

Dato: 26.03.2021

Faglig sluttrapport
FHF-prosjekt 901651

Ny metode for å redusere lakselus ved hjelp av kitinolytiske enzymer: Verifiseringsforsøk

1. Sammendrag

Sammendrag

I dette prosjektet er en helt ny metode for å kontrollere lakselus blitt vurdert av uavhengig tredjepart. Test-behandlingen bruker kitinolytiske enzymer til å angripe kitin hos lakselus. Både effektivitet av behandlingsmetoden og dyrevelferdsmessige sider av metoden ble vurdert. Fisk infisert med lakselus ble fordelt i to kar, hvor det ene karet ble behandlet med kitinolytiske enzymer mens det andre karet fungerte som en kontrollgruppe. Ved hjelp av individbaserte velferdsindikatorer, observasjoner og histopatologiske undersøkelser, ble det dokumentert at test-behandlingen ikke påvirket fisken. Metoden er altså skånsom mot fisken og derfor dyrevelferdsmessig forsvarlig.

I forsøket observerte vi også en større reduksjon i antall lus i behandlingsgruppa sammenlignet med kontrollgruppa, men den estimerte effekten var ikke statistisk signifikant. En forklaring på dette kan være at enzymene som ble brukt i forsøket ikke var aktive nok, sannsynligvis fordi de ikke hadde optimale miljøforhold (pH og temperatur). Det finnes løsninger for å øke effekten til enzymene: for eksempel ved å 1) øke konsentrasjonen av enzymene, 2) øke behandlingstida, eller 3) bruke andre enzymer som er bedre tilpasset miljøforholdene. En alternativ forklaring kan være at lusene gjemmer seg i et slimlag på fiskens overflate, og at enzymene derfor ikke kommer i direkte kontakt med substratet (altså kitin). Dette går det an å studere nærmere i videre forskning. Videre forskning bør også fokusere på å finne et strategisk tidspunkt i lakselusas livssyklus å behandle på.

Abstract

In this project, a novel method to control sea lice was assessed by independent third party. The method is based on the use of chitinolytic enzymes to attack chitin in the exoskeleton of sea lice. Our aim was to evaluate the effect of the treatment, as well as the fish welfare aspect of the method. Infested fish were split into two groups, whereof one was treated with chitinolytic enzymes, and the other was considered a control group. Documentation of individual based welfare indicators, observations, and histopathological examinations revealed that the test-treatment did not affect the fish. That the method is gentle to the fish, is considered beneficial in an animal welfare point of view.

During the test, a greater reduction in the number of sea lice was observed in the treatment group compared to the control group, but the estimated effect was not statistically significant. This can be explained by too low enzyme activity, most likely since the enzymes did not have optimal environmental conditions (pH and temperature). However, this can be solved by 1) increase the concentration of the enzymes, 2) increase the holding time, or 3) use enzymes that are better adapted for the marine environment. An alternative explanation is that the sea lice were covered within the mucus layer of the fish, and the enzymes therefore did not get in contact with their chitinous substrate for binding. This can be studied more closely in future research. Future research should also focus on finding a strategic time in the sea lice life cycle for treatment.

2. Innledning

Faglig bakgrunn:

Lakseoppdrett er en av de ledende næringene i Norge, og anses som en viktig politisk prioritering og en økonomisk næringsgren for fremtiden. Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er i dag en av de største utfordringene som næringen står overfor. Lakselus er en parasitt som er naturlig og konstant tilstede i havet, hvor den raskt kan utvikle seg til store populasjoner. Det finnes i dag forebyggende, kontrollerende og reduserende tiltak mot lakselus, og i Norge er det utarbeidet en nasjonal tiltaksplan for å bekjempe lakselus (Heuch et al., 2005; Nygaard, 2020).

Næringen har de siste årene redusert bruken av kjemoterapeutika, samtidig har det vært en økning i bruken av fysiske/mekaniske behandlingsmetoder. Denne utviklingen må sees i sammenheng med økt toleranse og resistens for flere av de eksisterende behandlingsmidlene (Aaen, Helgesen, Bakke, Kaur, & Horsberg, 2015; Sevatdal & Horsberg, 2003; Treasurer, Wadsworth, & Grant, 2000), noe som fører til at lusene raskt reinfiserer laksen og et kontinuerlig behov for nye tiltak. Håndtering av laksen i forbindelse med behandlingene fører til økt stress blant fisken og redusert fiskevelferd (Ashley, 2007). Det er derfor et stort behov for både nye og forbedrede tiltak for å kontrollere lakselus bestanden. Disse tiltakene bør innebære lite og skånsom håndtering av fisk.

I dette prosjektet er ny metode for å kontrollere lakselus testet av uavhengig tredjepart. Metoden bygger på bruk av kitinolytiske enzymer som vil angripe kitin i skallet hos lakselus, og dette er patentert i Norge og Storbritannia (NO20160259A, GB1602762.5A). Fra før er lite kjent om skallet hos lakselus, men man bruker i dag kitin syntese hemmere som Diflubenzuron og Teflubenzuron som behandlingsmiddel (Aaen & Horsberg, 2016; Branson, Ronsberg, & Ritchie, 2000). Disse virker ved å hemme kitinsyntesen, og organismer med skall av kitin er derfor sensitive ved skallskifte (mens voksne lusestadier ikke er sensitive). De kitinolytiske enzymene angriper endeproduktet i kitinsyntesen, og dette skjer også helt naturlig i havet når kitinholdig skall brytes ned. Ettersom fisken ikke inneholder kitin vil denne metoden kun angripe lakselus og ikke fisk.

