lufteksponert brentkalk.

Seacalx har også utført reaktivitet stabilitet for brent kalk i en stabilitetsstudie (58). Brentkalk (QL-100-AF pulver) ble pakket inn i små sekker med 10 kg som består av en innersekk av PET-ALU-PE. Innersekkene lukkes av Nylon PA66 og merket med polypropylene-tetningsforsegling.

Tabell 17a og 17b viser resultat av stabilitetsstudeier av brentkalk (58)

Tabell 17a. Oppbevaringsbetingelser 25 °C ± 2°C / luftfuktighet 60% ±5%

Tidsintervall	Batch # MKA-QL-RE.VA-2017-003	Batch # MKA-QL-RE.VA-2017-004	Batch # MKA-QL-RE.VA-2017-005
Initial tid null	120	75	92
3 måneder	160	71	141

Tabell 17b. Oppbevaringsbetingelser 40 °C ± 2°C / luftfuktighet 75% ±5%

Tidsintervall	Batch # MKA-QL-RE.VA-2017-003	Batch # MKA-QL-RE.VA-2017-004	Batch # MKA-QL-RE.VA-2017-005
Initial tid null	120	75	92
1 måned	177	97	122
3 måneder	165	67	109

Tabell 11 viser avvik for reaktiviteten til batch 1, $T_{60} = 34$ sek. Dette produktet var pakket i august 2016 og var fra produsent NorFraKalk, mens tre andre produkter var pakket i januar 2018 og var fra Verdalskalk (se tabell 2). Produktet ble målt per 11.04.2018 på 132 sek hos Seacalx i forhold til 34 sek som er produktets opprinnelige reaktiviteten. Alle fire produktene ble beholdt i plastiske bokser. Boksene er fulle, tette. De ble åpnet samme tid og behandlet likt. Prøveintegriteten er ivaretatt, derfor vil ikke disse faktor være årsaken for eksponering. Sikteanalysen viser at batch brentkalk $T_{60}=34$ sek inneholder andel store partikler på 17 vekt% mens de tre andre batcher er på 5, 32 og 8%. Altså partikkelstørrelse er heller ikke årsaken til reaktivitets avvik for produktet 1. En forklaring kan være produktenes oppbevaring og produksjon. Tabell 2 viser produsent og pakkedato av produktet 1 skiller fra andre produktene. Produktet 1 ble produsert av produsent NFK for 2 år siden, og hadde stått på lagringsrom ved romtemperatur hos Seacalx inntil den ble tatt til brukt i denne undersøkelsen, mens de tre andre produktene ble produsert av Verdalskalk og ble pakket ca. en uke rett før de ble tatt til bruk i undersøkelse. I dette tilfellet kan eksponeringen skyldes oppbevaringstid, luftfuktighet og temperatur ved oppbevaring eller ulike kvalitet av brent kalk på grunn av ulike brenningsovn.

4.3 Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.

4.3.1 Undersøke om brentkalks effekt har en sammenheng med reaktivitet og partikkelstørrelse

Det ble tidlig vist at eksponeringstider i nærheten av hva som er reelt i felt burde velges. Samtidig måtte eksponeringstidene settes slik at både T_{60} -verdien og den eksoterme reaksjonen, dannelsen av kalsiumhydroksid, en svakt økning i pH og frigjøring kalsiumioner, da alle disse faktorene antas å kunne spille en rolle i virkningsmekanismen til brentkalk. Dosene ble valgt på grunnlag av å holde verdiene for de nevnte faktorene lavest mulig, men også med hensyn til hva som kan være reelt til feltforsøk.

Analyseparametere og betingelser brukte i *in-vitro* forsøkene er basert på gunstige og effektive resultatet fra tidligere *in-vitro* og karforsøk på frittlevende stadier av lakselusen. Det beste resultatet ble oppnådd ved eksponeringstiden på 10 minutter og dosen på 0.3 gram. Dette blir derfor valgt i denne undersøkelsen.

De tre partikkelstørrelsene og tre reaktivitetene blir valgt for å kunne dekke spesifikasjonen av brentkalk, samtidig gir det bra avstand mellom gruppene. Dette er for lettere å identifisere resultatene.

Forsøkene viser at den minste partikkelgruppen (< 0.15 mm) gir mest mortalitet, tilnærmet 100%, mens store partikler gir minst effekt av brentkalk. Effekten av brentkalk på frittlevende av lakselusen reduserer med økende partikkelstørrelse. Dette kan forklares ved at dosen som ble brukt til behandling i alle partikkelgrupper er 0.3 gram, dette gir ulike volum for ulike partikkelstørrelse. De store partiklene har mindre volum/dosen og synker hurtig til bunns, noe som gir mindre kontakttid eller partikkeltreff på lakselus. De små partiklene er derimot, de har større volum/dosen og dekker hele overflaten av behandlingsbeholderen. Dette gir økt kontakttid og partikkeltreff på lakselus, dermed gir økt mortalitet.

Det er stor gap mellom de praktiske forsøkene i laboratoriet til feltforsøk. Utfordringen i felt er at systemet ikke er lukket og man oppnår ikke vesentlig pH-økning. Drowning effekt kan også være betydelig ved dosering av brentkalk i feltet. Dette kan oppstå ved tilsetning en liten mengde brentkalk i store mengder av vann. Dette innebærer at overflaten av kalkpartiklene hydratiseres, og hindrer dermed vann å trenge inn i partiklene, noe som fører til reaksjonen stoppe opp (47, 50).

Ved direkte oppskalering av brentkalk-dosen brukte i *in-vitro* forsøkene vil være betydelig forskjell i mengde brentkalk doseret i feltforsøk utfra kubikkmeter i en merd kontra overflaten. Tabell 18 viser mengde brentkalk ved ulike doseringsregimer for eksempel i en firkantmerd på 20m x 20m i 10 meter dyp. Dosen brukte i forsøk er 0.30 g, og her ble det tatt med pluss og minus 0.05g.

Tabell 18. Mengde brentkalk trengs for oppskalering i feltforsøk for en firkantmerd på 20 m.20m i 10 meter dyp.

g/500 ml g/0.0063m²	Kg/m³	Mengde brentkalk (kg) ved volumdosering	Kg/m²	Mengde brentkalk (kg) ved overflatedosering
0.35	0.7	2800	0.056	22
0.30	0.6	2400	0.048	19
0.25	0.5	2000	0.040	16

