

Effekt av ultralyd på lakselus

Resultater fra smitteforsøk med lakselus i kar

Martin H. Skjelvareid, Mette S. W. Breiland, Astrid Buran Holan og Atle Mortensen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-467-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-468-5 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Effekt av ultralyd på lakselus Resultater fra smitteforsøk med lakselus i kar	<i>Rapportnr.:</i> 63/2016
	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Martin H. Skjelvareid, Mette S.W. Breiland, Astrid Buran Holan, Atle Mortensen (prosjektleder)	<i>Dato:</i> 20. desember 2016
<i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 22
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 901187
<i>Stikkord:</i> Lakselus, ultralyd, smitte, kavitasjon	<i>Prosjektnr.:</i> 11491
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Ultralyd har blitt foreslått som en alternativ metode for kontroll av lakselus i oppdrettsnæringen, men effekten er så langt ikke dokumentert. I denne studien ble effekten av ultralyd i kontrollerte smitteforsøk undersøkt. Forsøkene ble gjennomført i kar på 500-1100 liter, med en smitteperiode på 1 time. Ultralydtransducere med frekvenser på 9,3, 21 og 54 kHz ble benyttet, med inngangseffekt på henholdsvis 60, 60 og 25 W. Det ble brukt 10-20 laks (snittvekt 230 g) og 780-1200 kopepoditter per kar. Påslag av lus varierte mellom 0 og 60 lus per fisk, med typiske verdier på 5-15 lus per fisk. Variasjonen i påslag innad i hver forsøksgruppe var stor. I den statistisk sett mest pålitelige forsøksserien ble det påvist signifikant reduksjon i lusepåslag kun ved 9,3 kHz. Den store variasjonen i datamaterialet gir grunn til forsiktighet i tolkning av resultatene. Dersom ultralyd faktisk har en effekt, er effekten i beste fall liten. Forsøkene ble også gjennomført med lydtrykk som er betydelig høyere enn hva man kan oppnå i åpent hav. I praksis vil effekten sannsynligvis være svakere enn den som er observert i dette forsøket. Vi anser derfor ikke ultralyd som en egnet metode for lusekontroll.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i> <p>The effect of applying ultrasound during controlled infection with salmon lice, <i>Lepeophtheirus salmonis</i>, has been studied. Salmon were placed in tanks with salmon lice copepodids for 1 hour, while simultaneously being exposed to frequencies of 9.3, 21 or 54 kHz. Only 9.3 kHz yielded a significant reduction in louse infection. However, variation within each experiment group was high, and results should be treated with caution. The effect of ultrasound, if any, is small, and sound levels in a practical implementation will be lower than those used in the experiments. Ultrasound is therefore not considered a feasible method for salmon louse control.</p>	

Forord

Prosjektet er gjennomført på oppdrag fra Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF, prosjekt nr 901187). FHF har finansiert flere prosjekter som har som mål å undersøke hvorvidt lakselus kan bekjempes ved hjelp av ultralyd. I dette prosjektet er det gjort smitteforsøk med lakselus med og uten påvirkning av ultralyd.

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Faglig bakgrunn	1
1.2	Prosjektorganisering.....	2
2	Problemstilling og formål	3
2.1	Effekt mål	3
2.2	Resultatmål – leveranser.....	3
3	Prosjektgjennomføring – materialer og metoder	4
3.1	Oversikt over forsøksserier	4
3.2	Smitteforsøk	5
3.3	Transducere og lydmålinger	7
3.4	Lusetelling - statistisk analyse	11
4	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	13
4.1	Resultater	13
4.1.1	Presentasjon av resultatene.....	13
4.1.2	Forsøksserie 1.....	13
4.1.3	Forsøksserie 2.....	14
4.1.4	Forsøksserie 3.....	15
4.2	Diskusjon	16
4.3	Konklusjoner.....	18
4.4	Takk til bidragsytere	19
5	Leveranser	20
6	Referanser	21

1 Innledning

1.1 Faglig bakgrunn

Lakselusa, *Lepeophtheirus salmonis*, er en parasittisk hoppekreps som lever i sjøvann. Den gjennomgår åtte stadier, der den i de tre første stadiene er frittlevende (Hamre et al. 2013). I det tredje stadiet, kopepodittstadiet, fester lusa seg på vertsfisken. Der lever den av slim, hud og blod. Lakselus kan øke faren for bakterie- og virusinfeksjon hos vertsfisken, og den kan forstyrre saltbalansen til vertsfisken slik at den i verste fall dør. I tilstrekkelige mengder er derfor lakselus et problem for fiskevelferden i oppdrettsanlegg, men det største problemet er likevel at lakseoppdrettsanlegg har potensial til å produsere svært store mengder luselarver som i neste omgang kan smitte vill laksefisk (laks, sjøørret og sjørøye).

Vitenskapelig råd for lakseforvaltning (2015) rangerer lakselus og rømt oppdrettslaks som de viktigste truslene mot de ville laksebestandene. Regjeringens Havbruksmelding (Stortingsmelding nr 16, 1014-2015) slår også fast at videre vekst i lakseoppdrettet i et område fordrer at tettheten av lakselus i oppdrettsanleggene er under kontroll. Bekjempelse av lakselus er derfor den største miljømessige utfordringen for lakseoppdrettsnæringen i dag, og en rekke metoder av både preventiv og kurativ karakter er tatt i bruk i denne kampen. Men ingen av de eksisterende metodene tilfredsstillende fullt ut ønskene om høy effektivitet, lave kostnader og ingen negativ effekt på fisk, miljø eller HMS. Bruk av ultralyd er lansert som en ny metode for å hindre påslag av lakselus, og det selges allerede ultralydutstyr for dette formålet i Norge (Hemming 2016; Børstad & Trana 2016). Metoden er billig sammenliknet med andre metoder, den krever ingen håndtering av fisken og har sannsynligvis små negative effekter på fisk og miljø. Siden lyd i liten grad forplanter seg fra vann til luft har den heller ikke negative HMS effekter (Mortensen & Skjelvareid 2015). Ultralyd tilfredsstillende dermed mange av kriteriene til en ideell bekjempelsesmetode. Spørsmålet er bare om den er effektiv nok.

Ultralyd er en metode som har blitt brukt i flere sammenhenger for å unngå fremvekst av uønskede organismer (engelsk «biofouling»). Ved høye lydintensiteter vil ultralyd forårsake kavitasjon i vannet, med medfølgende dannelse av bobler. Når boblene kollapser, dannes det «mikro-jetstråler» og lokalt svært høye temperaturer og trykk (Brennen 2005; Santos et al. 2009). Ultralyd-indusert kavitasjon kan blant annet brukes for å drepe alger, bakterier og plankton, og kan også forårsake dødelighet hos larver fra rur og sebramusling (Guo et al. 2011; Legg et al. 2015). Kavitasjon kan kun oppstå relativt nærme en ultralyd-transducer, dvs. på overflaten av transducere og opp til noen centimeters avstand (Moussatov et al. 2003; Hallez et al. 2010). Det er imidlertid vist at moderate lydintensiteter, dvs. intensiteter under kavitasjonsterskelen, kan hindre rurlarver i etablere seg på en overflate uten å forårsake dødelighet (Guo et al. 2012). Lusekopepoditter oppviser en liknende adferd som rurlarver i påslagsfasen, ved at de først sonderer overflaten de skal sette seg på før de slår seg ned mer permanent (Bron et al. 1991). Det har derfor vært ansett som mulig at ultralyd kan hindre lusekopepoditter i å slå seg ned på laks ved å forstyrre dem i påslagsfasen. Hensikten med denne studien har derfor vært å undersøke om ultralyd kan påvirke adferden til lusekopepoditter slik at de ikke slår seg ned på laks. Dette ble gjort gjennom kontrollerte forsøk med påslag av kopepoditter på laks i kar, der laks og lus ble eksponert for ultralyd gjennom smitteperioden. Kontrollforsøk med smitte uten ultralyd ble også gjennomført.