Prosjektets omfang:

Startdato: 15.08.2020

Sluttdato: 01.05.2021

Budsjett: 630 000 NOK

Prosjektorganisering:

Prosjektgruppe:

Ved Høgskulen på Vestlandet (HVL):

- Ingunn Alne Hoell, Førsteamanuensis
- Gunnar Thuestad, Høgskolelektor

Ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU):

- Vincent Eijsink, Professor
- Gustav Vaaje-Kolstad, Professor

Ved Veterinærinstituttet (VI):

- Ole-Bendik Dale, Seksjonsleder

Ved Stiftelsen Industrielaboratoriet (Ilab):

- Linda Andersen, FoU-leder
- Susanne Håvardstun Eide, Avdelingsingeniør

Referansegruppe:

- Ketil Rykhus, Sinkaberg-Hansen AS
- Ingebjørg Sævareid, Salmon Group
- Gro Vee, Mowi ASA

FHF-ansvarlig:

- Kjell Maroni

3. Problemstilling og formål

Prosjektets effektmål (betydning for næringen, nytteverdi):

Luseproblematikken er en av de største utfordringene oppdrettsnæringen i Norge har. Lusetallet og påvirkningen på villfisk er i dag dimensjonerende for videre utvidelse av oppdrettsnæringen i sjø. For å opprettholde og øke produksjonen, vil det være et behov for nye metoder til å kontrollere lakselus. I dette prosjektet skal en helt ny metode for å kontrollere lakselus vurderes av uavhengig tredjepart.

Denne nye metoden har mange fordeler:

1. Metoden er tilpasset dagens teknologi med åpne merder.
2. Den er skånsom mot fisk og dermed økes dyrevelferden.
3. Enzymene vil virke mot alle stadier av lakselus med skall, altså også voksne stadiene hos lakselus.
4. Ved å tilpasse enzymene, kan en behandle mot lakselus uavhengig av årstid (temperatur).
5. Metoden har miljømessige fordeler. Enzymene er proteiner som forventes å brytes ned raskt i naturen. Kitinolytiske enzymer forekommer dessuten naturlig i det marine miljøet. Etter behandling av merden, vil det være enkelt å samle opp et evt. overskudd av enzymer før behandlingsvannet slippes ut i naturen dersom dette skulle vise seg å være nødvendig. Dette kan gjøres ved å tilsette kitin, f. eks i form av rekeskall, som enzymene vil binde seg til.
6. Ettersom enzymene angriper et endeprodukt i syntesen, anser vi det som mindre sannsynlig at lakselus utvikler resistens fordi det ikke finnes feedback mekanismer.
7. Enzymer kan produseres i stor skala og formuleres som pulver eller konsentrerte løsninger med lang holdbarhet, på linje med vanlig industrielle enzymer. Derfor vil distribusjon til næringen være enkelt.

God fiskevelferd er viktig for omdømmet til næringen. God fiskevelferd innebærer, i tillegg til lave lusetall:

- minst mulig håndtering av fisken,
- at tiltakene settes i gang på riktig tidspunkt, og
- at tiltakene optimeres slik at man får mest mulig tid mellom behandlinger.

Mer informasjon om denne nye metoden vil derfor gi et bedre kunnskapsgrunnlag for næringen. I tillegg vil resultatene kunne gi nødvendig sikkerhet for etablering av enzymproduksjon i større skala, og dermed gjøre metoden tilgjengelig for oppdrettsnæringen. Resultatene vil kunne bygge grunnlag for nye forskningsprosjekter.

Prosjektets resultatmål (leveranser i prosjektet):

Hovedmålet med prosjektet er å få bekreftet resultater fra innledende laboratorieforsøk ved å gjennomføre en uavhengig tredjepartsvurdering av metoden på fisk i større målestokk.

Vi har i tillegg følgende **delmål**:

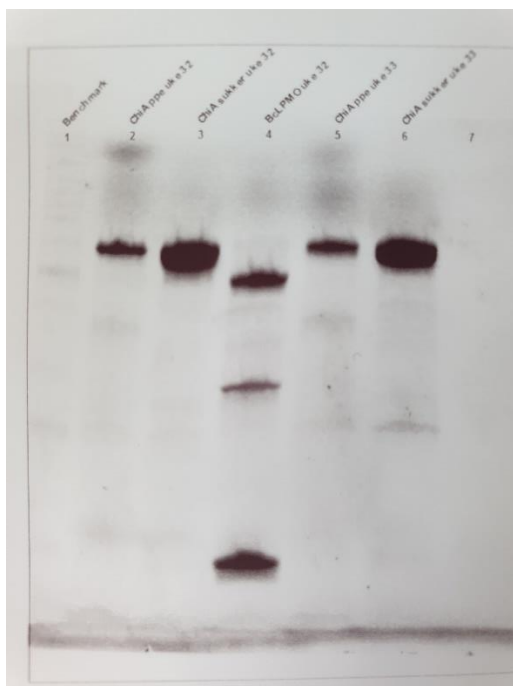
1. Å vurdere effektivitet av behandlingsmetoden.
2. Å vurdere dyrevelferdsmessige sider av metoden.

4. Prosjektgjennomføring

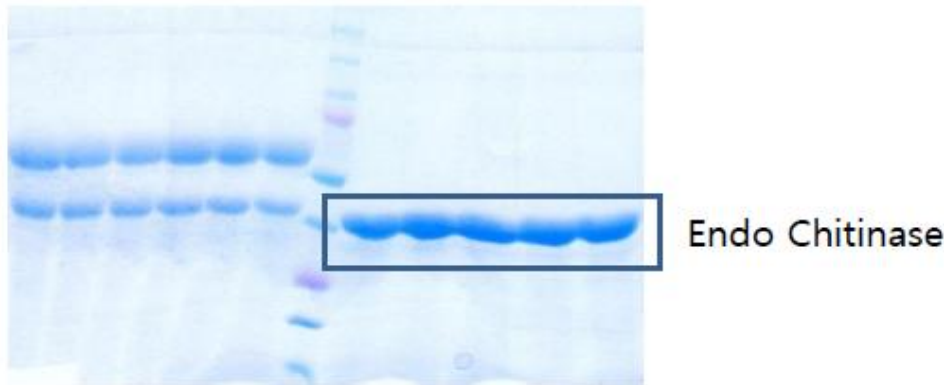
Beskrivelse av metodikk:

Enzymproduksjon:

NMBU hadde ansvaret for produksjon av enzymer. Genene som ble overuttrykt koder for familie 18 kitinasen ChiA (60.9 kDa) fra *Serratia marcescens* og for familie AA9 lytic polysakkaride monooksygenasen BcLPMO10A (45.5 kDa) fra *Bacillus cereus*. Genene ble overuttrykt i *E. coli* BL21 (DE) og dyrket i TB-medium med kanamycin (for ChiA) eller ampicilin (for BcLPMO10A). For overuttrykk av ChiA ble cellene dyrket ved 37°C og induisert med IPTG når OD ved 600 nm var 0.6. BcLPMO10A ble dyrket overnatt ved 37°C i en Harbinger bioreaktor, men uten induksjon. Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 4°C på 8000 rpm i 10 minutter. Begge proteinene ble så renset ved først å lage et periplasmatisk ekstrakt, og deretter vha. QFF ionebytterkolonner i Äkta pure rensesystem med buffer 50 mM Tris-HCl pH8.0 og 500 mM NaCl flow og med 2 mL·mL⁻¹ flow. Mengden renset ChiA som ble produsert var 3,11 g og 0,99 g BcLPMO10A. For begge enzymene ble aktivitet bekreftet, og renhet av enzymene vises i figur 1. I tillegg fikk vi kjøpt inn ca. 1,25 g renset og frysetørket endokitinase fra firmaet Amicon (Sør-Korea), se figur 2 for dokumentasjon på renhet.



Figur 1. SDS-page av renset ChiA (60.9 kDa) fra *Serratia marcescens* og BcLPMO10A (45.5 kDa) fra *Bacillus cereus*.



Figur 2. SDS-page av rensset endokitinase kjøpt fra firmaet Amicon (Sør-Korea).

Fiskeforsøk:

Ilab var ansvarlig for søknad til Dyreforsøksnemda angående tillatelse til å gjennomføre forsøkene på fisk.

Selve fiskeforsøket ble gjennomført som beskrevet under:

- 20.08.2020: Fisken ble pitmerket i buk og vekt, lengde og velferdsscore ble registrert.
- 02.09.2020: All fisk ble smittet med lus (30 kopepoditter pr. fisk).
- 14.09.2020: Behandling:
 - Fiskene ble sedert i karet ved tilsetning av Aqui-S direkte i karet.
 - Fiskene ble så håvet over i et bad med Finquel Vet for bedøvelse før PIT-TAG, vekt, lengde, antall lus og velferdsscore ble registrert.
 - Det ble talt lus på en og en fisk, og fiskene ble så fordelt til 2 nye kar med så likt antall lus og fiskevekt som mulig i hvert kar.
 - Behandlingen ble gjennomført ved å:
 1. Senke vannstanden i karene til 100 liter, tilsette trykkluft og oksygen, og stoppe vanntilførselen.
 2. For behandlet gruppe ble så enzym tilsatt.
 3. For kontrollgruppen ble det tilsatt 50mM TrisHCl buffer, pH8 (tilsvarende volum som enzymene var løst i).
 4. Aktiviteten til LPMO'er øker når det er et katalytiske co-substrat, slik som f. eks H₂O₂ eller askorbinsyre, tilstede. Ettersom H₂O₂ er et kjent avlusingsmiddel, valgte vi å tilsette finalt 0,1 mM askorbinsyre (både i behandlingskar og kontrollkar).
 5. Behandlingen varte i 3 timer, og ble avsluttet ved å skru på vanntilførselen til karene, og fjerne trykkluft- og oksygentilsetningene.
- 28.09.2020: Avslutning:
 - Ved avslutning av forsøket ble 4-5 fisker plassert i en overdose Finquel Vet (150 mg/L) for avliving.
 - Vekt, lengde, PIT TAG, velferdsscore og antall lakselus (delt inn i adult hann og adult hunn) per fisk ble registrert.
 - Følgende prøver ble så tatt: bilder av begge øynene, overfladisk og dypt hud/muskel til histologi, snute/munnslimhinne til histologi, og baktarm til histologi.

Analyse av fisk:

Fotomateriale:

For 10 stk. null-uttaksfisk og 40 stk. slutt-uttaksfisk ble fotografier av begge sider av hoderegion tatt. I tillegg ble bilder av eksterne lesjoner på 5 stk. sluttuttaksfisk (hhv. nr. 17, 24, 29, 34 og 35) tatt og vurdert spesielt.

Histopatologisk undersøkelse:

De formalinfikserte prøvene ble innstøpt enkeltvis i parafin, rutinemessig fremført, snittet (3 µm), farget med hematoxylin og eosin (HE) for deretter å bli undersøkt i lysmikroskop. For snitt fra snute ble innledningsvis forskjellige orienteringer forsøkt på få prøver. Det ble valgt en orientering hvor en fikk god oversikt over lukterose, epitel i nesehule og hud. Dette ble deretter utført på alle snitt fra nese. I få tilfeller løstnet lukterose før prosessering. Disse ble støpt inn ved siden av resten av materialet i samme blokk/snitt.

Gjennomføring av prosjektet:

Prosjektet ble delt inn i fire arbeidspakker (AP1-4) som beskrevet under og i tabell 1:

AP1: Produksjon av enzym.

Ansvarlig institusjon: Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Metode som skal anvendes: Dyrking av *E. coli* stammer med rekombinante kitinolytiske enzymer. Gener for ekspresjon av kitinolytiske enzymer vil overuttrykkes, og det vil gjennomføres ett påfølgende rensetrinn. Renhet av enzymene vil bli dokumentert og proteinkonsentrasjonen bestemmes.

AP2: Gjennomføring av fiskeforsøk.

Ansvarlig institusjon: Industrilab (Ilab).

Metode som skal anvendes: Ilab har ansvar for å søke godkjenning hos Dyreforsøksnemda. Fisk skal randomiseres og merkes individuelt i to kar. Fisk i begge kar infiseres med kopepoditter. Det ene karet fungerer som en kontroll (ubehandlet), mens i det andre karet tilsettes kitinolytiske enzymer (behandlet). Når enzym tilsettes og avliving skal det telles antall lus på hver fisk og registreres vha. fiskens spesifikke merking. Det vil også bli tatt ut prøver til patologiske undersøkelser ved avliving.