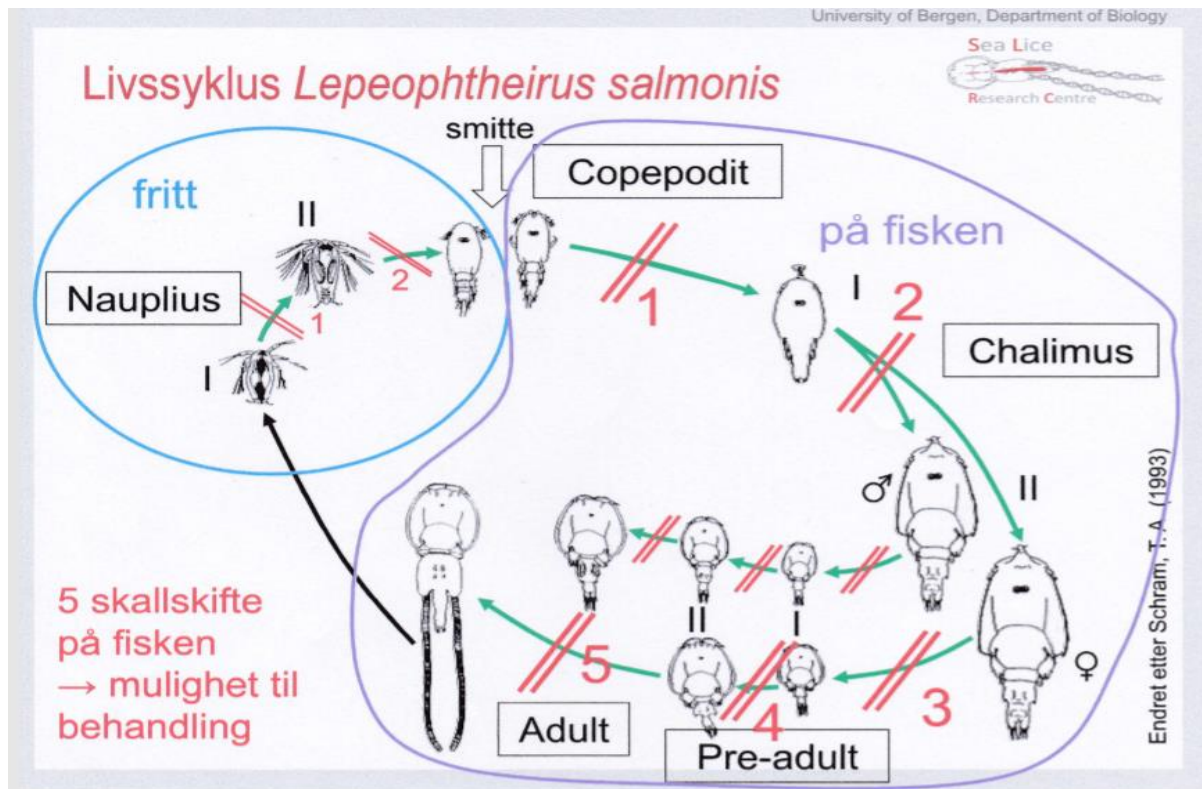
Det er signifikante forskjeller mellom de ulike partikkelstørrelsene (tabell 16a). Reaktivitet påvirker ikke brentkalks effekte på de frittlevende stadiene av lakselusen. Sammenhengen av reaktivitet vurderes utfra stolpediagram fra figur 18-22. Det var ikke nok data til å ta t-test for å finne om det er signifikante. For videre arbeid anbefales det å undersøke sammenhengen mellom reaktivitet og effekt ved å kunne sette opp forsøk som i tabell 7-9, med ombytting grupper av partikkelstørrelse og reaktivitet, det vil si at en partikkelstørrelse skal være fast i hvert forsøksoppsett og reaktiviteter er variabler. Vedlegg 5 viser det anbefalte forsøksoppsettet.

Behandlingsgrupper og kontrollgrupper er håndtert helt likt og kontrollene har nesten ikke dødelighet. Det ble utført 5-6 paralleller for hvert forsøk (vedlegg 4), dette har bidratt til å minimalisere usikkerhet. En svakhet ved denne metoden er at det gir stor variasjon av resultat mellom parallellene. Variasjoner kan skyldes forskjeller i larvenes aktivitetsnivå. Aktivitet varierer mellom ulike tidspunkt i utviklingsstadiet til larvene. For eksempel Nauplia I i forsøkene er fra stadiet noen timer etter klekking inntil 30 timer rett før skallskifte til Nauplia II dag 2. Tilsvarende skjer for Nauplia II og kopepoditt, og dermed kan dette være en feilkilde.

Det ble observert at overlevelser økte når larvene samlet i hjørne til behandlingkaret, igjen virker dette logisk at larvene reduseres sjanse for direkte partikkeltreff. Det ble også observert at ved behandling av store partikler ble en del av larvene påført til fysisk skader eller død som følge av partikkeltreff (partikler er større enn larver og ligget på larver i 10 minutter). På grunn av dette kan trolig mortalitet av brentkalk effekt ved behandling av store partikler være lavere enn det ble egentlig rapportert i forsøkene (35).

4.3.2 Undersøke forskjeller i brentkalks effekt mot alle frittlevende stadiene av lakselus.

En hypotese om at brentkalk har lavere effekt på Nauplia I enn Nauplia II og copepoditt (12). Det er fordi Nauplia I må gjennomgå 2 skallskifter for å bli til copepoditt. Stadier som har gjennomgått skallskifte er mer sårbar og dermed blir mer påvirket for brentkalk. Copepodittstadiet antas den gruppen som forventer høyeste mortalitet.



Figur 23. Oversikt over lakselusens skallskifte. Lusen er mer sårbar under skallskifte-mulighet til behandling (12).

Statistisk analyse viste ingen signifikante forskjeller av brentkalk effekt på ulike stadiene av lakselusen (tabell 16b). Mortalitet er tilnærmet samme på alle frittlevende stadiene, og dermed avkrefter det den ovennevnte hypotesen. Dette indikerer at brentkalks toksisitet påvirker tilnærmet likt alle frittlevende stadiene av lakselus uavhengig av larvenes aktivitetsnivå eller larvenes utviklingsstadium. Forsøket hvor Nauplia I ble behandlet med største partikkelgruppen på 0.4-0.6 mm og reaktivitet på 34 sek var spesielt (figur 18). Resultatet viser svært høy overlevelse i forhold til andre stadiene. På grunn av resultat forskjell fra andre grupper ble Nauplia I med reaktivitet på 34 sek behandlet på nytt (total ble det 3 forsøk retestet, hvor <0.15 mm-34 s, 0.2-0.3mm-97s og 0.4-0.6mm-177s). Retesting ble utført ca. 4 uker etter

den første testingen. Resultatet er det samme. Det viktig her er to tester i 2 forskjellige tidspunkter med 2 ulike batcher av Nauplia I (vedlegg 6).

Det har tidligere vært framsatt en hypotese om at Nauplia I har høyere overlevelse ved behandling av brentkalk (12), fordi Nauplia I ikke har gjennomgått skallskifter, noe som gjør at larver er mer motstandsdyktig.

Høy overlevelse av Nauplia I ved behandling med den største partikkelstørrelsen og raskeste reaktiviteten kan forklares med at larvene er nyklekket og aktivitetsnivået er høyt, noe som gjør at de holder seg under vannoverflaten eller samler seg i et hjørne i behandlingskaret (dette ble observert) under behandling. Årsaken kan være at store partikler synker hurtig til bunnen, kombinerer med rask reaktivitet skjer fort, dette fører til redusert partikkeltreff og kontaktid mellom larvene og den eksoterme reaksjonen.

