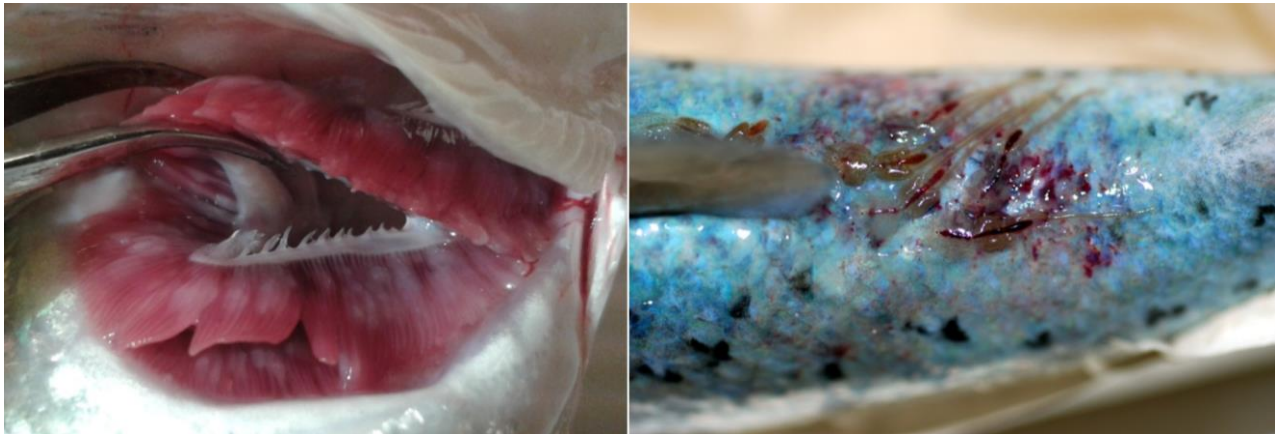


Faglig sluttrapport:

Effekter av behandling mot lakselus, amøbe-
gjellesykdom (AGD) og notrengjøring på gjellehelse hos
laks i oppdrett (FHF-901514)



Prosjektmedarbeidere:

Are Nylund, Simon Mackenzie, Trond Isaksen, Linda Andersen, Benjamin GJ Clokie, Ahmed Elsheshtawy, Amaya Albalat, Allan Beveridge, Faezeh Mohammadi, Lindsey Moore, Christiane Trösse, Erwan Lagadec, Heidrun Plarre, Birgit L. Kvåle, Elisabeth Napsøy, Sogni Wiik, Pernille L. Lyng, Oda Gjerde, Anna N. Johansen, Steffen Blindheim, Alf Dalum, Stian Nylund.



Prosjektet er finansiert av:

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering



Prosjektnummer – 901514

Med bidrag fra flere oppdrettsselskaper:

Blom Fiskeoppdrett AS

Bolaks AS

Bremnes Seashore

Lerøy Seafood Group AS

Firda Sjøfarmer AS

Bergen 01 november 2022

1. Sammendrag

Gjellehelse hos laksefisk i kommersielt intensivt lakseoppdrett påvirkes av en rekke mikroparasitter (virus, bakterier og parasitter) og produksjonsrelatert stress som: a) sjøsetting ved smoltifisering (hele grupper med individer sjøsettes samtidig basert på en vurdering av den generelle smoltstatusen i populasjonen), b) begroing av nøter nødvendiggjør rengjøring hvor de fleste metoder frigjør store mengder biologisk materiale (inkluderte mulige fiskepatogener, nematocyster fra nesledyr, og andre fragmenter fra ulike typer begroingsorganismer) inn i merdene, c) svært lave og høye temperaturer (temperatur stress som ikke kan løses ved at laksen oppsøker områder med mer optimal temperatur), d) alge- og zooplanktonoppblomstring, inkludert toksiske alger og nesledyr, e) behandlinger mot lakselus og amøbegjellesykdom (AGD), f) bruk av semi-lukkede produksjonssystemer (skjørt, S-CCS, landbasert postsmoltproduksjon, RAS-anlegg) med redusert vannutskifting, g) flytting av fisk (sortering, uttak av slaktefisk, etc). Det er godt dokumentert at denne type inngrep, som fører til avvik fra laksens naturlige levesett, medfører stress, men det er mindre kjent hvordan slike stress-situasjoner påvirker gjellehelsen hos oppdrettslaksen. Målet med dette prosjektet var å undersøke hvordan produksjonsstress (mekanisk behandling mot lakselus, ferskvannbehandling mot AGD og spyling av nøter) påvirker gjellehelsen hos laks. Det ble lagt særlig vekt på patologiske forandringer i gjellevevet, endringer i belastning av patogener, immunologiske responser, og endringer i sammensetning av mikrobiota på gjellene.