AP3: Patologiske undersøkelser av fisken.

Ansvarlig institusjon: Veterinærinstituttet (VI).

Metode som skal anvendes: Patologisk undersøkelse skal utføres av VI. Disse undersøkelsene omfatter 1) Fiskens tilstand vurderes. Evt. utvendige skader skal bemerkes. 2) Øyet på fiskene fotograferes og tilstanden vurderes utfra bilder. 3) Mikroskopisk undersøkelse av: gjeller, hud, munnslimhinne og tarmslimhinne.

AP4: Prosjektstyring og kommunikasjon.

Ansvarlig institusjon: Høgskulen på Vestlandet (HVL).

Metode som skal anvendes: HVL har ansvar for kommunikasjon og samordning mellom de samarbeidende fagmiljøene. HVL har også ansvar for å rapportere til FHF og for formidling og kommunikasjon med fagmiljø, næringen, myndigheter og allmennheten. HVL vil være ansvarlig for publisering av resultatene fra prosjektet.

Tabell 1: Gantt diagram som beskriver arbeidsplan, struktur og fordeling av oppgaver. Ansvarlig for hver arbeidspakke er uthevet. HVL = Høgskulen på Vestlandet, campus Haugesund; NMBU = Norges Miljø og Biovitenskapelige Universitet, Ås; Ilab = Industrielaboratoriet, Bergen; VI = Veterinærinstituttet, Bergen.

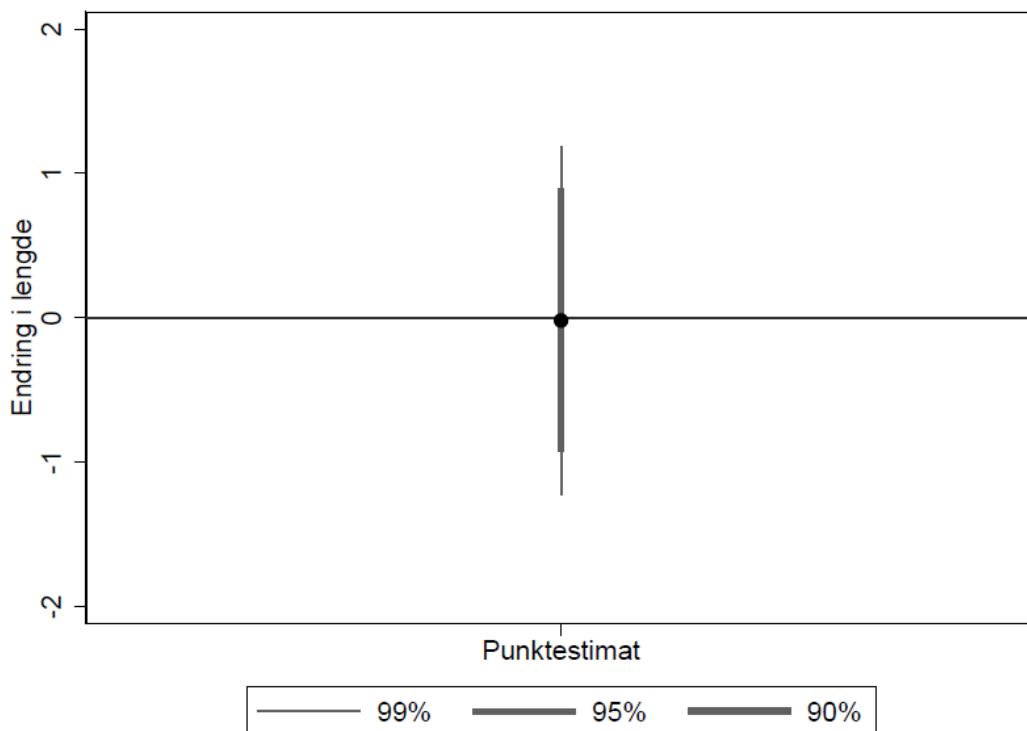
Arbeidsbeskrivelse	2020						2021				Ansvarlig fagmiljø
	Juli	August	September	Oktober	November	Desember	Januar	Februar	Mars	April	
AP1: Produksjon av enzym											NMBU
HL1: Enzymer leveres		Frist: 14.08.2021									
AP2: Gjennomføring av fiskeforsøk											Ilab
HL2: Fagrapport fiskeforsøk					Innsendt til FHF 09.11.2020						
AP3: Patologiske undersøkelser av fisken											VI
HL3: Fagrapport fiskehelse								Innsendt til FHF 12.02.2021			
AP4: Prosjektstyring og kommunikasjon											HVL
HL4: Rapportering til FHF			Møte med referansegruppa: 18.09.2020	Møte med referansegruppa: 16.10.2020						Faglig og administrativ sluttrapport: Innsendt til FHF 26.03.2021 (utkast 15.01.2021)	
HL5: Vitenskapelig publisering										Leveres 01.05.2021	