5. Konklusjon

Målet for denne oppgaven er å undersøke brentkalks effekt på frittlevende stadier av lakselus, og om virkningen har en sammenheng med partikkelstørrelse og reaktivitet. Kornstørrelsesfordeling ble derfor bestemt slik at 3 ulike partikkelstørrelser brukes videre til *in-vitro* forsøk. Sikting av brentkalk metoden er basert på Norsk Standard NS-EN 933 og viste seg å være tilstrekkelig reproduserbar. Kornfordeling av alle de fire brentkalk produktene ligger innenfor grenseverdi for legemiddel som Seacalx setter i spesifikasjonen.

Måling av reaktivitet er en av analyseparametere for batchkontroll brentkalk. Reaktiviteten for brentkalk fra produsent NFK ble målt til 132 sek i forhold til reaktivitet på 34 sek målt av produsent. Denne endringen er sannsynligvis relatert til emballasje og oppbevaringsbetingelser. Viktige faktorer som påvirker reaktivitet av brentkalk er blant annet partikkelstørrelse og eksponering for luft/fuktighet.

De minste partiklene (< 0.15 mm) gir tilnærmet 100% mortalitet. Effekten av brentkalk på frittlevende av lakselus reduserer med økende partikkelstørrelse. Dette indikerer at størrelsen av partiklene har altså betyr mot mobile stadiene av lakselusen. Reaktiviteten påvirker ikke brentkalkens effekten på bevegelige stadiene av lakselusen.

Det ble ikke påvist signifikante forskjeller av brentkalks effekt på de ulike frittlevende stadiene av lakselusen. Mortalitet er tilnærmet samme på alle de frittlevende stadiene. Dette indikerer at brentkalks toksisitet påvirker tilnærmet likt alle frittlevende stadier av lakselus uavhengig av larvenes aktivitetsnivå, larvenes mobile stadium.

6. Videre arbeid

Effekten av brentkalk i denne oppgaven øker med reduserende partikkelstørrelse, mens reaktiviteten ikke påvirker brentkalks effekten på de tre frittlevende stadiene av lakselusen. For å bli sikrere på at virkningen av brentkalk har en sammenheng med reaktiviteten trengs flere forsøk for å kunne konkludere. Vedlegg 5 viser det anbefalte forsøksoppsettet for videre arbeid.

Brentkalks reaktivitet blir lett eksponert av luft/fuktighet og redusert eller mistet sin effekten. Det er derfor viktig å undersøke stabilitet av brentkalk ved ulike forhold, blant annet emballasjemateriale, transport og oppbevaringsbetingelser som temperatur, fuktighet og varighet. Slike undersøkelser kan dokumentere holdbarhet av brentkalk som et avlusningsmiddel

Undersøkelse om brentkalks toksisitet påvirker akvatisk liv. Virkningsmekanismen til brentkalk bør fokuseres. Slike studier etablerer kvaliteten til et legemiddel og er viktig for markedsføringstillatelse.

7. Referanser

1. Oppdrettsnæringen årsak til mangedobling av lakselus ;Publisert 03.12.2015 av Miljødirektoratet [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <http://www.miljostatus.no/tema/ferskvann/laks/lakselus/>
2. Hallenstvedt A. Fiskeoppdrett, historikk: Store Norsk Leksikon juni 2015 [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <https://snl.no/fiskeoppdrett>
3. Fiskeoppdrett- en næring i vekst, rømt oppdrettsfisk ; Publisert 29.10.2015 av Miljødirektoratet [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <http://www.miljostatus.no/Tema/Hav-og-kyst/Fiskeoppdrett/>
4. Poppe T (Red), Bergh Ø, Espenlid S, Nygaard S, Fiskehelse og fiskesykdommer. Oslo: Universitetsforlaget AS 1999, 2. opplag 2002
5. Fakta ark om helhetlig bekjempelsesstrategi mot lakselus: Dr. Randi Nygaard Grøntvedt <http://www.fiskerifond.no/files/projects/attach/lakselus-helhetlig-bekjempelse-2009-10.pdf> [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: file:///C:/Users/Rosine%20Nguyen/AppData/Local/Packages/Microsoft.MicrosoftEdge_8wekyb3d8bbwe/TempState/Downloads/Grontvedtproduksjonsbiologi.pdf
6. Statistisk sentralbyrå, Publisert: 2. juni 2016 [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-forelopige/2016-06-02>
7. Veterinærinstituttet OSLO, Forekomst , spredning av lakses [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/lakselus>
8. Folkehelseinstituttet ,PUBLISERT 06.03.2018[Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nyheter/2018/legemidler-mot-lakselus-kraftig-redusert-i-2017/>
9. Mekanisk avlusning, Nodland E. sep. 2016 [Hentet: 26.03.2018] Tilgjengelig fra: <https://ilaks.no/mekanisk-avlusning-har-kommet-for-a-bli/>
10. Hamre LA, Eichner C, Caipang CMA, Dalvin ST, Bron JE, Nilsen F, et al. The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. 2013 [Hentet: 29.03.2018] Tilgjengelig fra: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0073539>
11. MSD Animals health. Lakselus [Hentet: 28.03.2018] Tilgjengelig fra: <http://www.msd-animal-health.no/akvakultur/Lakselus/Om-lakselus.aspx>
12. Sea Lice Research Center, Hvordan lakselusen vokser og skifter skall. Betydning for effektivitet i bruk av ulike avlusningsmetoder [Hentet: 13.05.2018] Tilgjengelig fra: <https://slrc.w.uib.no/files/2013/07/Hvordan-lakselusen-vokser.pdf>
13. Eichner C, Hamre LA, Nilsen F. Instar growth and molt increments in *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) chalimus larvae. *Parasitology International*. 2015 [Hentet: 28.03.2018] Tilgjengelig fra: <http://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/10496/1-s2.0-S1383576914001421-main.pdf?sequence=4>