Tidligere studier har vist at ultralyd-frekvenser rundt 20 kHz er effektive for å forhindre vekst av ulike typer organismer (Legg et al. 2015), og 20 kHz ble derfor satt som referanseverdi i planleggingen av eksperimentene. Basert på tilgjengelige modeller fra transducerprodusenten (Benthowave Instrument Inc.) ble frekvensene 9,3 kHz, 21 kHz og 54 kHz inkludert i forsøket. 21 kHz ble valgt fordi den lå nært referansen på 20 kHz, og 9,3 og 54 kHz ble valgt for å studere effekten av å bruke frekvenser over og under referanseverdien. Merk at 9,3 kHz er innenfor det hørbare området for mennesker, og er derfor strengt tatt utenfor frekvensområdet som defineres som ultralyd (> 20 kHz). De andre frekvensene er imidlertid innenfor dette området, og for enkelhets skyld vil vi derfor referere til alle frekvensene i denne studien som ultralyd.

Laks har et hørselsområde som kun strekker seg til rundt 580 Hz, og frekvenser fra 9,3 kHz og oppover forventes derfor ikke å skade laksens hørsel eller føre til endring i adferd. Ved veldig høye lydintensiteter kan man imidlertid forvente direkte fysisk skade (Popper 2008). I denne studien har vi forsøkt å unngå slike potensielt skadelige effekter ved å sikre at fisken holder en viss avstand til transduceren.

1.2 Prosjektorganisering

- Prosjektet er gjennomført i tidsrommet januar – desember 2016.
- Prosjektet er fullfinansiert av FHF, med en budsjetttramme på 802.000,- kroner.
- Prosjektet er gjennomført av følgende forskere ved Nofima: Atle Mortensen (prosjektleder), Martin H. Skjelvareid, Mette S. W. Breiland og Astrid Buran Holand.
- Prosjektet har hatt følgende styringsgruppe: Henrik Trengereid, Marine Harvest AS; Ken Rune Bekkeli, Salaks AS; Per Gunnar Kvenseth, Smøla Klekkeri og Settefiskanlegg AS og Kristian Prytz (kontaktperson, FHF).

2 Problemstilling og formål

2.1 Effektmål

Lakselusbekjempelse kostet i 2015 lakseoppdrettsnæringen mer enn 5 milliarder kroner (Iversen et al. 2016), eller ca. 4 kr per kilo sløyd laks. De mest brukte metodene kan også ha negative miljøeffekter (medikamenter og kjemikalier), ha negative effekter på fiskevelferd (mekaniske metoder med pumping) og medføre veksttap (sulting før behandling). Det er derfor ønskelig å erstatte eksisterende metoder med preventive metoder som ikke innebærer bruk av medikamenter eller kjemikalier og som heller ikke medfører handtering eller annen negativ påvirkning på laksen. Ultralyd har vært lansert som et aktuelt alternativ som i tillegg krever relativt små investeringer (noen få hundre tusen per merd) og har svært lave driftskostnader (strømforbruk på noen få hundre watt per merd). Målet for dette prosjektet har derfor vært å undersøke, ved hjelp av smittforsøk under kontrollerte betingelser, om ultralyd kan redusere eller hindre påslag av lusekopepoditter på laks.

2.2 Resultatmål – leveranser

Målet for prosjektet har vært å dokumentere effekten av ultralyd på påslag av lakseluskopepoditter under eksperimentelle betingelser i kar. Resultatene vil bli gjort kjent gjennom: Faglige sluttrapport til FHF (dette dokumentet), presentasjon på FHF seminar om ikke-medikamentell lusebehandling i februar 2017, populærvitenskapelig artikkel i norsk tidsskrift og vitenskapelig artikkel i internasjonal journal.

3 Prosjektgjennomføring – materialer og metoder

3.1 Oversikt over forsøksserier

Forsøkene ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø, i tre serier. De viktigste parameterne for forsøkene er oppsummert i Tabell 1. Av disse tre seriene er forsøksserie 3 den vi fester størst lit til, både fordi den inneholder det største datasettet, og fordi vi føler oss relativt sikre på at forsøket er gjennomført uten metodefeil av noe slag. I denne rapporten er imidlertid alle tre forsøkene beskrevet, for bedre å kunne forklare gangen i hele prosjektet, og for å presentere alt tilgjengelig tallmateriale.

Første forsøksserie ble gjennomført i perioden 17. juni til 4. juli 2016. Det ble gjennomført et forsøk for hvert ultralyd-frekvens, samt 2 kontrollforsøk. Det første kontrollforsøket ble gjennomført fredag 17. juni, og på grunn av diverse forsinkelser ble ultralydforsøkene samt 2. kontrollforsøk gjennomført først mandag 20. juni.

Etter smitteforsøket i forsøksserie 1 begynte en diskusjon om hvorvidt antallet forsøk og fisk per forsøk var stort nok for å gi pålitelige resultater. Det ble også ansett som uheldig at det gikk tre dager mellom første og andre kontrollforsøk, ettersom smitematerialet potensielt kan forandre seg over en slik periode (mindre aktiv adferd). Det ble derfor besluttet å gjennomføre en andre forsøksserie, med tre ultralydforsøk og en kontroll. Ettersom smitematerialet kun er tilgjengelig innen et begrenset tidsvindu, ble smitteforsøket for forsøksserie 2 gjennomført før resultatene fra forsøksserie 1 var tilgjengelige. Det ble derfor brukt samme antall kopepoditter i serie 2 som i serie 1, dvs. samme smittepress.

Etter telling av påslag av lus i forsøksserie 1 og 2 fremkom det at

- a) Antall lus per fisk var relativt lavt, også for kontrollene, slik at tallgrunlaget for å teste en reduksjon av antall lus ved bruk av ultralyd var noe svakt.
- b) Antallet fisk i forsøksserie 1 og 2 var relativt lite i forhold til den store variasjonen i antall lus mellom fisk fra samme forsøksgruppe.
- c) I forsøksserie 2 indikerte resultatene at en av frekvensene ga en betydelig økning i påslag av lus, noe som virket urimelig. En mulig forklaring på dette er at det er en tilfeldighet, grunnet naturlige variasjoner i lusepåslag i forsøket. En annen forklaring er at det kan ha skjedd en feil i forsøket.

Med bakgrunn i dette ble det besluttet å gjennomføre en tredje forsøksserie, med et større smittepress og flere fisk per forsøksgruppe. På grunn av forsinkelser i forbindelse med ny tillatelse fra Mattilsynet ble denne forsøksserien gjennomført først i perioden 2.-15. november 2016.

Tabell 1 Oversikt over forsøksserier

Forsøks-serie	Dato for smitte	Dato for telling	Volum vann per kar	Antall fisk per kar	Vekt fisk med std. avvik [g]	Antall kop. per kar	Forsøksgrupper
1	17.06.2016, 20.06.2016	04.07.2016	1,1 m ³	10	269 ±31 g	780	2 kontroller, 3 ultralyd
2	30.06.2016	13.07.2016	1,1 m ³	10	275 ±43 g	780	1 kontroll, 3 ultralyd
3	02.11.2016	15.11.2016	0,5 m ³	20	183 ±39 g	1200	2 kontroller, 3 ultralyd

3.2 Smitteforsøk

Alle forsøkene ble gjennomført med fisk og lus plassert i kar, med ultralydtransduceren plassert innenfor en nettingsylinder og med en stålkonstruksjon (heretter kalt «pyramiden») for å reflektere ultralyden utover, som illustrert i Figur 1 og Figur 3. Kontrollene ble enten gjennomført med denne konstruksjonen, eller med en tilsvarende nettingsylinder uten pyramide, for å kunne parallellisere forsøkene.



Figur 1 Bilde fra forsøksoppsett i forsøksserie 1 og 2. Transduceren er plassert innenfor et gitter og sender lyd mot en sekskantet "pyramide". Fisken svømmer rundt i området utenfor gitteret

I alle disse forsøkene er det benyttet lakselus-koepoditter som er produsert av og ved Havbruksstasjonen i Tromsø. Dette i henhold til metode godkjent av Mattilsynet (ref. id 7509). Selve produksjonen av smitteklare koepoditter foregår inne på luselaboratoriet på Landanlegget ved stasjonen. Laksen blir bedøvd og eggstrengene blir plukket forsiktig fra hunnlusen. Eggstrengene er festet til hunnlusen ved hjelp av en slags krok, og det er enkelt å fjerne strengene fra lusa kropp. Eggstrengene samles opp i samme vann som i karet de kom fra, og det er samme temperatur i inkubatoren som i dette karet med laks. Det er vanngjennomstrømming i inkubatorene frem til lusa er kommet i koepodittstadiet, det infeksjøs stadium.