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

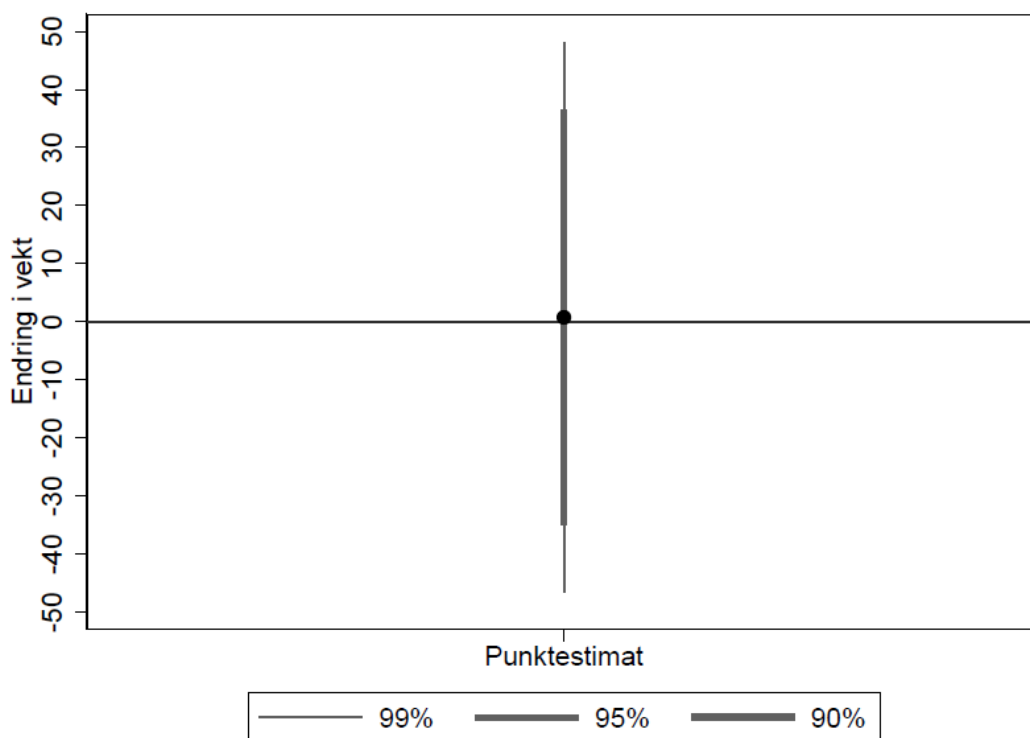
Oppnådde resultater:

Inndeling av fisk i behandlingsgruppe og kontrollgruppe:

Det er viktig å vise at de to gruppene, altså behandlingsgruppa og observasjonsgruppa, er like. Da kan eventuelle effekter lettere knyttes til behandlingen alene. Ulike variabler kan brukes for å vise at gruppene er like, med tanke på utvikling gjennom observasjonsperioden. I figur 3 og 4 viser vi den gjennomsnittlige kausale effekten forsøket har hatt på fiskenes lengde og vekt. Vi ønsker ikke at behandlingen påvirker utviklingen i lengde og vekt, og forsøket viser at fiskene har utviklet seg helt likt i de to gruppene gjennom forsøksperioden. Hvis forsøket hadde funnet en effekt på fiskenes lengde eller vekt, ville endringen i antall lus kunne tilskrives at de to gruppene bestod av fisker med ulike egenskaper for eksempel. I forsøket finner vi at forskjellen i endring mellom de to gruppene er nær null, og estimatet er ikke statistisk forskjellig fra null. Forsøket viser dermed at behandlingen ikke påvirker fiskenes lengde og vekt, og dette er med på å sannsynliggjøre at observerte endringer i antall lus skyldes enzymet, og ikke andre observerbare karakteristikk med fiskene.



Figur 3. Punktestimat som viser endring i lengde for fiskene i behandlingsgruppen, sammenliknet med endringen i lengde i kontrollgruppen. Estimatet viser at den gjennomsnittlige endring i lengde var lik i de to gruppene etter behandling. Punktestimatet, som måler forskjellen i den gjennomsnittlige endringen i de to gruppene, er representert ved den svarte prikken midt i konfidensintervallet. Våre estimater indikerer dermed at behandlingen ikke påvirker fiskenes lengde.



Figur 4. Punktestimat som viser endring i vekt for fiskene i behandlingsgruppen, sammenliknet med endringen i vekt i kontrollgruppen. Estimatet viser at den gjennomsnittlige endring i vekt var lik i de to gruppene etter behandling. Punktestimatet, som måler forskjellen i den gjennomsnittlige endringen i de to gruppene, er representert ved den svarte prikken midt i konfidensintervallet. Våre estimater indikerer dermed at behandlingen ikke påvirker fiskenes vekt.

Observasjoner av fisk før, under og etter behandling:

For å dokumentere fiskevelferd før, under og etter behandling ble fiskene observert ut ifra ulike velferdsindikatorer. I tillegg til overvåking av miljøfaktorer (slik som temperatur, pH, CO₂, oksygenmetning etc.) under de kontrollerte laboratoriebetingelser, ble de følgende individbaserte velferdsindikatorer overvåket: øye (katarakt), øyeskade (blødning), skjelltap, hud (blødninger), sår, ødem, finneslitasje, gjellelokkforkortning og deformiteter (se tabell 2). Kun variabler hvor det ble gjort observasjoner er tatt med i tabellen, når det gjelder ødem og gjellelokkforkortning var det ingen observasjoner på noe tidspunkt. Overvåking av individbaserte velferdsindikatorer er gjennomført i forhold til NOFIMA fishwell skala.

Hovedfunn er at det ikke er spesielle skader som kan relateres til test-behandlingen.

Det ble funnet varierende grad av katarakt i hele materialet, dvs. også i 0-uttak, og problemet knyttes derfor ikke til test-behandlingen. En systematisk forskjell på 0-uttak og sluttuttak er sparsomme hakespiss-sår ved sluttuttak. Vi bedømmer dette som et vanlig lyte som kommer over tid ved oppdrett i kar.

Observasjoner under den 3 timer lange behandlingen viste at fiskene tålte behandlingen godt ved at det ikke var tegn til panikk blant dem. Fiskene var litt utrolige, og det ble beskrevet som om fiskene kunne lukte noe i vannet under behandlingen.

Tabell 2: Oversikt over individbaserte velferdsindikatorer som ble overvåket gjennom forsøket. Ved nulluttak ble 10 fisk vurdert, mens 40 fisk ble observert gjennom hele studiet, hvorav disse senere ble inndelt i en behandlingsgruppe og en kontrollgruppe med 20 fisk hver. Observasjonene er inndelt i en skala fra 0-3, hvorav nivå 0 betyr liten eller ingen tegn til skade, mens nivå 1-3: blir gradvis verre. Antallet fisk som ble observert med skader er angitt i parentes bak. I de tomme rutene var det ingen observasjoner.