Termisk behandling, uten patogener til stede og uten trenging av fisken (eksperimentell gjennomføring), førte ikke til dødelighet eller redusert gjellehelse hos laks. I felt kan termisk behandling gi økt dødelighet ved tilstedeværelse av høy tetthet av enkelte gjellepatogener (*P. theridion*, *Cand. B. cysticola*), samt virusinfeksjoner som SAV, PMCV og PRV1. Det anbefales derfor at det gjennomføres en screening for utvalgte patogener før termisk avlusning gjennomføres. Det er særlig i perioden fra juli til november, ved høy sjøtemperatur, at betydelig dødelighet har vært observert. I dette prosjektet ble det imidlertid ikke observert ekstrem dødelighet eller alvorlige forandringer i gjellevevet (patologi) i forbindelse med vår og høst avlusing. Et unntak var et anlegg med regnbueørret hvor fisken var positiv for SAV og hvor dødeligheten var betydelig. Ved termisk behandling av fisk med diagnosen pankreas sykdom (PD) må det i hvert enkelt tilfelle vurderes om det er tilrådelig. Termisk behandling av laks i med kjølt ferskvann fulgt av termisk behandling gav ikke en signifikant økt dødelighet. Behandlingen med kjølt ferskvann fulgt av avlusing med Thermolicer synes å være en mer skånsom avlusingsstrategi sammenlignet med bruk av kun Thermolicer. Dette ble også støttet av observasjon at fisken begynte å spise etter mindre enn en time etter tilbakeføring til merden.

Ferskvannsbehandling for å fjerne *P. perurans* fra gjellene hos laks med AGD har en klar effekt målt med både gjellescore, real time RT PCR, og histopatologiske undersøkelser. Reduserte mengde *P.*

perurans kan først observeres ved hjelp av real time RT PCR, mens endringer i gjellescore og histopatologi kommer på et senere tidspunkt etter behandling (vanligvis mer enn 7 dager etter behandling). Ferskvannbehandling av frisk laks medfører ikke dødelighet, men hos laks med andre sykdommer og generelt dårlig gjellehelse kan behandlingen medføre dødelighet. I dette studiet var det særlig patogener som *P. theridion*, *Cand. B. cysticola* og Piscine myocarditis virus som var assosiert med dødelighet under behandling i felt. Det kan ikke utelukkes at også andre agens kan svekke laksen slik at den ikke tåler stresset som behandling i felt medfører. En kartlegging av laksens helse (sykdomsstatus) før behandling bør gjennomføres i alle tilfeller hvor en er usikker på situasjonen på lokaliteten.

Spyling av nøter kan medføre økt dødelighet, men i dette studiet ble økning i dødelighet kun observert på en lokalitet. Spylingen gav ikke vevsendringer i gjellevevet og hadde kun en mindre påvirkning på prevalens og tetthet av patogener. Spyling av nøter førte til økt partikkeltetthet og turbiditet i merdmiljøet, og det ble påvist ulike typer smittestoffer i slikt avspylt materiale. De påviste mikroparasitter på de ulike lokalitetene samsvarer med påvist smittestoff i håndplukket groeorganismer fra øvre vannlag. Unntaket var påvisning av gjelleamøben *P. perurans* som kun ble påvist i avspylte partikler. Dette kan indikere at det er større tetthet av denne amøben på notveggen i dypere vannlag sammenlignet med den øvre del av noten. Spyling av nøter, uten oppsamling av fragmenter, kan resultere i spredning av mikroparasitter til nabomerder og kanskje til naboanlegg (hvis strømforhold hindrer sedimentering). Det ble også observert at spyling kan påvirke oksygenprofilen i merden som blir behandlet. Redusert oksygen under spyling kan være et resultat av trenging og/eller stress hos fisk i den behandlede merden.