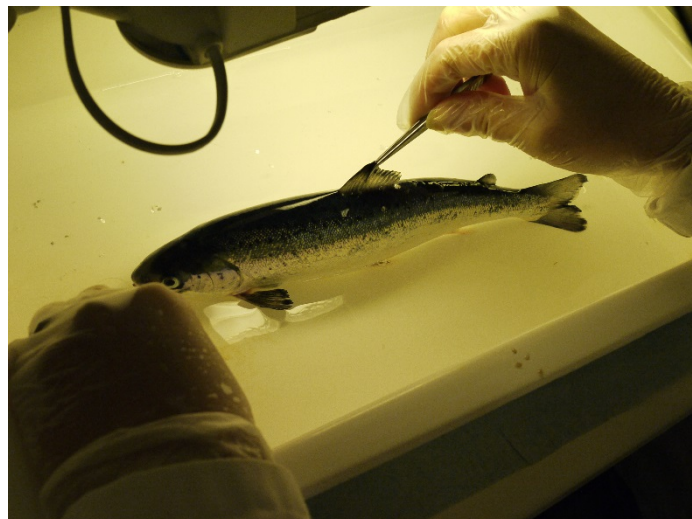
Det er nødvendig med en kvantifisering av koepoditter før de skal brukes i forsøk. Dette for å få en formening om tetthet og antall koepoditter som er produsert opp. Vannet med koepoditter

overføres til et stort begerglass. Fra denne tar en ut 3 x 10ml løsning, overfører dette til ei petriskål med rutenett og teller lus under ei lupe. Det er hensiktsmessig å inaktivere lusa slik at den ligger i ro og det blir lettere å telle. Det beregnes et gjennomsnitt av de tre tellingene, og antall lus per ml blir avdekket. Ut fra dette får man en god mulighet til å beregne hvor stor mengde (volum) smittemateriale en må tilsette karet for å få ønsket påslag av lus i forsøket.

Nofima har, sammen med Havbruksstasjonen, tidligere gjennomført en rekke mindre pilotforsøk med lakselus inne på luselaboratoriet. I disse forsøkene ble ulike parametere testet ut, for å bestemme egnet smittedose, optimal størrelse på laks i smitte og temperatur under smitte. Det er også sett nærmere på hvor lang smitteperioden skal/bør være, og mengde kopepoditter som må tilsettes for å oppnå ønsket påslag i forsøk. Med utgangspunkt i resultater fra disse pilotforsøkene ble antall kopepoditter for forsøksserie 1 og 2 satt til 780.

Forsøksserie 1 og 2 ble utført på avdeling utenfor luselaboratoriet. For disse forsøkene ble karet desinfisert med klor mellom hvert smitteforsøk. Det ble benyttet en konsentrasjon på 70 ppm aktivt klor i vannet, og holdetiden mellom hvert forsøk var på 40 minutter. Deretter kunne vann slippes ut av karet, karet skylles og fylles opp på nytt. Håv og alt av utstyr benyttet i hvert forsøk ble også desinfisert mellom hvert forsøk. Dette ble gjort etter instruks fra Mattilsynet i forkant av forsøket, og var en forutsetning for å få kjøre forsøkene utenfor luselaboratoriet. Selve smitteforsøket var også godkjent av forsøksdyransvarlige hos Mattilsynet (ref ID 8394). Forsøksserie 3 ble utført inne på luselaboratoriet med tillatelse fra Mattilsynet (ref ID 10520).

Felles for alle forsøkene er at fisken etter endt smitte ble overført til nye kar inne på luselaboratoriet. Her gikk fisken i karet frem til det var mulig å telle antall lus på fisken. Dette varierte i våre forsøk fra 13-17 dager etter smitte, avhengig av temperaturen i karet. Lusa er da kommet i sitt fastsittende stadium (chalimus 2), som er lett å få øye på av et trent øye. Laksen ble avlivet med overdose bedøvelse (Benzoak, 80 mg benzokain per liter vann) før telling av lus. For å få et nøyaktig tall på antall lus per fisk, og unngå «dobbel-tellinger», ble all lus plukket av fisken under tellingen.



Figur 2 Telling av lakselus

I forsøksserie 1 og 2 ble det observert at fisken oppholdt seg mest i den mørkeste delen av karet. I forsøksserie 2 og 3 ble det også observert at fisken i kar med ultralyd lettere lot seg skremme sammenlignet med fisken i kontrollkarene. I kontrollkarene lå fisken mer i ro uten å la seg skremme så lett. I forsøksserie 3 var fisken i kar med ultralyd også generelt mer aktiv.

I alle forsøkene ble vannet i karet oksygenert og oksygeninnholdet ble overvåket. Oksygentilførselen ble justert for å gi en oksygenmetning på rundt 90-100 %.

Forsøksserie 1 (17/6 og 20/6)

I forsøksserie 1 ble smitte av første kontrollgruppe gjennomført 17/6, og de resterende smitteforsøkene gjennomført 20/6. Forsøkene som ble utført 20/6 ble alle utført med kopepoditter som ble inkubert videre fra forsøket 17/6. De var fortsatt aktive og bevegde seg (under lupen), men det blir likevel en liten usikkerhet knyttet til smitematerialet i forhold til hvor infeksjøs/interesserte de er i forhold til å feste seg til verten. Erfaring fra tidligere forsøk ved Havbruksstasjonen tilsier at tidsvinduet for vellykket smitte er begrenset.

Forsøksserie 2 (30/6)

I denne runden ble alle forsøk, 1 kontroll og 3 ultralyd, kjørt under de samme betingelsene. Kopepodittene var aktive og i rett stadium, og det ble benyttet ca. 780 stk. per smitte. Det var 10 laks i hver forsøksgruppe.

Forsøksserie 3 (2/11)

De fem siste smitteforsøkene ble alle gjort inne på luselaboratoriet i et 500L kar. Ettersom påslaget i forsøksserie 1 og 2 ble lavere enn planlagt, ble antallet kopepoditter økt til 1200 i denne forsøksserien. Kopepodittene ble fordelt rundt i karet ved omrøring før tilsetning av laksen. I de foregående forsøkene ble laksen tilsatt først. Samme batch av smitemateriale (kopepodittene) var utgangspunkt for alle fem forsøkene.

Det ble benyttet 20 laks i hver forsøksgruppe. I forsøkene med ultralyd var fisken relativt aktiv, og bevegde seg kontinuerlig rundt i karet. I ultralydforsøkene opplevde vi også at to fisk hoppet ut av karet under smitteperioden. Denne fisken ble lagt tilbake i karet, tilsynelatende i god form. I kontrollforsøkene var fisken roligere. I kontrollgruppe 1 lå nesten all fisken på bunnen etter ca. 15 minutter, og noen lå også på siden. Disse ble «jaget» litt rundt for å gi forsøksbetingelser som var mer tilsvarende ultralydgruppene. I kontrollgruppe 2 måtte fisken også «jages» litt rundt, men her ble fisken noe mer aktiv igjen etter 45 minutter.

3.3 Transducere og lydmålinger

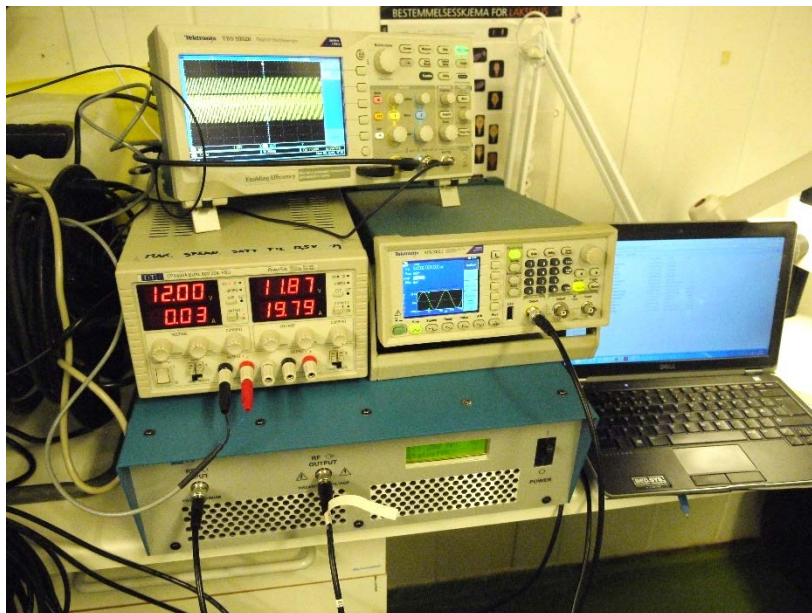
Transducere med senterfrekvenser på 8.25, 20.00 og 59.45 kHz ble kjøpt fra Benthowave Instrument Inc., Ontario, Canada. Hver transducer hadde en innebygget krets for tilpasning av elektrisk impedans, slik at inngangsimpedansen var på 50 Ohm rundt transducerens senterfrekvens. De viktigste transducer-spesifikasjonene er oppsummert i Tabell 1.