14. Dalvin S. og Johnsen. I. Havforskningsinstituttet 2016 Vanntemperatur avgjør lakse lusens utvikling [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: https://www.hi.no/filarkiv/2015/03/vanntemperatur_avgor_lakselusen_sin_utvikling.pdf/nb-no
15. Dalvin s. Temperaturen innflytelse på lakseluslarver. Sluttrapport FHF-prosjekt 901073. Havforskningsinstitutt 2016 [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2408806>
16. Bergh Ø. Ingvaldsen R. Mork K. A. Energi og klima. et varmere klima påvirke spredningen av lakselus 2012 [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://energiogklima.no/to-grader/fiskeoppdrett-i-varmere-hav/>
17. Dalvin. S, Mauritzen. R, Espedal PG. Havforskning. Resistens og lakselus [Hentet 01.04.18]. Tilgjengelig fra: https://www.imr.no/filarkiv/2010/04/resistens_og_lakselus_akvakultur_.pdf/nb-no
18. Helgesen KO, Bakke MJ, Kaur K, Horsberg TE. Increased catalase activity-A possible resistance mechanism in hydrogen peroxide resistant salmon lice (Lepeophtheirus salmonis). Aquaculture. 2017;468:135-40. [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848616306457>
19. Kaur K, Helgesen K, Bakke M, Horsberg T. Mechanism behind Resistance against the Organophosphate Azamethiphos in Salmon Lice 2015;10(4). [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124220>
20. K Kaur, F Besnier, K Glover, F Nilsen, VT Aspehaug, H Børretzen Fjørtoft, TE Horsberg. The mechanism (Phe362Tyr mutation) behind resistance in Lepeophtheirus salmonis pre-dates organophosphate use in salmon farming. Scientific Reports 2017; 7: 12349, September 2017 [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-12384-6>
21. Aaen SM, Helgesen KO, Bakke MJ, Kaur K, Horsberg TE. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. Trends in Parasitology. 2015. [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492214002098>
22. Espedal PG, Glover KA, Horsberg TE, Nilsen F. Emamectin benzoate resistance and fitness in laboratory reared salmon lice (Lepeophtheirus salmonis). Aquaculture. 2013 [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3691771/>
23. Helgesen. KO, Norge miljø- og biovitenskapelige universitet 2017 [Hentet: 02.04.2018] Tilgjengelig fra: <https://www.nmbu.no/forskning/disputaser/pressemeldinger/disputaser-2015/node/22713>
24. Havforskningsinstituttet ,NTNU i Ålesund, Sea Lice Research Centre ved UiB, PatoGen AS, NINA og Resistent lakselus er like vanlig på vill sjørørret som på oppdrettslaks 2017 [Hentet: 01.04.2018] Tilgjengelig fra: https://www.imr.no/nyhetsarkiv/2017/november/resistent_lakselus_er_like_vanlig_pa_vill_sjororret_som_oppdrettslaks/nb-no
25. Nærings- og Fiskeridepartementet. Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus legemidlemot lakselus 2017 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: https://www.regjeringen.no/contentassets/bac8a85fb17145939d38ce038130ce0e/w-0016_handlingsplan-mot-resistens-mot-legemidler-mot-lakselus.pdf

26. Norsk Fiskeoppdrett. Lakselus: Norsk Fiskeoppdrett 2009 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/06/Lakselus_NF_nr_6A_2009.pdf
27. Lusedata, medikamentelle behandlingsmetoder [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <http://lusedata.no/statistikk/forklaring/behandling/>
28. Felleskatalogen. Enamektin, Slice vet 2018 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/slice-vet-msd-animal-health-563986>
29. Felleskatalogen. Diflubenzuron, Releeze vet 2018 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/releeze-vet-ewos-as-592872>
30. Felleskatalogen. Teflubezuron, Ektobann vet 2018 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/ektobann-vet-skretting-567611>
31. Felleskatalogen. Hydrogenperoksid, nemona 2018 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/nemona-akzo-nobel-632425>
<https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/paramove-solvay-595323>
32. Felleskatalogen. Azametifos, Azasure 2018 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/azasure-neptune-pharma-ltd-632424>
33. Felleskatalogen. Deltamectin, A 2018 Alpha Max [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/alpha-max-pharmaq-545966>
34. Felleskatalogen. Cypermetrin, Betamax vet 2018 [Hentet 02.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/betamax-vet-novartis-animal-vaccines-546813>
35. Jensen. PM, kyst Publisert 06.03.2017 [Hentet 02.04.18] Tilgjengelig fra: <https://www.kyst.no/article/ikke-medikamentelle-metoder-gir-betydelig-doedelighet-mener-fiskehelsepersonell/>
36. Nodland. E, Ilaks. Ikke-medisinsk behandling løser ikke luseproblemet 2016 [Hentet 02.04.18] Tilgjengelig fra: <https://ilaks.no/ikke-medisinsk-behandling-loser-ikke-luseproblemet/>
37. Wagner GN, FastMD, Johnson SC. Physiology and immunology of Lepeophtheirus salmonis infections of salmonids. Trends in Parasitology. 2008;24(4):176-183. <https://www-sciencedirect-com.pva.uib.no/science/article/pii/S1471492208000536>
38. Jensen PM, Ny lusebehandlingsmetode: Brent kalk er svært treffsikker [Hentet 04.04.18]. Tilgjengelig fra: <https://www.kyst.no/article/ny-lusebehandlingsmetode-brent-kalk-er-svaert-treffsikkert/>
39. Franzefoss Minerals, våre produkter.[Hentet 05.04.18] Tilgjengelig fra: <http://www.kalk.no/produkter-verdalskalk>
40. Franzefoss Minerals, Kunskapsbibliotek. brentkalk-produktgruppe.[Hentet 05.04.18] Tilgjengelig fra: <http://www.kalk.no/files/PDF/ADB/Informasjon/Brentkalk.pdf>
41. Havforskere får kalke mot kråkeboller [Hentet 05.04.18] Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/kortnytt/havforskere-far-kalke-mot-krakeboller>
42. Sunset BH, Moy HKSF, Steen H, Christie H. Havforskningsinstituttet [Hentet 06.04.18] Tilgjengelig fra: https://www.imr.no/filarkiv/2010/08/hi_nytt_04_web.pdf/nb-no

43. Miljøkalk. Kalksyklusen 2014 [Hentet 06.04.18] Tilgjengelig fra:
<http://www.kalk.no/files/PDF/ADB/Informasjon/Kalksyklusen.pdf>
44. google.no, kalksyklus bilder. [Hentet 06.04.18] Tilgjengelig fra:
https://www.google.no/search?q=kalksyklusen+bilder&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=2t0qh072q02sM%253A%252CAnyTPZZEupK8IM%252C_&usg=__aoag7mFIJFCbK1fXDjdLOpnvsW%3D&sa=X&ved=0ahUKEwjC0IX3wqbaAhWJWCwKHW1iDCAQ9QEIKjAA#imgrc=86b1GLloitQ0AM
45. Miljøkalk. Produktgruppe – Brentkalk 2014 [Hentet 06.04.18] Tilgjengelig fra:
<http://www.kalk.no/files/PDF/ADB/Informasjon/Brentkalk.pdf>
46. google.no, brentkalk produksjon bilder. [Hentet 06.04.18] Tilgjengelig fra:
https://www.google.no/search?q=brentkalk+produksjon+bilder&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=6h4VIHv0XrjbcM%253A%252CQgrFpW_GO5DS-M%252C_&usg=__kgqJ3DKgv2b-OONVxJmLRW6m1HU%3D&sa=X&ved=0ahUKEwjqnPzloKXaAhU0xKYKHx6TC1AQ9QEILDAA#imgrc=tKbYuQ0LTG8seM
47. Boynton RS. Chemistry and Technology of Lime and Limestone: Wiley 1980.
48. Factors Affecting the Quality of Quicklime (CaO) [Hentet 09.04.18] Tilgjengelig fra:
<http://www.chemcosystems.net/Files/Admin/Publications/Factors%20Affecting%20the%20Quality%20of%20Quicklime.pdf>
49. Standard Norge, Norsk standard for bygningskalk-NS-EN 459-2:2010 Bygningskalk
50. Franzefoss kalk AS. Optimal lesking. [Hentet: 14.05.2018] Tilgjengelig fra:
<http://www.kalk.no/Files/PDF/Kunnskapsbibliotek/Lesking1.pdf>
51. Biopharm International. Hva er en Bioassay [Hentet 14.04.18] Tilgjengelig fra:
<http://www.notmywar.com/hva-er-en-bioassay/>
52. Research & Reviews. Principles Involved in Bioassay by different Methods: A Mini-Review 2015 [Hentet 14.04.18] Tilgjengelig fra: <http://www.rroj.com/open-access/principles-involved-in-bioassay-by-different-methods-a-minireview.php?aid=52671>
53. Little T. Biopharm International. Essentials in Bioassay Design and Relative Potency Determination 2016. [Hentet 14.04.18] Tilgjengelig fra:
<http://www.biopharminternational.com/essentials-bioassay-design-and-relative-potency-determination>
54. T-test og statistisk signifikans: en smakebit-UiO
www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM1210/v05/.../T_test.doc
55. Grange J. 2011. t-test in Microsoft Excel
https://www.youtube.com/watch?v=BIS11D2VL_U
56. Glen S. 2013. How to do a two sample t test paired two sample for means in Excel 2013
<https://www.youtube.com/watch?v=RHBIO2reACM>
57. Verifiseringsrapport Reaktivitet av Franzefoss Minerals, 2012 ID 41849-3 2017
58. Interim report for the shelf life stability of QL-100 -AF, Seacalx 2018