Velferds-indikatorer:		Øye (katarakt)	Øye (blødning)	Skjelltap	Sår	Finneslitasje	Deformiteter
Null-uttak: (10 fisk) Dato: 20.08.2020		1 (2 fisk) 2 (3 fisk)		1 (3 fisk) 2 (7 fisk)		1 (2 fisk) 2 (1 fisk)	1 rygg- finne (1 fisk)
Oppstart: (40 fisk) Dato 20.08.2020		1 (13 fisk)		1 (11 fisk) 2 (28 fisk)		1 (1 fisk) 2 (5 fisk) 3 (1 fisk)	
Behandlings- gruppe: (20 fisk)	Behandling Dato: 14.09.2020	1 (1 fisk) 2 (1 fisk) 3 (2 fisk)	1 (1 fisk) 3 (1 fisk)	1 (16 fisk) 2 (2 fisk) 3 (2 fisk)	Lite snute/ kjevesår: (4 fisk) Hoppeskade: (2 fisk)		
	Avslutning Dato: 28.09.2020	1 (1 fisk) 2 (3 fisk) 3 (5 fisk)		1 (4 fisk) 2 (15 fisk) 3 (1 fisk)	Snute/ kjevesår: (8 fisk), Kombinert sår og hoppeskade: (5 fisk)		Forkortet BF (1 fisk)
Kontroll- gruppe: (20 fisk)	Behandling Dato: 14.09.2020	3 (2 fisk)		1 (16 fisk) 2 (4 fisk)	Lite snute/ kjevesår: (4 fisk), Halefinne: (1 fisk)	1 (2 fisk)	
	Avslutning Dato: 28.09.2020	1 (10 fisk) 2 (0 fisk) 3 (2 fisk)	1 (2 fisk)	1 (1 fisk) 2 (18 fisk) 3 (1 fisk)	Snute/ kjevesår: (11 fisk), Kombinert sår og hoppeskade: (2 fisk)		Forkortet BF (2 fisk)

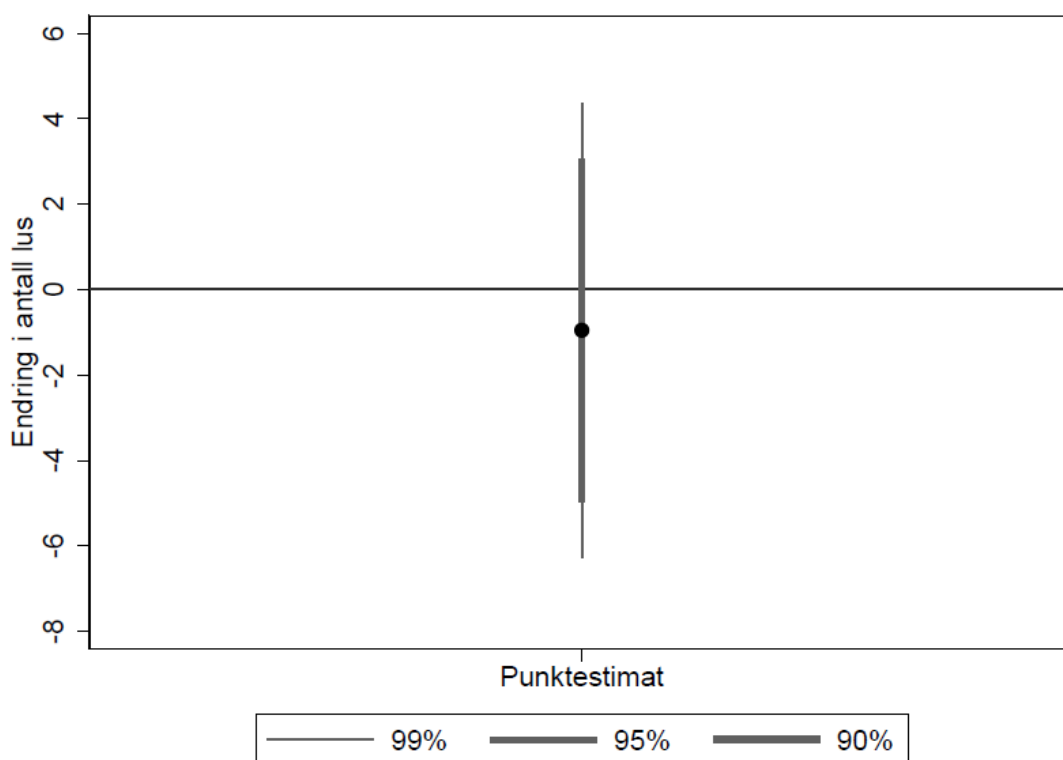
Lusedata:

Ved behandlingstidspunktet ble antall lus pr. fisk registrert. Laveste antall lus pr. fisk var 4, mens høyeste var 26. I gjennomsnitt var det 13,95 lus i behandlingsgruppen, mens det var 13,25 lus i kontrollgruppen. Ved avslutning var det i behandlingsgruppen gjennomsnittlig 11,1 lus i gjennomsnitt, hvorav 5,1 hannlus og 6,1 hunnlus. I kontrollgruppen var det ved avslutning gjennomsnittlig 11,6 lus, hvorav 5,7 hannlus og 5,9 hunnlus. Se tabell 3, samt figur 5 og 6 for endring i lusetall mellom de to gruppene. Resultatene viser at det er i gjennomsnitt en større reduksjon i antall lus pr. fisk i behandlingsgruppen sammenliknet med kontrollgruppen i dette forsøket, men den estimerte effekten av behandlingen er ikke statistisk signifikant. Det kan derfor ikke konkluderes med at effekten av behandlingen har en kausal effekt, sett fra et statistisk perspektiv.