Alle behandlingene (avlusing, AGD behandling og spyling av nøter) i de undersøkte anleggene og under eksperimentelle forhold (avlusing og AGD behandling av patogenfri laks, dvs smitteforsøk med påfølgende behandling) hadde en betydelig påvirkning på gjellemikrobiota hos fisken. I hvilken grad endringene i gjellemikrobiota påvirker funksjonen til mikrobiotaen i en negativ retning er ikke dokumentert. Så langt har det kun vært mulig å settes søkelys på «Operational Taxonomic Units» (OTU) og ikke på funksjonaliteten til mikrobiota. Det kan imidlertid ikke utelukkes at de observerte endringer kan ha negative konsekvenser for fiskens gjellehelse. En betydelig forverring av gjellehelsen ble imidlertid ikke observert etter behandling i felt.

Absolutt qPCR ble benyttet til å kartlegge immunologiske responser hos laks etter de forskjellige behandlinger i felt og i smitteforsøk (lakselus og *P. perurans*). Endringer i mRNA ble benyttet for evaluering av gjelleresponser på AGD behandling og behandling mot lakselus. To av disse var pro-inflammatoriske cytokiner (Interleukin 1 beta IL-1 β og tumor nekrosefaktor alfa TNF- α); en anti-inflammatorisk cytokin (transforming growth factor beta TGF), og major histocompatibility complex II,

MHCII (antigen presentasjon). Ingen forskjeller ble observert i uttakene ved eksperimentell behandling av patogenfri laks mot lakselus (laboratorieforsøk). Lave antall kopier ble observert for alle tre cytokiner, noe som er karakteristisk «hvile status» med henblikk på immunrespons. Et høyt antall mRNA kopier for MHCII ble observert som forventet, vert-miljø interaksjon, i gjellene under normal tilstand. Laboratorieforskene med *P. perurans* (AGD) viste at infeksjon forårsaket en oppregulering av mRNA for de pro-inflammatoriske cytokiner (IL-1 β and TNF- α), MHCII, og transkripsjonsfaktorer (PU1 and Gata3). Det ble også vist at matriks metalloproteinaser (MMPs) og vevs inhibitorer for metalloproteinaser (TIMPs) spiller en nøkkelrolle ved utvikling av AGD. Det ble observert signifikante forskjeller i feltprøvene fra før og etter termisk avlusing. Mål for analysene var både pro- og anti-inflammatoriske cytokiner. Resultatene indikerer at bruk av termisk avlusing i felt har en omfattende effekt på regulering av immunsystemet, mens tilsvarende undersøkelser i laboratorieforsøket ikke kunne reproducere en slik effekt. Det kan derfor se ut som om temperatursjokket i seg selv ikke er driver av den observerte effekten, men at det er andre faktorer relatert til smittestatus i anleggene, trenging og pumping av fisken, som er av betydning.

Summary (English)

Salmon gill health is influenced by a range of different microparasites (viruses, bacteria, protozoans) and production stress (sea transfer at smoltification, extreme temperatures (high or low), net cleaning during production in the sea (release of possible pathogens), algae- and zooplankton (including toxic algae and hydrozoans), moving and sorting fish, reduced oxygen due to poor water exchange, delousing, and AGD treatments). It is well documented that such factors may stress the salmon, but it is less known how this type of stress may influence on the gill health of salmonids. The aim of this project was to gain knowledge about the consequences of production stress (mechanical delousing, AGD treatment, and cleaning of nets), on the gill health of salmonids. This was assessed by examining changes in gill pathology, microparasites, immunological responses, and in gill microbiota.