59. Veterinærinstituttet. Mer laks-mye mer lus. Oppdatert 18.02.2018 [Hentet: 13.05.2018]
Tilgjengelig fra: <https://www.kyst.no/article/mer-laks-mye-mer-lus/>
60. Sigmund Sevatdal. VESO. Undersøkelse av sensitivitet for et stoff mot lakselus.
[Hentet 14.05.18] Tilgjengelig fra: <http://www.veso.no/bioassay>
61. Commandre JM, Salvador S, Nzilhou A. Reactivity of laboratory and Industrial Limes.
Chemical Engineering Research and Design. 2007; 85(4): 473-80.

ID: 39076-4

Kontrollplan Batch

Prosess: FMI-KONSERN (GSP / Produksjon: Hyla / Pakke)
 Godkjent dato: 08.09.2017 (Sinn Salen)
 Endret dato: 08.09.2017 (Rune Landsem)
 Gyldighetsområde:

Documentkategori: 28.06.2017
 Status revisjon:
 Neste revisjonsdato: 03.05.2019



Kontrollplan: Batchkontroll		Analyseparameter		Enhet	Metode	Grenseverdier	
Qllice						Lav	Høy
	CaO		[%]	Id 41920, kompleksometrisk titrering		94	
	CaO-aktiv		[%]	Id 19922, potensiometrisk titrering		91	
	CO ₂ -rest		[%]	Id 38104, karbonanalyse			2,5
	Reaktivitet, T ₆₀		[sek]	Id 10736, reaktivitet			180
	L.O.I. (1100°C)		[%]	Id 10741, glødetap			2,5
			[%]	Id 38340, kornfordeling			1
			[%]	Id 38340, kornfordeling			10
			[%]	Id 38340, kornfordeling			30

* To første, to midterste og to siste sekker i en batch prøvetas og blandes til en batchprøve iht TQM Id 40908

FMI

FMI

Kunde

Godkjent:
 Dato/signatur
8/9-2017

Rune Landsem
Findeholmen

08.09.2017 13:53:12

Dette dokumentet er å regne som Franzefoss Minerals sin eiendom, kopiering er ikke tillatt uten tillatelse.

8. Vedlegg

Vedlegg 1. Seacalx spesifikasjonen for brentkalk som et legemiddel

Vedlegg 2

Protokoll for DER-assay ble utviklet etter pilotstudiene og pilotforsøkene:

Protokoll for dose-eksponeringstid-respons assay

I. Forsøksdyr

1. Eggstrenger fra standard (sensitiv, ikke resistent) lusestamme klekkes i inkubatoroppsettet hos SLRC.
2. Friskt sjøvann hentes fra SLRC. Noter temperatur, salinitet og pH.
3. For å redusere brentkalk sin effekt på pH brukes forholdsvis store behandlingskar á 500ml med 88cm² overflate. Totalt trengs 11 behandlingskar og 11 overføringskar (3 doser og 3 eksponeringstider testes + 2 kontroller). Hver av disse fylles med 500ml friskt sjøvann.
4. 20-30 stykk nauplius II fra samme eggstreng tilsettes til hvert behandlingskar ved hjelp av mikropipette med avklippet tupp for skånsom overføring. Velg kun aktive og friske nauplius. Noter hvilken "batch" eller eggstreng larvene stammer fra. Oppbevar nauplius til overs i inkubator som ekstra og uberørt kontroll.
5. La larvene få tid til å akklimatisere seg og spre seg i behandlingskarene. Sørg for lik lyssetting i alle karene.

II. Kalsiumoksid og kontrollsubstansene

1. Vei inn totalt 9 doser brentkalk (3x0,3g, 3x0,2g og 3x0,1g) i eppendorfrør. Nummerer og noter nøyaktig vekt. For eventuelle tester i andre behandlingskar kan man ta utgangspunkt i henholdsvis 0,6 g/L, 0,4 g/L og 0,2 g/L eller 34,1 g/m², 22,7 g/m² og 11,4 g/m².
2. Kontroll 1: Kun friskt sjøvann. Lus behandles likt som de behandlede (lyssetting, pipettering, overføring, telling i mikroskop, etc).
3. Kontroll 2: CaCO₃ og/eller ikke-reaktivt stoff som for eksempel finkornet sand. Dødbrent brentkalk fungerer ikke som kontroll.

4. Sørg for jevnest mulig dosering over overflaten. Start ytterst, dryss forsiktig brentkalk i spiralform med klokken og avslutt i midten av karet. Mål pH mot slutten av eksponeringstiden eller kontinuerlig hvis mulig. Ved bruk av strips måles pH nærmest mulig bunn av karet.
5. Overfør larvene til beholder med 500ml friskt sjøvann så raskt som mulig etter eksponeringstid. Bruk mikropipette. Unngå å overføre partikler med brentkalk.
6. Bytt pipettetupp og overfør larvene til inkuberingskammer. Registrer kammernummer. 7. Husk at kontrollene ALLTID skal behandles likt, bruk rene pipetter.

III. Varighet

1. Følg med på langtidsoverlevelse etter 24t, 48t, 72t, 96t og eventuelt 120t frem til endepunkt for telling. Endepunkt for telling er når alle nauplius II er død eller har blitt kopepoditter. Telling gjøres i mikroskop. Larver overføres til petriskål med sjøvann og sjekkes nøye før de overføres tilbake til inkubering (se datatolkning). Sørg for at alle larver overføres.
2. Forsøket utføres i 3 paralleller. Resultatet bør gjenskapes i parallellene for at forsøket godkjennes.

IV. Datatolkning

1. Larvene klassifiseres som levende (L) eller døde (D). L=Tydelig aktiv/ubetydelig påvirket D=Tydelig død/betydelig påvirket. Vurder om det er hensiktsmessig å klassifisere noen som inaktive eller mindre påvirket (I).
2. Fremstill data i egnet program. Lag for eksempel kurve eller diagram som viser prosentvis overlevelse og/eller prosentgjennomsnitt for overlevelse (eventuelt for mortalitet) mot dose og eksponeringstid. 3. Vurder om dosen må justeres ytterligere som følge av redusert eksponeringstid og redusert effekt av pH. Hvis det er grunnlag for endringer i forsøket må 3 nye paralleller utføres og like resultater gjenskapes.