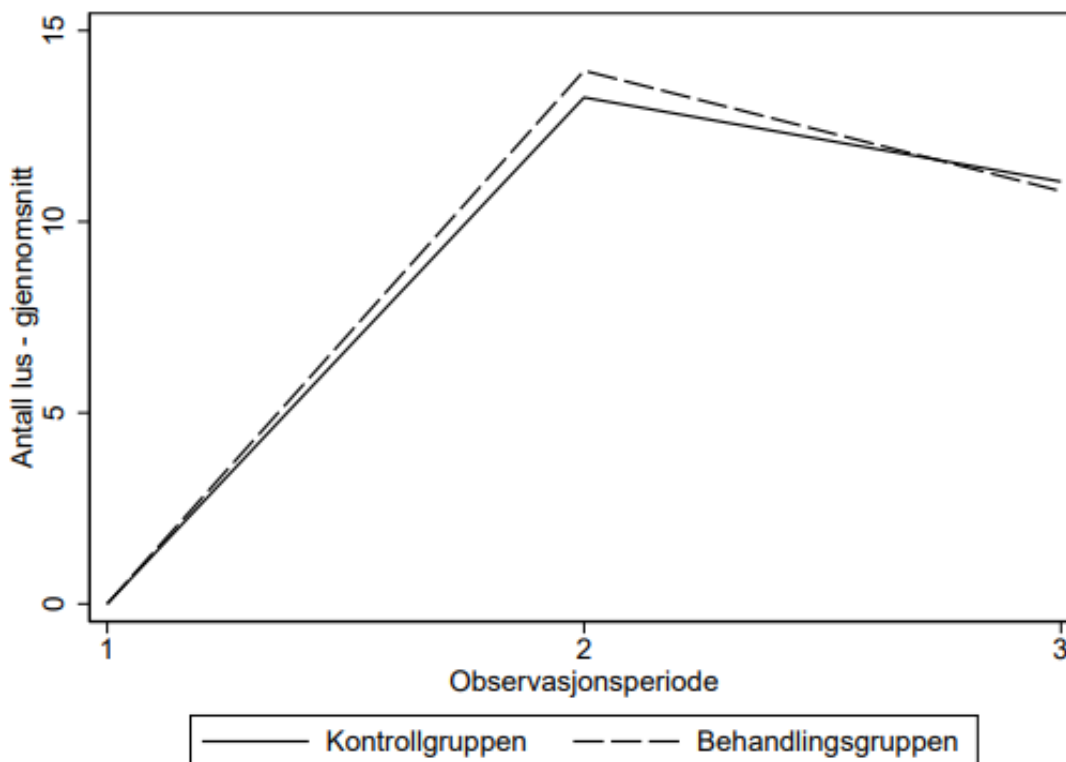
Tabell 3: Oversikt over antall lus i behandlingsgruppen og kontrollgruppen ved start av behandling og ved avslutning.

Behandlingsgruppe:	Ved start av behandling:	Ved avslutning:	Endring:
Antall lus:	279	222	57
Gj.snitt antall lus pr fisk:	13,95	11,1	2,85

Kontrollgruppe:	Ved start av behandling:	Ved avslutning:	Endring:
Antall lus:	265	231	34
Gj.snitt antall lus pr fisk:	13,25	11,6	1,65



Figur 5. Punktestimat som viser endring i antall lus for fiskene i behandlingsgruppen, sammenliknet med endringen i antall lus for fiskene i kontrollgruppen. Estimaten viser at behandlingen reduserte antall lus i behandlingsgruppen med omtrent ett lus per fisk, men dette estimaten er ikke statistisk signifikant forskjellig fra null. Punktestimaten, som måler forskjellen i den gjennomsnittlige endringen i antall lus i de to gruppene, er representert ved den svarte prikken midt i konfidensintervallet.



Figur 6: Figuren viser utviklingen i gjennomsnittlig antall lus i behandlingsgruppen og kontrollgruppen ved de 3 observasjonstidspunktene i forsøket: (1) før infeksjon, (2) ved start av behandling, og (3) ved avslutning av forsøket.

Histologi:

For gjelle var det bare sparsomme eller ingen funn. Det ble påvist litt "klubbing" (epitelhyperplasi og enkelte slimceller apikalt på lameller), enkelte prøver med sparsom forekomst av enkeltstående fortykkete lameller og/eller små parti med fusjonerte lameller og enkelte gjeller med en til to-tre distalt fortykkete filamenter. Konklusjon: Ingen vesentlige funn ved histopatologisk undersøkelse.

For hud ble det analysert snitt fra både hud og muskulatur. Det kan være utfordrende å få god kvalitet på snitt fra hud. Gjennomgående var det tap/løsning av epidermis, sannsynlig artefakt på flere snitt. Oversikt over funnene som ble gjort er gitt i tabell 4. Konklusjon: Ingen vesentlige funn i epidermis eller andre lag av huden ved histopatologisk undersøkelse.

Tabell 4: Oversikt over funn ved histopatologisk undersøkelse av hud.

Funn:	Fisk merket:	Tilhører gruppe:
Et avgrenset område med noe oppsvulmet vev i skjellommene.	F3	Null-uttak
Et avgrenset område med noe oppsvulmet vev i skjellommene.	32F	Kontroll-gruppe (ubehandlet)
Et avgrenset område med infiltrasjoner med betennelsesceller i en skjellomme.	A9FE	Kontroll-gruppe (ubehandlet)
Et avgrenset område med løsning av celler.	F1FE	Behandlingsgruppe

I tillegg ble også hud fra snute undersøkt, hvor epidermis, lukterosett og nesehule ble vurdert. Disse organene inngår ikke i rutinemessig histopatologisk undersøkelse av fisk og erfaringsgrunnlaget er derfor lite. Det var tilfeller av løsnete celler i epidermis i alle grupper, inkludert ved nulluttak og i kontrollgruppen. I noen snitt var det et mørkt langsgående celledag, hvor noe av epidermis fremstod som løsnet i den basale delen av epidermis. Også her var tilfellene fra alle grupper, inkludert ved nulluttak og i kontrollgruppen. I en av prøvene fra kontrollgruppen (fisk merket FEFE) var disse forandringene uttalt, og det var hyalin degenerasjon i området. Forandringene i nesehule var mest markert i prøvene merket D9FE, DEFE, E5FE, E9FE, EAFE, EEFE og F1FE, hvorav 2 av prøvene (E5FE og EEFE) tilhører kontrollgruppen, mens resterende er fra behandlingsgruppen. Foto viste at det på snutespiss var mindre slitasjeskader fisken lett får i kar-tilværelsen over tid, dette kan forklare noen av histologifunnene med hensyn til epidermis.