Forsøksserie 1 og 2 ble gjennomført i et vannkar med dimensjoner som vist i Figur 2 a), med en vannstand på rundt 63 cm og et totalt vannvolum på rundt 1,1 m³. I forsøksserie 3 ble det av praktiske årsaker brukt et mindre kar, med dimensjoner som vist i Figur 2 b), en vannstand på rundt 63 cm og et totalt vannvolum på rundt 0,5 m³. Transducere ble montert over karet, med den vibrerende flaten plassert et stykke under vannflaten. En sekskantet «pyramide» (konstruert spesielt for dette forsøket)

ble plassert i bunnen av karet, under transduceren, for å reflektere lyden utover og gi en mer uniform lydfordeling. Et sylindrisk nettingbur ble plassert utenpå pyramiden for å skjerme fisk fra potensielt skadelige kavitasjonseffekter nært transduceren.

Transducerne ble drevet med et sinussignal generert av en Tektronix AFG2021 signalgenerator og forsterket med en E&I 1040L effektforsterker. Påtrykt og reflektert effekt til/fra transduceren ble lest av fra et display på forsterkeren mens forsøkene pågikk. Påtrykt frekvens for hver transducer ble valgt gjennom å variere frekvensen i nærheten av senterfrekvensen, og velge den frekvensen som ga lavest reflektert effekt. Påtrykt frekvens og påtrykt/reflektert effekt er oppsummert i Tabell 3. Påtrykt effekt ble satt til 50 % eller lavere enn maksimum effekt oppgitt av produsenten, for å minimere risikoen for å overbelaste transduceren. Gjennom smitteforsøkene på en time steg vanligvis den reflekterte effekten fra transduceren, og reflektert effekt er derfor oppgitt med minimums- og maksimumsverdier. En mulig forklaring på dette er at kretsen for impedanstilpasning etter hvert varmes opp og gir noe dårligere tilpasning.

Lydnivåene i vannkarene ble målt med en Reson TC4013 hydrofon, en Reson EC6067 ladningsforsterker, og et Tektronix TBS1052B oscilloskop. Den kombinerte sensitiviteten til hydrofonen og forsterkeren var -212 dB re $1\text{V}/\mu\text{Pa}$, med en usikkerhet på ± 3 dB (oppgitt av produsenten). Lydstyrken ble målt som RMS-verdier på oscilloskopet, men på grunn av raske fluktuasjoner i lydstyrke, var det vanskelig å gjøre nøyaktige målinger. I forsøksserie 1 og 2 ble dette håndtert ved å studere RMS-verdiene over ca 10 sekunder, og så estimere en enkelt representativ RMS-verdi. I forsøksserie 3 ble det gjort 5 «opptak» av lydsignalet for hver måleposisjon (bruk av «single»-funksjonalitet på oscilloskopet), og gjennomsnittsverdien for de 5 opptakene ble beregnet og notert.



Figur 3 Oppsett for generering og måling av lyd under forsøket

Lydnivåene ble målt i 12 forskjellige måleposisjoner, som vist i Figur 3. Hydrofonen ble plassert rundt 30 cm under vannflaten. Gjennomsnittsverdier og standardavvik for lydmålingene er oppgitt i Tabell 3. Merk at siden deciBel-skalaen er logaritmisk, tilsvarer positivt og negativt standardavvik ulike verdier. Lydnivåene ved 9,3 og 21 kHz er omtrent de samme, mens lydnivået ved 54 kHz er noe lavere. Dette skyldes først og fremst at transduceren som ble brukt til 54 kHz ble drevet med en lavere elektrisk

effekt. Det ble også målt langt høyere lydnivåer i forsøksserie 3 (rundt 20 dB høyere). Dette skyldes mest sannsynlig at vannvolumet var mindre i dette tilfellet. En annen effekt som delvis kan ha bidratt er at hydrofonene var plassert noe nærmere transduceren i forsøksserie 3.

Hver av transduserne ble testet for kavitasjonseffekter gjennom å holde et stykke aluminiumsfolie foran transduceren, i en avstand på noen cm. I tilfeller der lydintensiteten er høy nok til at det dannes kavitasjonsbobler, vil disse erodere aluminiumsfolien og gi synlige hull og «bulker» (Zeqiri et al. 2006). Et eksempel på dette er vist i Figur 4. Slike effekter var tydelige ved 9,3 og 21 kHz, men ikke synlige ved 54 kHz.



Figur 4 Aluminiumsfolie perforert av kavitasjonseffekter

Tabell 2 Transducer-spesifikasjoner

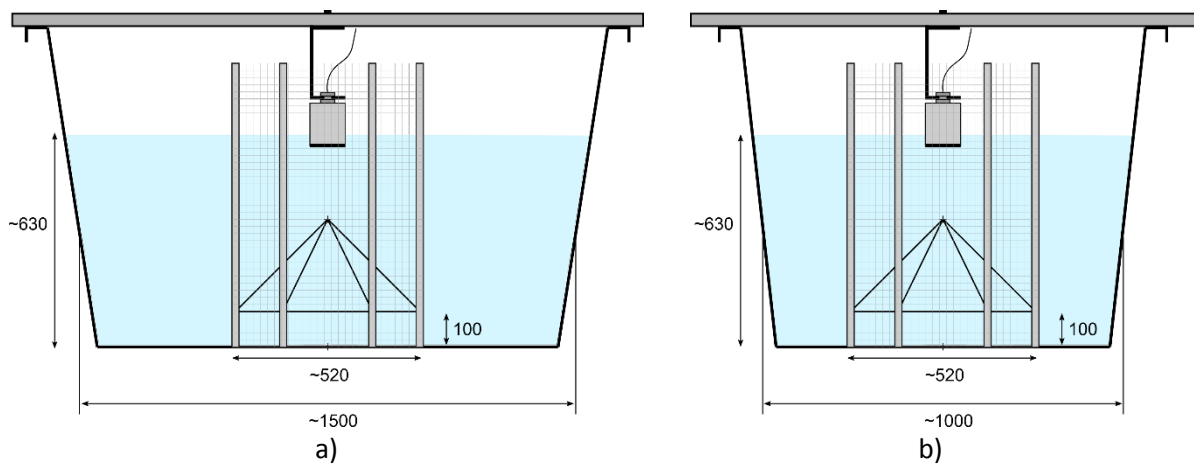
Modell-nummer	Senterfrekvens [kHz]	Maks. elektrisk effekt [W]	Båndbredde [-3 dB]	Diameter og høyde [mm]	Vekt[kg]
BII-7509	8,25	180	2,0	88 x 200	2,35
BII-7502	20,00	120	4,0	100 x 170	2,10
BII-7506	59,45	50	25	48 x 120	0,60