Thermal treatment of pathogen-free salmon (experimental setup) without pumping of the fish through tubes, did not result in any pathology, reduced gill health, or mortality. Thermal treatment of salmon in commercial production (using Thermolicer or Optilicer) has resulted in mortalities when pathogens like *P. theridion*, *Cand. B. cysticola*, SAV, PMCV, PRV1, and SGPV, are present. Hence, we recommend that a thorough screening for selected pathogens is carried out before thermic delousing is performed. When sea temperatures are high (July – November) extreme mortalities have been observed when using mechanical treatments against salmon louse. However, in this project we did not register any serious mortality in connection with the observed gill pathology during delousing. Nor did the treatments significantly affect gill pathology or density of the microparasites in the period. One

exception was seen in a farm with rainbow trout infected with SAV where the treatment resulted in a significant increase in mortality. We recommend that delousing of SAV-infected salmonid farms should be avoided if possible or that the fish should be stress-tested before treatment. Delousing of salmon using cold freshwater followed by thermal treatment did not result in any increased mortality or significant increase in gill pathology suggesting that this treatment is less severe compared to using Thermolicer only. This assumption is also supported by the fact the salmon started feeding immediately after being returned to cage.

Use of freshwater bathing is an often-used treatment for salmon suffering from AGD, and the treatment is known to have a good effect on the removal of *P. perurans* (tested by real time RT PCR) and subsequent repair of the gill tissues. The reduction of the number of amoebae could be seen immediately after treatment while it may take up to two weeks before repair of the gill tissues can be observed. The freshwater treatment used in this project did not result in any severe mortality, but salmon with severe gill diseases or other diseases may suffer mortality because of the treatment. Little mortality was recorded during freshwater treatment in this project and the individuals dying all had high densities of *P. theridion*, *Cand. B. cysticola*, or PMCV. It cannot be excluded that other pathogens may also lead to mortality during freshwater treatments. Hence, a mapping of the salmon health (disease status) before treatment should be performed at sites with an uncertain disease situation.

Cleaning of nets may lead to mortality due to the stress caused by the tools used, but in the present study we only observed a slight increase in mortality at one site. The net cleaning did not result in any tissue changes in the gills, and it had a minimal impact on the prevalence and density of microparasites. During net cleaning the particle density and turbidity in the cages increased, and some species of microparasites were detected in connection with the released organic material. The microparasites detected were also found in the epibionts growing on the nets near the surface. The exception was presence of *P. perurans* that was only detected in association with the floating particles. This amoeba was not present on the organisms growing on the nets near the surface, which could indicate that amoeba may occur at higher densities on the deeper parts of the nets. Hence, cleaning of nets, without collecting the released organic material from the epibionts, could result in spreading of these microparasites to neighbouring cages or even neighbouring farms (if currents prevent sedimentation of this material). We also observed reduced oxygen levels in the cages during net cleaning. This could possibly be due to increased oxygen consumption by the salmon during the stress experienced.

All treatments (delousing, AGD treatment, and net cleaning) in the farms included in this project, and during experimental treatment of pathogen-free salmon (during challenge experiments) had a significant impact on the gill microbiota of the salmon. How the change in microbiota may influence gill health (negative impact) is not known. So far, we have only looked at changes of the “Operational

Taxonomic Units" (OTU) and not the function of the microbiota. However, it cannot be excluded that the observed changes may have negative consequences for the salmon gill health, but significant reductions in gill health were not observed at any of the sites.

Absolute qPCR was used to evaluate the immunological responses in salmon after the different treatments in the field and in the challenge experiments (Salmon louse and *P. perurans*). mRNA targets were chosen for evaluation of the gill response to the treatment and the sea lice infection. Two were pro-inflammatory cytokines (Interleukin 1beta, *IL1b*, and tumor necrosis factor alpha *TNFα*); one anti-inflammatory cytokine (transforming growth factor beta, *TGFβ*) and the major histocompatibility complex II, *MHCII*, representing antigen presentation. No significant differences in transcription were found at any of the sampling time points during the experimental treatment in the laboratory. There were no differences for either the treatment alone (control uninfected) or lice infection (lice untreated) or a combination of the two. Low mRNA copy numbers were observed for all three cytokines characteristic of a resting state for the immune response. High mRNA copy numbers were observed for MHCII as expected, host-environment interface, in the gill under normal conditions. The AGD lab trial revealed that the AGD infestation caused an upregulation in the mRNA transcription of proinflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α), MHC class II and transcription factors (PU1 and Gata3). Moreover, the matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) have a key role during AGD progression. Significant differences were observed in all samples from field trials tested post-treatment. The results suggest that *Thermolicer* treatment in the field has a profound effect upon the regulation of the immune system whereas in controlled laboratory trials such an effect could not be reproduced. Therefore, the temperature changes may not be the main driver for the observed effect in the field where other factors mainly related to husbandry and manipulation of the animals may impact the fish population.