Ved undersøkelse av tarm, hadde 4 av 10 fisk små forkalkinger/utfelling i dypere lag av tarmvegg ved null-uttak. Dette var ikke å finne på de 40 slutt-uttaksfisk der det ikke var noe å bemerke. Konklusjon: Ingen vesentlige funn ved histopatologisk undersøkelse.

Samlet viser resultatene fra de histopatologiske undersøkelsene at funnene på dette materialet har overveiende lav alvorlighetsgrad og synes ikke å være knyttet til test-behandlingen som sådan.

Diskusjon:

Grundig dokumentasjon av fisk underveis i forsøket, både ved hjelp av individuelle fiskevelferdsindikatorer, observasjoner og histopatologiske undersøkelser, viser at fisken ikke har blitt påvirket av test-behandlingen. Dette viser at metoden er skånsom mot fisken og derfor dyrevelferdsmessig forsvarlig.

I forsøket observerte vi en større reduksjon i antall lus i behandlingsgruppa sammenlignet med kontrollgruppa, men den estimerte effekten var ikke statistisk signifikant. En sannsynlig forklaring på at vi ikke fikk en bedre effekt av behandlingen, kan være at enzymene ikke har hatt optimale miljøforhold, slik som pH og temperatur, under forsøket. Enzymene som ble brukt er opprinnelig fra organismer med optimal vekst på helt andre temperaturområder og pH-områder enn de vi finner i havmiljøet, slik som *Serratia marcescens* med optimum temperatur rundt 27°C og *Bacillus cereus* rundt 30°C. Dette kan medføre en redusert aktivitet hos enzymene når forsøket gjennomføres ved 15°C. Temperaturen på 15°C ble valgt med tanke på at vi ønsket en høyest mulig temperatur for økt enzymaktivitet, samtidig som vi ønsket å holde oss innenfor de naturlige forholdene i havet. Her må man også ta hensyn til at varmtvannsbehandling er en metode for avlusing. Når det gjelder pH, ble forsøket gjennomført på pH 8.0, tilsvarende som i det marine miljøet. ChiA fra *Serratia marcescens* har et pH-optimum rundt 5.0-6.0 (Brurberg et al, 1996), og også her er det ikke-optimale forhold i forsøket. Dette var en usikkerhet vi var klar over, men ettersom *in vitro* forsøk viste lovende resultater, ønsket vi å forsøke også på fisk med lus. Aktiviteten til enzymene vil være relatert til behandlingstida, og i dette forsøket fikk vi tillatelse fra Dyreforsøksnemda til å behandle i 3 timer. Det finnes løsninger for å øke effekten til enzymene: enten 1) ved å øke konsentrasjonen av enzymene, eller 2) ved å øke behandlingstida. Det at fisken ikke ser ut til å ta skade av de kitinolytiske enzymene, gir oss en sikkerhet for å kunne øke enzymkonsentrasjonen og/eller behandlingstida i et senere forsøk. Et annet alternativ vil være å bruke andre kitinolytiske enzymer som er bedre tilpasset miljøforholdene i havet.

En alternativ forklaring på at vi ikke fikk ønsket effekt av behandlingen kan være egenskaper ved lakselusene i forsøket vårt. Lusene som ble behandlet var i stadiet preadult, mens tidligere *in vitro* forsøk har vært utført på lus i adult-stadiet. Det er mulig at enzymangrep på skallet hos preadulte lus vil kunne skru på kitin syntese som en forsvarsmekanisme. Vi kjenner veldig lite til hvordan kitin syntesen reguleres hos lakselus. Selv om lusene vil kunne bruke kitin-syntese i en forsvarsstrategi, vil det uansett være et spørsmål om dose. Det betyr at økt enzymkonsentrasjon og/eller behandlingstid vil kunne motvirke en slik forsvarsstrategi hos lusene. Man kan også tenke seg at adulte stadier av lakselus har skrudd av kitin syntesen, og dermed mangler en slik

forsvarsmulighet. Det vil altså være svært nyttig å lære mer om hvilke utviklingsstadier i lakselusas livssyklus som er mest sårbar for kitinolytiske enzymer - for å kunne behandle på et strategisk tidspunkt.

Den siste alternative forklaringen på at vi ikke fikk ønsket effekt av behandlingen kan være egenskaper ved laksen i forsøket vårt. Lakselusen ligger delvis beskyttet i et slimlag på fiskens overflate, noe som kan tenkes å gjøre det vanskelig for enzymene å nå fram til målsubstratet. I dette tilfelle ville det være mulig å behandle ved stadier hos lusa som er fritt svømmende. I dette forsøket var det ikke mulig å finne ut om enzymene klarte å binde seg til kitin hos lakselusene. Dette er imidlertid mulig å følge opp med videre forskning, f. eks ved å markere enzymer med f. eks en farge.

6. Hovedfunn

- Behandlingen med kitinolytiske enzymer har ikke påvirket fisken.
- Resultatene viser at det i gjennomsnitt er en større reduksjon i antall lus pr. fisk i behandlingsgruppen sammenlignet med kontrollgruppen i dette forsøket, men den estimerte effekten av behandlingen er ikke statistisk signifikant.

7. Leveranser

Detaljert oversikt over leveranser i prosjekt:

- HL1: Levering av enzym til bruk i fiskeforsøk. Ansvarlig institusjon: NMBU. *Gjennomført som planlagt, august 2020.*
- HL2: Fagrapport som sammenfatter resultatene fra fiskeforsøket. Ansvarlig institusjon: Ilab. *Fagrapport er sendt til FHF 09.11.2020.*
- HL3: Fagrapport som sammenfatter resultatene fra patologiske undersøkelser. Ansvarlig institusjon: Veterinærinstituttet. *Fagrapport er sendt til FHF 12.02.2021.*
- HL4a: Faglig sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer. *Faglig sluttrapport er sendt til FHF 26.03.2021.*
- HL4b: Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer. *Administrativ sluttrapport er sendt til FHF 26.03.2021.*
- HL5: Vitenskapelig publisering – manus innsendt. Ansvarlig institusjon: HVL. *Manuskript vil bli sendt inn innen 01.05.2021.*