Tabell 3 Transducer-parametere og lydmålinger

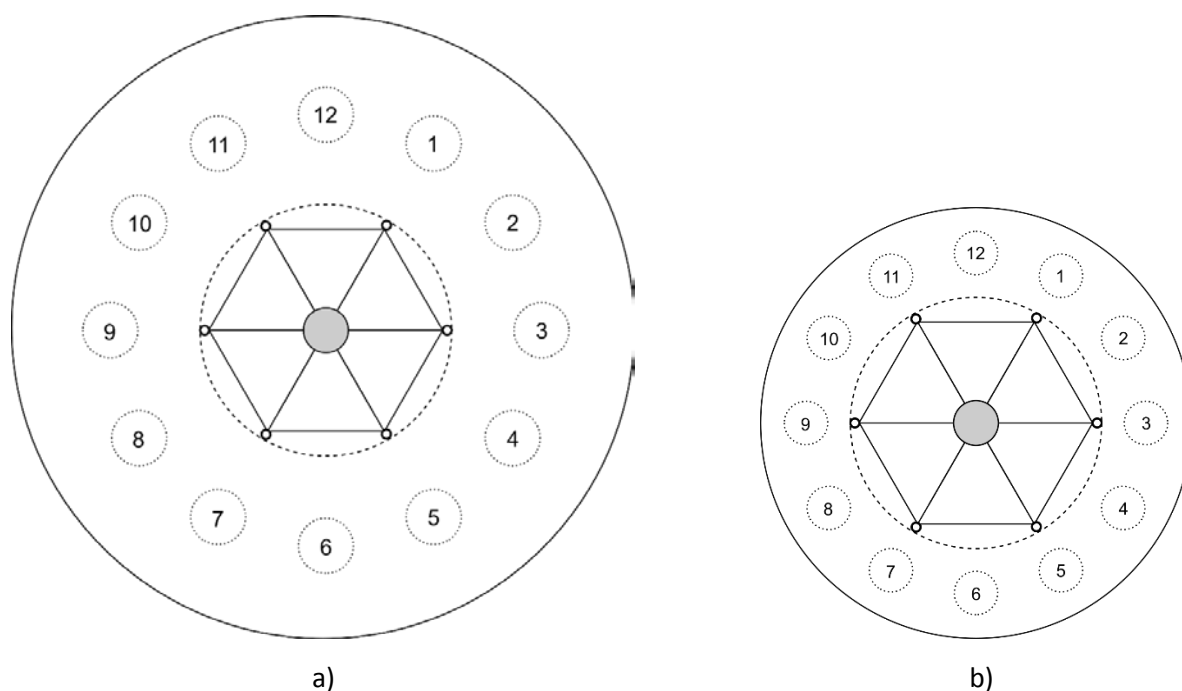
Transducer	Frekvens [kHz]	Påtrykt effekt [W]	Reflektert effekt [W]	Forsøk	Lydtrykk [kPa, gj.snitt ±SA]	Lydtrykk [dB re 1V/μPa, gj.snitt ±SA]
BII-7509	9,30	60	11-14	1, 2	7,4 ± 2.6	197,4 ^{+2.6} _{-3.7}
				3	107 ± 19	220,6 ^{+1.4} _{-1.7}
BII-7502	21,00	60	5-8	1, 2	7,4 ± 3.0	197,4 ^{+3.0} _{-4.6}
				3	77 ± 29	217,7 ^{+2.7} _{-4.0}
BII-7506	54,00	25	2-5	1, 2	4,7 ± 1.5	193,5 ^{+2.4} _{-3.3}
				3	46 ± 16	213,2 ^{+2.7} _{-3.9}



Figur 5 Ultralydtransducere brukt i eksperiment. Fra venstre: BII-7509 (9,3 kHz), BII-7502 (21 kHz), BII-7506 (54 kHz)



Figur 6 Kar fylt med vann, med transducer, netting-sylinder og seks-kantet "pyramide» for å reflektere lyd utover mot veggene i karet. a) Kar brukt i forsøksserie 1 og 2, b) kar brukt i forsøksserie 3



Figur 7 Måleposisjoner for lydmålinger med hydrofon. a) er kar brukt i forsøksserie 1 og 2, og b) er kar brukt i forsøksserie 3

3.4 Lusetelling - statistisk analyse

Hensikten med smitteforsøkene var å teste følgende hypoteser:

- *Nullhypotese, H_0* : Bruk av ultralyd under smitteforsøk påvirker ikke påslag av lus.
- *Alternativ hypotese, H_1* : Bruk av ultralyd under smitteforsøk gir en endring, dvs. en økning eller reduksjon, av påslag av lus.

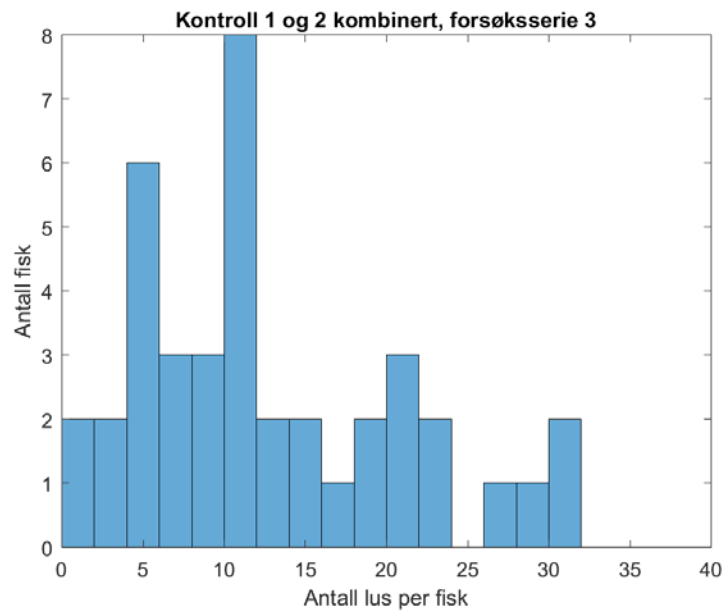
Hypotesene testes gjennom å sammenligne påslag av lus i forsøk som inkluderer ultralyd med påslag i kontrollforsøk uten ultralyd. Den alternative hypotesen godtas kun dersom antallet lus i ultralyd-gruppene er signifikant forskjellige fra antallet lus i kontrollgruppene.

Dersom man kan anta at datasettene følger en normalfordeling, kan signifikansen testes med en Student's T-test (Walpole et al. 2002). Ettersom dette er en mye anvendt metode for hypotesetesting, er metoden også inkludert i denne studien.

Resultatene fra lusetelling indikerte imidlertid at antall lus innen hver forsøksgruppe sannsynligvis ikke er normalfordelt. Et eksempel på dette er vist i histogrammet i Figur 3, som viser fordelingen i antall lus per fisk for de to kontrollgruppene i forsøksserie 3. Fordelingen har en topp rundt 5-10 lus, og en lang «hale» som strekker seg opp mot 30 lus per fisk.

I tilfeller der den statistiske fordelingen ikke er kjent kan såkalt ikke-parametrisk statistikk være bedre egnet. I denne studien har vi inkludert en metode fra denne kategorien, Wilcoxon's rank-sum test (Wilcoxon 1945; Krzywinski & Altman 2014), heretter kalt WRS-test. Denne metoden setter ingen krav til den statistiske fordelingen, men er noe mindre sensitiv for statistisk signifikante forskjeller.

Hypotesetesting gjøres med standard 95 % signifikansnivå for både T-test og WRS-test. Ettersom man tester for en endring av påslag, og ikke kun en reduksjon av påslag, gjøres hypotesetesten tosidig. Dette betyr at dersom testen indikerer signifikant lavere eller høyere påslag av lus i en gruppe med ultralydbehandling, er den estimerte sannsynligheten 2,5 % eller mindre for at den faktiske gjennomsnittsverdien er den samme som i kontrollen.