Det antas at forsøksoppsettet vil gi lignende resultater ved behandling av nauplius I og kopepoditter, med minimale dosejusteringer.

Vedlegg 3: Rådata fra sikteanalyse.

Rådata av brentkalk batch: $T_{60} = 34$ sek, NFK 13.05.16, duk 0.3

Parallell 1	Brentkalk vekt: 250.1 g				
Siktåpning	Vekt av sikter (g)	Vekt av sikter med Qlice (g)	Qlice (g)	Qlice vekt %	Gjen. vekt % av 2 paralleller
0.8 mm	287.6	287.7	0.1	0.0	0.1
0.6 mm	325.4	330.4	5.0	2.0	2.1
0.4 mm	290.9	326	35.1	14.0	14.7
0.3 mm	254.2	305.8	51.6	20.6	20.5
0.25 mm	270.8	315.5	44.7	17.9	18.3
0.2 mm	275.3	318.4	43.1	17.2	16.7
0.15 mm	247.1	270.3	23.2	9.3	9.2
0.1 mm	261.7	285.7	24.0	9.6	9.3
Bunnskål	340.7	364.0	23.3	9.3	9.3
SUM			250.0	100.0	
Parallell 2	Brentkalk vekt: 250.1 g				
0.8 mm	287.6		0.2	0.1	
0.6 mm	325.4		5.4	2.2	
0.4 mm	290.9		38.6	15.4	
0.3 mm	254.2		50.7	20.3	
0.25 mm	270.8		46.6	18.6	
0.2 mm	275.2		40.3	16.1	
0.15 mm	247.1		22.8	9.1	
0.1 mm	261.7		22.3	8.9	
Bunnskål	340.7		23.3	9.3	
SUM			250.0	100.0	

Rådata av brentkalk batch: $T_{60} = 64$ sek, Sekk 1965

Parallell 1	Brentkalk vekt: 250.1 g				
Siktåpning	Vekt av sikter (g)	Vekt av sikter med brentkalk (g)	Brentkalk (g)	Brentkalk vekt %	Gjen. vekt % av 2 paralleller
0.8 mm	287.6	288.1	0.5	0.2	0.1
0.6 mm	325.4	329.6	4.2	1.7	2.0
0.4 mm	291.1	362.5	71.4	28.5	29.6
0.3 mm	254.2	300.2	46.0	18.4	18.6
0.25 mm	271.0	298.3	27.2	10.9	10.7
0.2 mm	275.5	302.2	26.7	10.7	10.2
0.15 mm	247.2	270.0	22.8	9.1	8.7
0.1 mm	263.1	286.5	23.4	9.4	9.2
Bunnskål	340.7	268.3	27.6	11.0	10.9
SUM			249.3	99.9	
Parallell 2	Brentkalk vekt: 250.1 g				
0.8 mm	287.6	287.8	0.2	0.1	
0.6 mm	325.5	331.1	5.6	2.2	
0.4 mm	290.9	367.3	76.4	30.6	
0.3 mm	254.2	301.0	46.8	18.7	
0.25 mm	270.9	297.0	26.1	10.4	
0.2 mm	275.2	299.6	24.4	9.8	
0.15 mm	247.2	268.0	20.8	8.3	
0.1 mm	262.4	284.8	22.4	9.0	
Bunnskål	340.7	367.7	27.0	10.8	
SUM			249.5	99.8	

Rådata av brentkalk batch: T₆₀ = 97 sek, Oppd-002469

Parallell 1	Brentkalk vekt: 250.1 g				
Siktåpning	Vekt av sikter (g)	Vekt av sikter med brentkalk (g)	Brentkalk (g)	Brentkalk vekt %	Gjen. vekt % av 2 paralleller
0.8 mm	287.6	287.8	0.2	0.1	0.1
0.6 mm	325.4	325.6	0.2	0.1	0.1
0.4 mm	290.9	303.1	12.2	4.9	5.0
0.3 mm	254.2	298.3	44.1	17.6	18.2
0.25 mm	270.8	313.4	42.6	17.0	16.8
0.2 mm	275.2	323.1	47.9	19.2	19.0
0.15 mm	247.2	286.2	39	15.6	15.5
0.1 mm	261.8	299.3	37.5	15.0	15.0
Bunnskål	340.7	367.0	26.3	10.5	10.4
SUM			249.8	100.0	
Parallell 2	Brentkalk vekt: 250.1 g				
0.8 mm	287.6	287.8	0.2	0.1	
0.6 mm	325.4	325.5	0.1	0.0	
0.4 mm	291.0	303.7	12.7	5.1	
0.3 mm	254.1	301.0	46.9	18.8	
0.25 mm	270.9	312.2	41.3	16.5	
0.2 mm	275.2	322.1	46.9	18.8	
0.15 mm	247.2	285.8	38.6	15.4	
0.1 mm	261.7	299.2	37.5	15.0	
Bunnskål	340.7	366.5	25.8	10.3	
SUM			249.8	100.0	

Rådata av brentkalk batch: T₆₀ = 177 sek, Oppd-002468

Parallell 1	Brentkalk vekt: 250.0 g				
Siktåpning	Vekt av sikter (g)	Vekt av sikter med brentkalk (g)	Brentkalk (g)	Brentkalk vekt %	Gjen. vekt % av 2 paralleller
0.8 mm	287.6	287.7	0.1	0.0	0.1
0.6 mm	325.4	325.8	0.4	0.2	0.1
0.4 mm	291.0	310.3	19.3	7.7	8.1
0.3 mm	254.1	311.2	57.1	22.8	23.5
0.25 mm	270.7	313.5	42.8	17.1	17.1
0.2 mm	275.3	322.1	46.8	18.7	19.0
0.15 mm	247.2	282.6	35.4	14.2	13.7
0.1 mm	261.7	292.5	30.8	12.3	11.8
Bunnskål	340.7	358.1	17.4	7.0	6.8
SUM			250.0	100.0	100.0
Parallell 2	Brentkalk vekt: 250.0 g				
0.8 mm	287.6	287.8	0.2	0.1	
0.6 mm	325.4	325.7	0.3	0.1	
0.4 mm	290.9	311.9	21.0	8.4	
0.3 mm	254.2	314.4	60.2	24.1	
0.25 mm	270.8	313.3	42.5	17.0	
0.2 mm	275.3	323.4	48.1	19.2	
0.15 mm	247.1	280.2	33.1	13.2	
0.1 mm	261.7	289.8	28.1	11.2	
Bunnskål	340.7	357.3	16.6	6.6	
SUM			249.9	99.9	

Vedlegg 4. Reaktivitet-partikkelstørrelse respons assay.

Rådata fra forsøksoppsett 1-3 viser antall levende og døde frittlevende av lakselus ved endepunkt for telling. Larver forblir Nauplia (de klarer ikke å gjennomgå skallsjift å bli til kopepoditt) telles som død. Larver gjennomgår skallsjift og blir til kopepoditt telles som overlevelse.