2. Innledning

- Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Dårlig gjellehelse er et av hovedproblemene i marint lakseoppdrett i Sør-Norge. Årsakene er svært sammensatte, men en rekke patogener er assosiert med gjellesykdommer hos laks i sjø. Blant de viktige gjellepatogener finner vi virus (Salmon gill pox virus, SGPV, Isavirus salmonis, ILAV, Salmo aquaparamyxovirus, ASaPV: Nylund et al. 2003, 2006, 2007, 2008; Nylund S. et al. 2007; Plarre et al. 2012, Gjessing et al. 2017), bakterier (*Candidatus* Piscichlamydia salmonis, *Cand.* Clavichlamydia salmonicola, *Cand.* Syngnamydia salmonis, *Cand.* Branchiomonas cysticola, *Tenacibaculum maritimum*: Drahti et al. 2010; Nylund et al. 1998, 2018, pers.obs.; Karlsen et al. 2007; Mitchell & Steinum 2010; Steinum et al. 2010; Toenshoff et al. 2012; Nylund S. et al. 2014; Småge et al. 2016; Apablaza et al. 2017; Frisch et al. 2017; Mjølnerød et al. 2022) og parasitter (*Ichthyobodo salmonis*, *Paranucleospora theridion*, *Paramoeba perurans*: Todal et al. 2004; Nylund et al. 2007, 2009abc, 2010, 2018, 2021; Steinum et al. 2008; Isaksen et al. 2010, 2011, 2012; Nylund S. et al. 2011; Sveen et al. 2012; Dahle 2015; Røed 2016; Gunnarsson et al. 2017ab; Kindt 2017; Dahle et al. 2020). I Nord-Norge kan også parasitten *Parvicapsula pseudobranchicola* være av betydning for laksens gjellehelse (Karlsbakk et al. 2002; Nylund et al. 2005, 2018; Jørgensen et al. 2011). Kunnskapen om betydningen av hver enkelt patogen for laksens gjellehelse er begrenset, men det synes klart at en rekke ytre faktorer (temperatur, planktonoppblomstring, stress forårsaket av avlusning, AGD-behandling, rensing av nøter, sortering etc.) kan være av betydning.

Kommersielt intensivt lakseoppdrett medfører en rekke steg i produksjon som påfører laksen stress hvor noen eksempler er: a) sjøsetting ved smoltifisering (hele grupper med individer sjøsettes samtidig basert på en vurdering av den generelle smoltstatusen i populasjonen, b) begroing av nøter nødvendiggjør rengjøring hvor de fleste metoder frigjør store mengder biologisk materiale (inkluderte mulige fiskepatogener, nematocyster fra nesledyr, og andre fragmenter fra ulike typer begroingsorganismer) inn i merdene, c) svært lave og høye temperaturer (temperatur stress som ikke kan løses ved at laksen oppsøker områder med mer optimal temperatur), d) alge- og zooplanktonoppblomstring, inkludert toksiske alger og nesledyr, e) behandlinger mot lakselus og amøbegjellesykdom (AGD), f) bruk av semi-lukkede produksjonssystemer (skjørt, S-CCS, landbasert postsmoltproduksjon, RAS-anlegg) med redusert vannutskifting, g) flytting av fisk (sortering, uttak av slaktefisk, etc). Det er godt dokumentert at denne type inngrep, som fører til avvik fra laksens naturlige levested, medfører stress, men det er mindre kjent hvordan slike stress-situasjoner påvirker gjellehelsen hos oppdrettslaksen. I et sterilt miljø vil laksen kunne bruke all energi på å gjenopprette den normale homeostasen, men ved tilstedeværelse av patogener vil denne kostnaden sannsynligvis øke betydelig. Dette kan medføre så store patologiske endringer i gjellevevet slik at fisken vil vise tegn