Figur 8 Eksempel på histogram fra lusetelling

4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

4.1 Resultater

4.1.1 Presentasjon av resultatene

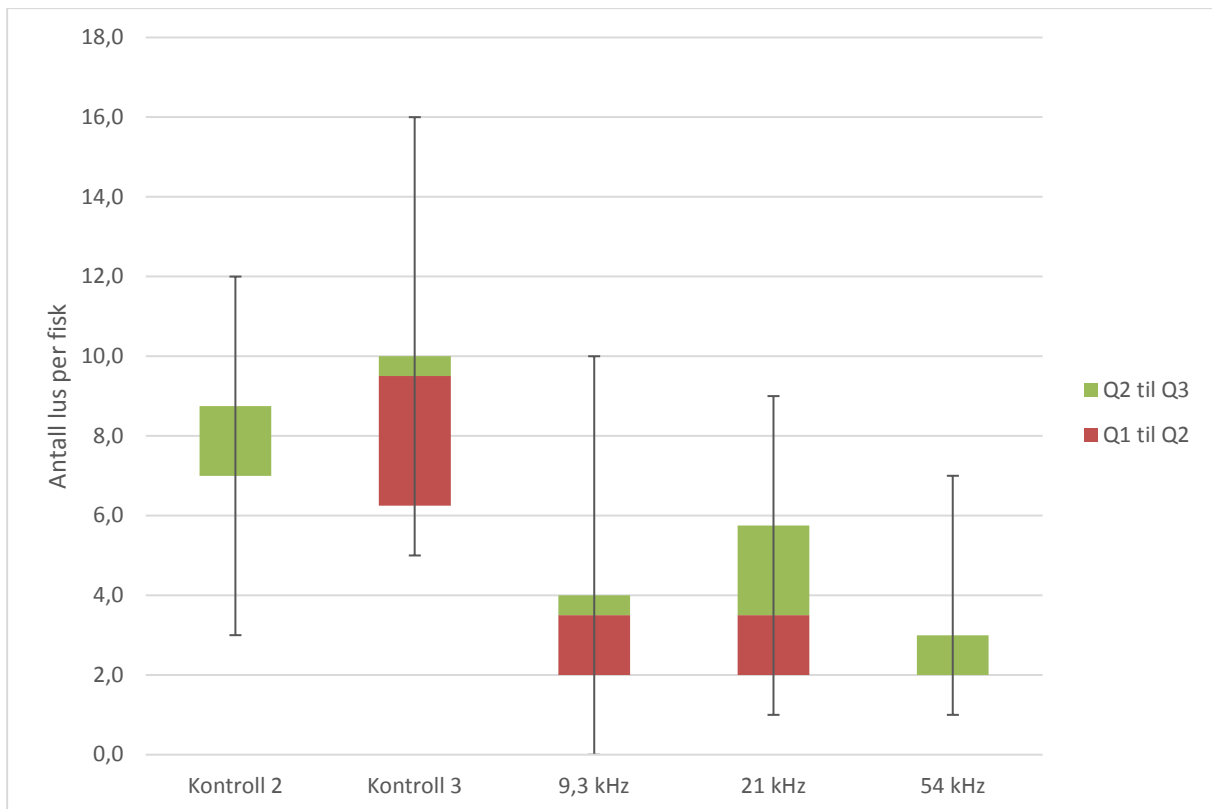
Alle resultatene fra lusetelling er presentert på samme måte; i et såkalt «box-and-whisker»-plott. Et eksempel på dette er vist i figur Figur 6. Plottet er basert på kvartilene fra datasettet, kalt Q1, Q2 og Q3:

- **Q1:** 25 % av antallet fisk har like mange eller færre antall lus enn denne verdien
- **Q2** (også kalt median): 50 % av antallet fisk har like mange eller færre lus enn denne verdien
- **Q3:** 75 % av antallet fisk har like mange eller færre lus enn denne verdien

Avstanden fra Q1 til Q2 er indikert med en rød boks, og avstanden fra Q2 til Q3 er indikert med en grønn boks. Overgangen mellom rød og grønn indikerer medianverdien. Verdier som anses som ekstreme (statistiske uteliggere) plottes individuelt som blå prikker, og rekkevidden mellom minimums- og maksimumsverdiene til hver gruppe (uten uteliggere) er indikert med svarte vertikale streker.

4.1.2 Forsøksserie 1

Resultatene fra forsøksserie 1 er vist i Figur 4. Variasjonen innenfor hver gruppe er betydelig, både for kontrollene og ultralyd-gruppene, men ultralyd-gruppene ligger generelt noe lavere enn kontrollene. Dersom man slår sammen kontroll 2 og 3 til en enkelt kontrollgruppe, og sammenligner ultralydgruppene med denne, har alle ultralydgruppene signifikant lavere antall lus, som vist i Tabell 4.



Figur 9 Resultater av lusetelling fra forsøksserie 1. For kontroll 2 og 54kHz er Q1 og Q2 identiske og den røde boksen er derfor ikke synlig. Q1 og Q2 tilsvarer her nedre del av den grønne boksen. Medianverdi for kontroll 2 og 3 kombinert er 7,5. Kontrollforsøkene er nummerert 2 og 3 fordi det ble gjort et kontrollforsøk nummer 1 som test for justering av forsøksoppsettet. Kontroll 1 er ikke inkludert her

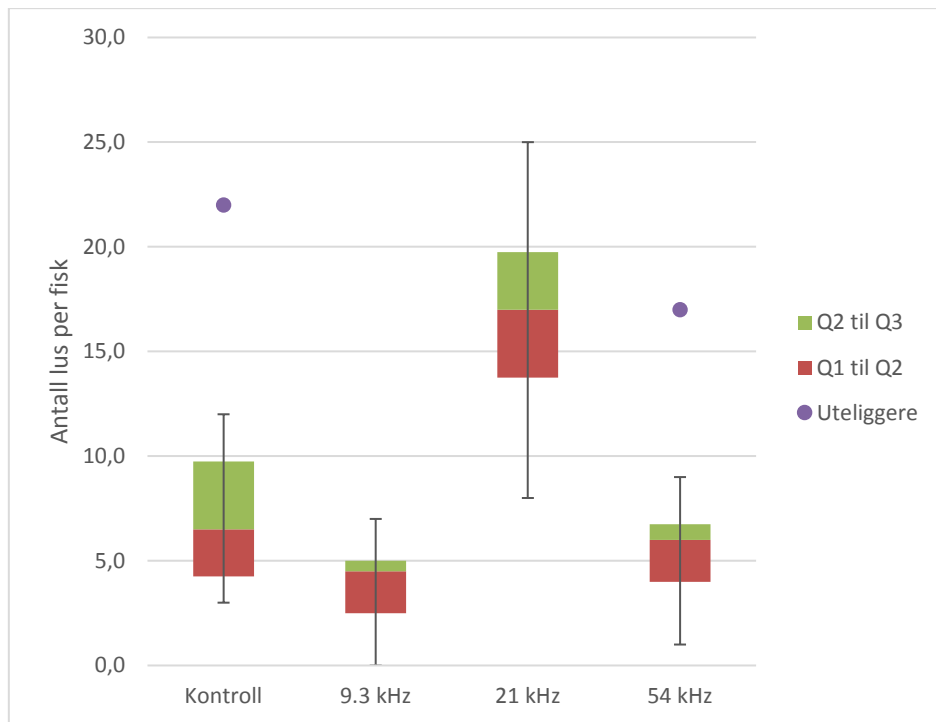
Tabell 4 Resultater av hypotesetesting i forsøksserie 1

		9,3 kHz	21 kHz	54 kHz
Signifikant forskjellig fra kontroll 2 og 3 kombinert	T-test	Ja	Ja	Ja
	WRS-test	Ja	Ja	Ja

4.1.3 Forsøksserie 2

Resultatene fra forsøksserie 2 er oppsummert i Figur 6, med tilhørende resultater av hypotesetesting vist i Tabell 5. Det mest oppsiktsvekkende resultatet her er at ultralydgruppen med 21 kHz har et signifikant høyere antall lus enn kontrollgruppen.

For 9,3 kHz-gruppen indikerer T-test en signifikant forskjell fra kontrollen, mens WRS-testen ikke gjør det. 9,3 kHz-resultatene utgjør altså et grensetilfelle, men ettersom antall lus ikke ser ut til å være normalfordelt, tillegges WRS-testen mer vekt, og totalt sett anses ikke 9,3 kHz-gruppen som signifikant forskjellig fra kontrollen. 54 kHz-gruppen er tydelig ikke signifikant forskjellig fra kontrollen.