Rådata fra forsøksoppsett 1: Kombiansjon av brentkalk med reaktiviteten på 34 sek og tre forskjellige partikkelstørrelser ble testet mot de fire frittlevende stadiene av lakselus.

Parallell	T60 (s)	Partikkelstør	Nauplia I				Nauplia II dag 2				Nauplia II dag 4				Kopepoditt		
			Død	Nauplia	Kopep.	% Overlev.	Død	Nauplia	Kopep.	% Overlev.	Død	Nauplia	Kopep.	% Overlev.	Død	Overlev	% Overlev.
Kontroll	34	< 0,15mm	0	0	20	100	0	0	20	100	0	0	23	100	0	31	100
1	34	< 0,15mm	17	0	0	0	20	0	0	0	24	0	0	0	21	0	0
2	34	< 0,15mm	19	0	0	0	17	0	0	0	33	0	0	0	21	0	0
3	34	< 0,15mm	19	0	1	5	18	0	0	0	26	0	1	4	22	0	0
4	34	< 0,15mm	19	0	1	5	19	0	0	0	24	0	0	0	20	0	0
5	34	< 0,15mm	18	0	0	0	17	0	0	0	32	0	0	0	22	0	0
6	34	< 0,15mm	16	0	2	11	19	0	0	0	35	0	0	0	21	0	0
7	34	< 0,15mm	18	0	1	5											
Gjen.						4				0				1			0
StDev						4,1				0,0				1,5			0,0
Kontroll	34	0,2 - 0,3mm	0	0	35	100	0	0	20	100	0	0	23	100	0	35	100
1	34	0,2 - 0,3mm	21	2	1	4	13	5	1	5	22	0	0	0	21	1	5
2	34	0,2 - 0,3mm	23	0	1	4	17	0	0	0	23	0	0	0	23	2	8
3	34	0,2 - 0,3mm	22	1	0	0	15	4	0	0	24	0	1	4	21	0	0
4	34	0,2 - 0,3mm	21	1	1	4	20	0	0	0	24	2	1	4	23	2	8
5	34	0,2 - 0,3mm	22	2	0	0	14	2	1	6	20	1	1	5	20	0	0
6	34	0,2 - 0,3mm					20	0	0	0	18	0	1	5	22	1	4
Gjen.						3				2				3			4
StDev						2,3				2,9				2,3			3,6
Kontroll	34	0,4 - 0,6mm	0	0	35	100	0	0	22	100	0	0	25	100	0	35	100
1	34	0,4 - 0,6mm	10	0	14	58	20	0	2	9	16	0	4	20	19	4	17
2	34	0,4 - 0,6mm	10	1	9	45	14	4	4	18	21	2	7	23	20	3	13
3	34	0,4 - 0,6mm	14	0	13	48	15	1	3	16	22	2	6	20	17	4	19
4	34	0,4 - 0,6mm	11	2	13	50	16	1	4	19	22	3	4	14	24	2	8
5	34	0,4 - 0,6mm	15	0	10	40	19	0	4	17	27	2	2	6	15	6	29
6	34	0,4 - 0,6mm					20	0	3	13	26	2	2	7	22	6	21
Gjen.						48				15				15			18
StDev						6,8				3,8				7,3			7,2

Rådata fra forsøksoppsett 2: Kombinasjon av brentkalk med reaktiviteten på 97 sek og tre forskjellige partikkelstørrelser ble testet mot de fire frittlevende stadiene av lakselus.

Paralleller	T60 (s)	Partikkelstør	Nauplia I				Nauplia II dag 2				Nauplia II dag 4				Kopepoditt		
			Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Død	Overlev	% Overlev.
Kontroll	97	< 0,15mm	0	0	28	100	0	0	27	100	0	0	25	100	0	28	100
1	97	< 0,15mm	27	0	0	0	21	0	0	0	25	0	0	0	27	0	0
2	97	< 0,15mm	25	0	0	0	21	0	0	0	21	0	0	0	22	0	0
3	97	< 0,15mm	20	0	0	0	24	0	0	0	29	0	0	0	25	0	0
4	97	< 0,15mm	21	0	0	0	19	0	0	0	21	0	0	0	24	0	0
5	97	< 0,15mm	19	0	0	0	30	0	0	0	28	0	0	0	27	0	0
6	97	< 0,15mm	24	0	0	0	23	0	0	0	31	0	0	0	26	0	0
Gjen.						0,0				0,0				0,0			0,0
StDev						0,0				0,0				0,0			0,0
Kontroll	97	0,2 - 0,3mm	0	0	28	100	0	0	27	100	1	0	29	97	0	28	100
1	97	0,2 - 0,3mm	27	0	0	0	27	1	1	3	29	1	1	3	18	4	18
2	97	0,2 - 0,3mm	25	0	0	0	22	0	1	4	24	1	3	11	20	0	0
3	97	0,2 - 0,3mm	17	0	1	6	29	0	2	6	24	0	2	8	19	1	5
4	97	0,2 - 0,3mm	27	0	1	4	28	0	3	10	24	1	2	7	28	4	13
5	97	0,2 - 0,3mm	25	0	0	0	23	1	1	4	23	1	0	0	22	0	0
6	97	0,2 - 0,3mm	18	0	1	5	33	0	2	6					26	1	4
Gjen.						2				6				6			7
StDev						2,7				2,3				4,2			7,3
Kontroll	97	0,4 - 0,6mm	0	2	23	92	0	0	24	100	1	0	29	97	0	26	100
1	97	0,4 - 0,6mm	24	1	4	14	19	2	5	19	17	1	7	28	21	5	19
2	97	0,4 - 0,6mm	13	3	1	6	29	4	3	8	25	3	4	13	23	2	8
3	97	0,4 - 0,6mm	14	2	5	24	29	1	5	14	16	0	8	33	15	5	25
4	97	0,4 - 0,6mm	28	2	4	12	24	2	6	19	24	1	3	11	22	6	21
5	97	0,4 - 0,6mm	21	5	1	4	20	1	2	9	15	2	4	19	13	4	24
6	97	0,4 - 0,6mm	23	0	4	15	26	3	6	17					22	6	21
Gjen.						12				14				21			20
StDev						7,2				4,9				9,8			6,1

Rådata fra forsøksoppsett 3: Kombinasjon av brennkalk med reaktiviteten på 177 sek og tre forskjellige partikkelstørrelser ble testet mot de tre frittlevende stadiene av lakselus.