på sykdom (redusert velferd) og i de verste tilfeller vil resultatet være dødelighet. Det er blant annet rapportert om blødninger i hoderegionen som følge av termisk behandling (Fiskehelse rapporten 2017) og gjelleblødninger hos stor fisk som følge av spyling (Gismervik et al 2017). Slike gjelleblødninger har vært ansett som årsak til dødelighet hos stor fisk etter mekanisk behandling i enkelte tilfeller.

Salget av medikamenter for å bekjempe lakselus gikk kraftig ned i 2017 og er nå nede i nivåene som ble brukt tilbake i 2005 (kilde: Folkehelseinstituttet). Dette er imidlertid ikke fordi resistensproblemene har avtatt eller fordi en har mindre problemer med lakselus, men fordi antallet ikke-medikamentelle eller mekaniske behandlinger mot lakselus har økt betraktelig de siste årene (1669 medikamentfrie behandlinger i 2017 kontra 202 i 2015) (tall fra Fiskehelse rapporten 2017). Salgstallene for medikamenter de siste tre årene viser at oppdrettsnæringen har endret bekjempelsesmetoder mot lakselus, fra medikamentelle til en dreining mot bruk av ferskvann, varmt vann, og mekaniske behandlingsmetoder. I den forbindelse er det viktig at man kartlegger hvilken effekt slike behandlinger har på fiskens gjellehelse og hvilke endringer dette fører til hos fisken med tanke på patologi og endring i mikroflora som igjen er viktig for fiskens immunforsvar.

Det kan ikke utelukkes at enkelte typer behandlinger av oppdrettslaks (eks. mekanisk avlusning og spyling av nøter) kan gi alvorlige gjelleskader og eventuelt føre til dødelighet. Muslinger og andre begroingsorganismer kan fungere som vektor eller midlertidig reservoar for ulike typer fiskepatogener som inkluderer virus, bakterier og parasitter (Meyers, 1984; Tan *et al.*, 2002; Karlsbakk *et al.*, 2010; Pietrak *et al.*, 2012; McConnachie *et al.*, 2013; Molloy *et al.*, 2013; Hellebo *et al.*, 2016). Det er ikke uvanlig at nøter spyles ukentlig når påvekst av begroingsorganismer er størst (sommer/høst). Spyling av nøtene kan derfor bidra til økt spredning av fragmenterte groe og smitte på lokaliteten som vil øke fare for gjelleirritasjon og infeksjoner (Fitridge et al. 2012; Floerl et al. 2016).

Bakteriepopulasjonene som er til stede på fiskens overflater, som hud, gjeller og tarmkanal reflekterer miljøet fisken lever i (Cahill 1990, Austin 2002, 2006). Indre organer som lever, nyre og milt hos frisk fisk kan også inneholde bakterier. Store bakteriemengder er rapportert fra gjellevev ($< 10^6$ bakterier per gram med gjellevev) (Austin 2002, 2006). Den bakterielle mikrofloraen på gjeller varierer også mellom fiskearter og det kan ikke utelukkes at sammensetningen av bakteriefloraen på gjellene kan påvirke AGD-utviklingen og virulensen til *P. perurans*. Det har vært foreslått at *P. perurans* sin evne til å infisere og gi gjellesykdom kan fremmes av tilstedeværelsen av enkelte bakterier, slik som *Winogradskyella* (Embar-Gopinath et al. 2005). Videre har det vært foreslått at bakterier kan utgjøre en viktig matkilde for amøber under kolonisering og den innledende fasen av infeksjonen (Embar-Gopinath et al 2005). Som et motstykke til denne teorien er det vist at enkelte *Paramoeba* stammer isolert fra gjeller hos laks med AGD ikke er bakteriespisende (Dykova and Lom 2004). Det er dermed

klart at interaksjonen til ulike gjellebakterier og amøber under AGD-utvikling ikke har ikke vært nok studert og bør gis ytterligere oppmerksomhet.