Figur 10 Resultater av lusetelling fra forsøksserie 2

Tabell 5 Resultater av hypotesetesting i forsøksserie 2

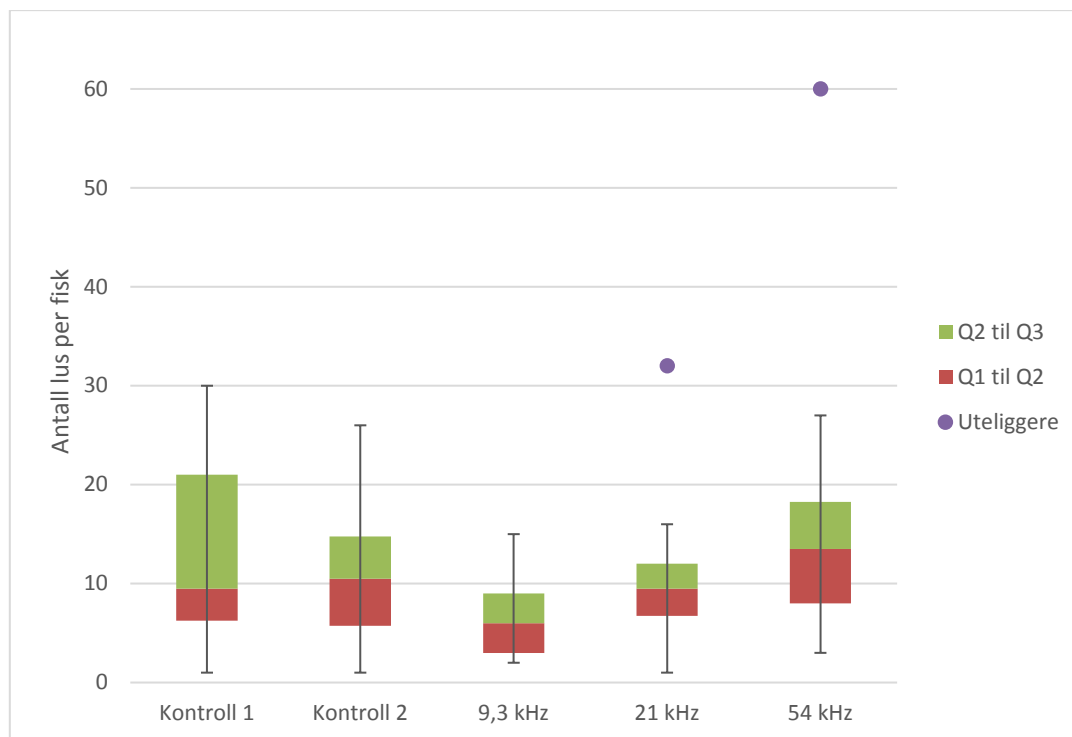
		9,3 kHz	21 kHz	54 kHz
Signifikant forskjellig fra kontroll	T-test	Ja	Ja	Nei
	WRS-test	Nei	Ja	Nei

4.1.4 Forsøksserie 3

Resultatene fra forsøksserie 3 er oppsummert i Figur 7, med tilhørende resultater av hypotesetesting vist i Tabell 6. I denne forsøksserien inneholder hver gruppe 20 fisk, sammenlignet med 10 fisk per gruppe i serie 1 og 2. Dette gjør at resultatene statistisk sett er mer pålitelige.

Kontrollgruppene har relativt like fordelinger, noe som indikerer at resultatene er konsistente mellom de to kontrollforsøkene. Av ultralydgruppene er det kun 9,3 kHz som er signifikant forskjellig fra kontroll 1 og 2.

Dersom man sammenligner ultralydgruppene ser man også en tendens til sammenheng mellom frekvens og antall lus. Antallet er lavest for 9,3 kHz, noe høyere for 21 kHz, og høyest for 54 kHz.



Figur 11 Resultater av lusetelling fra forsøksserie 3. Medianverdi for kontroll 1 og 2 kombinert er 10

Tabell 6 Resultater av hypotesetesting i forsøksserie 3

		9,3 kHz	21 kHz	54 kHz
Signifikant forskjellig fra kontroll 1 og 2 kombinert	T-test	Ja	Nei	Nei
	WRS-test	Ja	Nei	Nei

4.2 Diskusjon

I denne studien ble det gjennomført 3 forsøksserier. I de to første seriene ble antall kopepoditter bestemt med utgangspunkt i tidligere smitteforsøk gjort i relativt små kar. Resultatene fra lusetelling viste at påslaget av lus var lavere enn det som var ønskelig for å få et statistisk signifikant resultat, med en median på 7,5 for kontrollene i forsøksserie 1 og median på 7 for kontrollen i forsøksserie 2. I forsøksserie 3 ble antallet kopepoditter derfor økt fra 780 til 1200, og vannvolumet ble redusert fra 1,1 til 0,5 m³. Dette betyr at antall kopepoditter ble økt med rundt 50 %, og at antall kopepoditter per volum vann ble økt med rundt 240 %. I forsøksserie 3 hadde kontrollgruppa en median på 10 lus, dvs. en økning på 35-40 %. Påslaget ser ikke ut til å være proporsjonalt med konsentrasjonen av kopepoditter.

Metoden for eksponering av ultralyd som er brukt i denne studien kan sammenlignes med å plassere en basshøytaler i et lite rom med harde vegger; lydfeltet preges i stor grad av refleksjoner fra veggene i tillegg til direktelyd fra lydkilden. Dette fører til konstruktiv og destruktiv interferens mellom reflekterte lydbølger, med sterk variasjon i lydstyrke både romlig og over tid. Dersom transduceren ble plassert i tilnærmet fritt rom, f.eks. ute i havet uten større reflekterende flater i nærheten, ville lydstyrken være tilnærmet konstant over tid, og avta jevnt med økende avstand til transduceren. Metoden i denne studien gir altså ikke et lydfelt som er representativt for en praktisk implementasjon

av ultralyd som metode for lusebekjempelse i havet. Vi anser det uansett som sannsynlig at alle deler av vannvolumet i studien har hatt en lydstyrke som er like kraftig eller kraftigere enn det man vil kunne oppnå ved en praktisk implementasjon av metoden i havet.

Resultatene fra forsøksserie 1 indikerer at ultralyd under smitte gir redusert påslag, for alle frekvenser. Variasjonen innad i hver gruppe er likevel stor, og antallet fisk er så lite at man bør være forsiktig med å tillegge resultatene for stor vekt. I forsøksserie 2 er det kun 21 kHz som tydelig skiller seg ut, med *høyere* påslag enn kontrollen. Verken tidligere litteraturstudier (Mortensen & Skjelvareid 2015) eller øvrige resultater i denne studien tilsier at ultralyd skal gi økt påslag, og dette anses derfor som usannsynlig. En mulig forklaring er at det har skjedd en feil i forbindelse med forsøket, for eksempel at antallet kopepoditter ble feil oppmålt for denne gruppa. En annen mulig forklaring er at forsøket generelt har så stor variabilitet i påslag og så lite antall fisk at det høye antallet i dette tilfellet kan skyldes en tilfeldighet.

Forsøksserie 3 har generelt høyere påslag enn forsøksserie 2 og 3, og dobbelt så mange fisk i hver gruppe. Resultatene fra denne serien anses derfor som statistisk sett mer pålitelige. I denne serien er det kun 9,3 kHz-gruppa som er signifikant forskjellig fra kontrollene. Igjen gir den store variabiliteten innad i hver gruppe grunn til å være forsiktig med å tolke resultatene. Dersom ultralyden har gitt en effekt, er det kun som en viss reduksjon i påslag, og ikke som en tydelig hemming av alle kopepoditter i karet.

Dersom man tar utgangspunkt i at ultralyden faktisk har en effekt, er det interessant å studere hvordan påslaget tilsynelatende øker med økende frekvens i forsøksserie 3. En forklaring på dette kan være at lave frekvenser hemmer kopepodittene i større grad enn høye frekvenser. En annen mulig forklaring er at kavitaseffektene i karet er kraftigere ved lave frekvenser, ettersom terskelen for å oppnå kavitasjon er lavere ved lave frekvenser (Santos et al. 2009). Kopepodittene driver fritt med vannmassene i karet, og en viss andel av disse vil komme nært nok transduceren til å eksponeres for kavitasijonsbobler som kollapser. Dersom disse effektene dreper kopepodittene, vil dette senke det generelle smittepresset i karet, selv om kavitaseffektene ikke strekker seg helt ut til området der fisken svømmer. Dersom dette er tilfelle, indikerer resultatene en annen effekt enn den som i utgangspunktet skulle testes, dvs. om ultralyd kan påvirke adferden til kopepodittene uten nødvendigvis å drepe dem. Effektene av kavitasjon kan eventuelt undersøkes i en oppfølging av denne studien, for å gi et mer definitivt svar på om den tilsynelatende reduksjonen i påslag skyldes kavitaseffekter eller ultralyden i seg selv.

I forsøksserie 1 ble det ikke observert noen forskjell i adferd mellom fisken som ble eksponert for ultralyd og fisken i kontrollgruppene. I forsøksserie 3 var imidlertid fisken som ble eksponert for ultralyd tydelig mer aktiv. I forsøksserie 2 ble det observert lignende, men ikke like tydeligere tendenser; fisken i ultralyd-gruppene så ut til å være mer lettskremt. Dette kan sees i sammenheng med lydnivåene som ble brukt i forsøkene, som var betydelig høyere i forsøksserie 3 enn i serie 1 og 2. Det er mulig at lydnivået i forsøksserie 3 var så høyt at fisken kunne merke dette tydelig på kroppen, på tross av at frekvensen som ble brukt ligger langt over fiskens hørselsområde. Dersom dette er tilfelle, betyr det at eksponering for ultralyd med høy intensitet kan føre til økt stressnivå hos fisken, med påfølgende redusert velferd og vekst over tid. Dette er et moment må tas med i vurderingen ved en eventuell implementasjon i stor skala.