paralleller	T60 (s)	Partikkelstør	Nauplia I				Nauplia II dag 2				Nauplia II dag 4				Kopepoditt		
			Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Død	Overlev	% Overlev.
Kontroll	177	< 0,15mm	0	0	28	100	0	0	24	100	0	0	28	100	0	22	100
1	177	< 0,15mm	24	0	0	0	24	0	0	0	24	0	0	0	26	0	0
2	177	< 0,15mm	18	0	0	0	28	0	0	0	24	0	0	0	20	0	0
3	177	< 0,15mm	21	0	1	5	27	0	0	0	26	0	0	0	25	0	0
4	177	< 0,15mm	27	0	0	0	26	0	0	0	23	1	1	4	30	0	0
5	177	< 0,15mm	25	0	0	0	24	0	1	4	20	1	0	0	30	0	0
6	177	< 0,15mm	19	0	0	0								25	0	0	
Gjen.						1			1				1				0
StDev						1,9			1,8				1,8				0,0
Kontroll	177	0,2 - 0,3mm	0	0	28	100	0	0	25	100	2	0	28	93	0	28	100
1	177	0,2 - 0,3mm	17	0	0	0	25	1	4	13	20	1	2	9	19	1	5
2	177	0,2 - 0,3mm	18	0	0	0	18	2	4	17	26	0	1	4	30	0	0
3	177	0,2 - 0,3mm	21	0	0	0	20	1	1	5	22	0	0	0	28	3	10
4	177	0,2 - 0,3mm	23	0	0	0	23	0	2	8	22	2	0	0	25	0	0
5	177	0,2 - 0,3mm	23	0	0	0	19	1	2	9	17	1	4	18	27	3	10
6	177	0,2 - 0,3mm	24	0	1	4								26	0	0	
Gjen.						1			10				6				4
StDev						1,6			4,7				7,6				4,8
Kontroll	177	0,4 - 0,6mm	0	0	26	100	0	0	25	100	2	0	28	93	0	25	100
1	177	0,4 - 0,6mm	14	0	4	22	23	2	5	17	17	2	9	32	18	4	18
2	177	0,4 - 0,6mm	16	0	4	20	16	2	6	25	23	1	4	14	26	4	13
3	177	0,4 - 0,6mm	29	2	2	6	19	1	6	23	17	2	8	30	16	6	27
4	177	0,4 - 0,6mm	25	1	2	7	18	2	3	13	21	1	10	31	15	5	25
5	177	0,4 - 0,6mm	28	4	2	6	19	1	9	31	13	1	10	42	21	6	22
6	177	0,4 - 0,6mm	0	0	0									15	5	25	
Gjen.						12			22				30				22
StDev						8,1			7,1				9,9				5,2

Vedlegg 5. Det anbefalte forsøksoppsettet. Slike oppsetter kan det gis nok data til å finne om reaktivitet er signifikant ved hjelp av t-test fra excel.

Partikkelstørrelse (mm)	Reaktivitet, T₆₀ (sek)	Stadiene av lakselus	Behandlingstid (min)	Dose (g)
< 0.15	34	Nauplia I	10	0.3
< 0.15	34	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.15	34	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.15	34	Kopepoditt	10	0.3
< 0.15	97	Nauplia I	10	0.3
< 0.15	97	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.15	97	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.15	97	Kopepoditt	10	0.3
< 0.15	177	Nauplia I	10	0.3
< 0.15	177	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.15	177	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.15	177	Kopepoditt	10	0.3
< 0.2-0.3	34	Nauplia I	10	0.3
< 0.2-0.3	34	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.2-0.3	34	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.2-0.3	34	Kopepoditt	10	0.3
< 0.2-0.3	97	Nauplia I	10	0.3
< 0.2-0.3	97	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.2-0.3	97	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.2-0.3	97	Kopepoditt	10	0.3
< 0.2-0.3	177	Nauplia I	10	0.3
< 0.2-0.3	177	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.2-0.3	177	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.2-0.3	177	Kopepoditt	10	0.3
< 0.4-0.6	34	Nauplia I	10	0.3
< 0.4-0.6	34	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.4-0.6	34	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.4-0.6	34	Kopepoditt	10	0.3
< 0.4-0.6	97	Nauplia I	10	0.3
< 0.4-0.6	97	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.4-0.6	97	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.4-0.6	97	Kopepoditt	10	0.3
< 0.4-0.6	177	Nauplia I	10	0.3
< 0.4-0.6	177	Nauplia II dag 2	10	0.3
< 0.4-0.6	177	Nauplia II dag 4	10	0.3
< 0.4-0.6	177	Kopepoditt	10	0.3

Vedlegg 6. Retesting av Nauplia I med reaktivitet på 34 sek ble utført ca. 4 uker etter den første testingen.

Rådata og resultatet merkes grå ble valgt til å bruke i oppgaven.

Retesting utført: 08.03.2018							Test utført : 13.01.2018						
			Nauplia I							Nauplia I			
Forsøk	T60 (s)	Partikkelstør	Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.	Forsøk	T60 (s)	Partikkelstør	Død	Nauplia	Koep.	% Overlev.
Kontroll	34	< 0,15mm	0	0	35	100	Kontroll	34	< 0,15mm	0	0	20	100
1	34	< 0,15mm	22	1	2	8	1	34	< 0,15mm	17	0	0	0
2	34	< 0,15mm	27	0	0	0	2	34	< 0,15mm	19	0	0	0
3	34	< 0,15mm	22	1	2	8	3	34	< 0,15mm	19	0	1	5
4	34	< 0,15mm	26	1	1	4	4	34	< 0,15mm	19	0	1	5
5	34	< 0,15mm	28	0	2	7	5	34	< 0,15mm	18	0	0	0
6							6	34	< 0,15mm	16	0	2	11
7							7	34	< 0,15mm	18	0	1	5
Gjen.						5	Gjen.						4
StDev						3,4	StDev						4,1
Kontroll	34	0,2 - 0,3mm	0	0	35	100	Kontroll	34	0,2 - 0,3mm	0	0	20	100
1	34	0,2 - 0,3mm	21	2	1	4	1	34	0,2 - 0,3mm	20	3	3	12
2	34	0,2 - 0,3mm	23	0	1	4	2	34	0,2 - 0,3mm	17	1	0	0
3	34	0,2 - 0,3mm	22	1	0	0	3	34	0,2 - 0,3mm	15	1	1	6
4	34	0,2 - 0,3mm	21	1	1	4	4	34	0,2 - 0,3mm	23	0	4	15
5	34	0,2 - 0,3mm	22	2	0	0	5	34	0,2 - 0,3mm	16	1	0	0
6							6	34	0,2 - 0,3mm	21	1	3	12
7							7	34	0,2 - 0,3mm	20	3	4	15
Gjen.						3	Gjen.						8
StDev						2,3	StDev						6,5
Kontroll	34	0,4 - 0,6mm	0	0	35	100	Kontroll	34	0,4 - 0,6mm	0	0	20	100
1	34	0,4 - 0,6mm	10	0	14	58	1	34	0,4 - 0,6mm	15	0	8	35
2	34	0,4 - 0,6mm	10	1	9	45	2	34	0,4 - 0,6mm	14	1	11	42
3	34	0,4 - 0,6mm	14	0	13	48	3	34	0,4 - 0,6mm	13	1	9	39
4	34	0,4 - 0,6mm	11	2	13	50	4	34	0,4 - 0,6mm	14	1	10	40
5	34	0,4 - 0,6mm	15	0	10	40	5	34	0,4 - 0,6mm	13	0	12	48
6							6	34	0,4 - 0,6mm	15	1	10	38
7							7	34	0,4 - 0,6mm	15	1	9	36
Gjen.						48	Gjen.						40
StDev						6,8	StDev						4,4