Resultatene i denne studien varierer en del mellom forsøksseriene. Dersom ultralyden har en effekt, ser det ut til at frekvenser innenfor det hørbare området for mennesker (9,3 kHz i denne studien) er mer effektive enn ultralyd-frekvenser (høyere enn 20 kHz). Det er uansett kun snakk om en delvis reduksjon i påslag, og ikke en fullstendig inaktivering av kopepodittene, som man i utgangspunktet hadde håpet på. I denne studien har man også oppnådd svært høye lydnivåer gjennom å begrense vannvolumet til 0,5-1,1 m³. Disse lydnivåene er langt høyere enn det man kan håpe å oppnå i praksis ved utplassering av transducere i en laksemerd. Ved lavere lydnivåer vil den svake effekten som denne studien indikerer sannsynligvis bli enda svakere. Som nevnt tidligere er det også uklart om effekten skyldes kavitasjon, og dermed begrenser seg til en rekkevidde på noen titalls centimeter fra transduceren, eller om den skyldes ultralyden i seg selv, noe som vil gi den større rekkevidde.

Effekter av behandling er svært ofte doseavhengig, der dose defineres som «pådrag» (ofte konsentrasjon) multiplisert med tid. I våre forsøk ble fisken og lusa utsatt for høyere doser av lyd enn de vil bli i laksemerder, ikke bare fordi lydstyrken var høyere enn man i gjennomsnitt vil oppnå i ei merd, men også fordi den høye lyden vedvarte kontinuerlig i en time. I ei åpen merd vil kopepodittene drifte med vannstrømmen gjennom merden. I ei 160 meters merd blir oppholdstiden i merden på ca 17 minutter ved en strømhastighet på 5 cm/s. Selv om kopepodittene blir eksponert for lyden i en viss tid, både før de kommer inn i merden og etter at de har passert merden, vil den effektive eksponeringstiden sannsynligvis bli mindre enn i våre forsøk. Det er verd å merke seg at begroingsorganismer som sitter på notveggen vil kunne utsettes for kontinuerlig ultralydlyd, og dermed få betydelig større doser enn kopepoditter som drifter gjennom merden. Det kan derfor ikke utelukkes at ultralyd kan redusere begroing på notvegg, flytekrage og andre installasjoner i merdanlegget.

4.3 Konklusjoner

- Kontrollert smitte med lakselus i kar gir stor variasjon i påslag av lus innenfor grupper som er likt behandlet. Med et begrenset antall fisk i forsøket er det vanskelig å oppnå nøyaktige estimater for gjennomsnittlig påslag innen hver gruppe, og dermed også vanskelig å konkludere angående hvilken effekt ultralyden eventuelt har på påslaget.
- I den statistisk sett mest pålitelige forsøksserien ble det påvist reduksjon av lusepåslag ved frekvensen 9,3 kHz. For frekvensene 21 kHz og 54 kHz var påslaget ikke signifikant forskjellig fra kontrollene.
- Med de inngangseffekter som ble brukt i studien ble det påvist kavitasjonseffekter ved frekvensene 9,3 og 21 kHz. Terskelen for kavitasjon er også generelt lavere ved lave frekvenser, og det antas derfor at kavitasjonseffektene var sterkest ved 9,3 kHz. Det er mulig at den observerte reduksjonen i påslag av lus ved 9,3 kHz skyldes disse kavitasjonseffektene. Dette bør undersøkes i en eventuell oppfølging av denne studien.
- Studien er gjennomført med svært høye lydstyrker i et avgrenset volum med vann, og ved utplassering av transducere i åpent hav vil den oppnådde lydstyrken bli mindre. Effekten ved bruk av ultralyd ved 9,3 kHz som er påvist i denne studien antas derfor å ville bli svakere ved implementasjon av metoden i en laksemerd.
- Basert på resultatene fra labforsøkene i denne studien anser vi det som usannsynlig at ultralyd vil kunne være en effektiv metode for lusekontroll i laksemerder.

4.4 Takk til bidragsytere

Forfatterne ønsker å takke Anette Hustad ved Havbruksstasjonen i Tromsø for god hjelp med produksjon av smittemateriale og gjennomføring av smitteforsøkene.

5 Leveranser

Resultatene fra prosjektet vil bli gjort tilgjengelig via:

- Faglig rapport (dette dokumentet).
- Foredrag ved seminar om ikke-medikamentell lusekontroll arrangert av FHF (7. februar 2017).
- Populærvitenskapelig artikkel i dertil egnet tidsskrift, for eksempel Norsk Fiskeoppdrett.
- Vitenskapelig artikkel i internasjonal journal med fagfellevurdering.

6 Referanser

- Brennen, C.E., 2005. *Fundamentals of multiphase flows*, Cambridge University Press. Available at: <http://authors.library.caltech.edu/25021/2/cabook.pdf>.
- Bron, J.E. et al., 1991. The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, *Salmo salar*. *Journal of Zoology*, 224(2), pp.201–212. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04799.x> [Accessed December 7, 2016].
- Børstad, J. & Trana, K., 2016. Ultralyd skal bekjempe lakselus. *nrk.no*. Available at: <https://www.nrk.no/trondelag/ultralyd-skal-bekjempe-lakselus-1.12906571>.
- Guo, S. et al., 2012. Inhibition of barnacle cyprid settlement using low frequency and intensity ultrasound. *Biofouling*, 28(2), pp.131–41. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2012.658511> [Accessed June 18, 2015].
- Guo, S.F. et al., 2011. Effect of ultrasound on cyprids and juvenile barnacles. *Biofouling*, 27(2), pp.185–92. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2010.551535> [Accessed June 17, 2015].
- Hallez, L. et al., 2010. Characterization of HIFU transducers designed for sonochemistry application: Cavitation distribution and quantification. *Ultrasonics*, 50(2), pp.310–317.
- Hamre, L.A. et al., 2013. The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages M. Krkosek, ed. *PLoS ONE*, 8(9), p.e73539. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073539> [Accessed December 7, 2016].
- Hemming, G., 2016. Sonic Norway. Available at: <http://sonicnorway.no/> [Accessed December 2, 2016].
- Iversen, A. et al., 2016. The cost impact of lice in Norwegian salmon farming - Presentation at “Zero LICE”, Day zero of the NASF 2016, Bergen March 1.
- Krzywinski, M. & Altman, N., 2014. Points of significance: Nonparametric tests. *Nature Methods*, 11(5), pp.467–468. Available at: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nmeth.2937> [Accessed November 17, 2016].
- Legg, M. et al., 2015. Acoustic methods for biofouling control: A review. *Ocean Engineering*, 103, pp.237–247. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0029801815001572> [Accessed June 17, 2015].
- Mortensen, A. & Skjelvareid, M.H., 2015. Ultralyd - et nytt våpen i kampen mot lakselusa? *Nofima rapport*, (2015/31). Available at: <https://nofima.no/pub/1257252/>.
- Moussatov, A., Granger, C. & Dubus, B., 2003. Cone-like bubble formation in ultrasonic cavitation field. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(4), pp.191–195.
- Popper, A.N., 2008. *Effects of Mid-and High-Frequency Sonar on Fish* *Effects of Mid-and High-Frequency Sonars on Fish (Report for Naval Undersea Warfare Center Division, Contract N66604-07M-6056)*, Available at: http://www.agriculturedefensecoalition.org/sites/default/files/file/us_navy/17S_5_2008_U.S._Navy_Effects_of_Mid_High_Frequency_Sonars_on_Fish_Contracted_Report_February_21_2008.pdf [Accessed July 6, 2016].
- Santos, H.M., Lodeiro, C. & Capelo-Martinez, J.-L., 2009. The Power of Ultrasound. In *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*. WILEY-VCH. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.519.5260&rep=rep1&type=pdf>.
- Walpole, R.E. et al., 2002. *Probability and statistics for engineers and scientists* 7th ed., Prentice Hall.

- Wilcoxon, F., 1945. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 1(6), p.80. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/3001968?origin=crossref> [Accessed November 29, 2016].
- Zeqiri, B., Hodnett, M. & Carroll, A.J., 2006. Studies of a novel sensor for assessing the spatial distribution of cavitation activity within ultrasonic cleaning vessels. *Ultrasonics*, 44(1), pp.73–82.