Mikrobiota hos stor laks har vist seg å kunne være svært forskjellig fra det en finner i det omkringliggende miljø (Karlsen et al 2017). Mikrobiota hos frisk laks kan fungere som en barriere mot skadelige patogener ved, for eksempel å redusere andelen tilgjengelig næringsstoffer, hindre feste og kolonisering, frigjøre toksiske metabolitter, og ved å nedbryte virulens faktorer ved frigjøring av proteaser (Dalsgaard 1993, Koziel & Potempa 2013). Bruk av ferskvann i behandling mot AGD kan tenkes å ha en betydelig innvirkning på den naturlige mikrobiota på laksens gjeller og ved tilbakeføring til fullt sjøvann kan en slik endring resultere i invasjon av patogene bakterier. En av de vanligste behandlingene for AGD er ferskvannsbehandling, og ved overføring fra ferskvann til sjø endres hud mikrobiotaen hos laks (Lokesh & Kiron 2016). Dette betyr at kort tid etter tilbakeføring til sjø vil mikrobiotaen kunne bli betydelig påvirket av fakultative patogene bakterier i miljøet. Kunnskap om mikrobiota og patogener på gjellene hos laks og endringer i mikrobiotasamfunnet, som følge av raske miljøendringer (eks. behandlinger), vil være av stor betydning for valg av metode for behandling mot lakselus/AGD, og vil også kunne gi viktig informasjon om enkelte av dagens metoder må modifiseres eller er uegnet til slik behandling.

Prosjektet skal undersøke hvordan produksjonsstress (mekanisk behandling mot lakselus, ferskvannsbehandling mot AGD, og spyling av nøter) påvirker gjellehelsen hos laks. Det vil bli lagt særlig vekt på patologiske forandringer i gjellevevet, immunologiske responser, endringer i belastning av patogener, endringer i sammensetning av mikrobiota på gjellene.

• Prosjektets omfang

Prosjektet er inndelt i åtte arbeidspakker; **API** - Mekanisk avlusning, **APII** - Ferskvann til behandling mot AGD, **APIII** - Spyling av nøter, **APIV** - Patologi, **APV** - Immunresponser hos laksen, **APVI** - Kvantitative forandringer av kjente lakse-patogener, **APVII** - Kvalitative og kvantitative forandringer i mikrobiota på gjellene, **APVIII** - Effekt av mekanisk stress i patogenfritt miljø. Arbeidspakkene API – APIII omfatter innsamling av data og vev fra laks/regnbueørret som; a) gjennomgår mekanisk avlusning, b) ferskvannsbehandling mot AGD, og c) notvask. I APVIII vil effekten av behandling mot lakselus og *P. perurans* (AGD) i et patogenfritt miljø bli testet eksperimentelt (dvs etter smittetest på frisk laks). I de andre arbeidspakkene (APIV – APVII) vil materialet fra feltinnsamlingen og etter eksperimentell smitte bli analysert.

• Prosjektorganisering

Prosjektet ble ledet av Professor Are Nylund og involverer partnere fra Universitetet i Stirling (Prof. Simon MacKenzie og Benjamin GJ Clokie, Ahmed Elsheshtawy, Amaya Albalat, Allan Beveridge), NORCE (forsker Trond E. Isaksen), ILAB (forsker Linda Andersen og Steffen Blindheim), og Pharmaq Analytiq (forsker Alf Dalum, Stian Nylund, Liv Sandlund). Fra Universitetet i Bergen har følgende personer deltatt i prosjektet; Faezeh Mohammadi, Lindsey Moore, Christiane Trösse, og Erwan Lagadec, samt seks masterstudenter (Birgit L. Kvåle, Elisabeth Napsøy, Sogni Wiik, Pernille L. Lyng, Oda Gjerde, Anna N. Johansen). Prosjektleder har ansvar for å sikre at arbeidet holder nødvendig vitenskapelig kvalitet og har legitimitet som uavhengig forskning.

Dr. Trond Isaksen har vært ansvarlig for APIII (blant annet: kartlegging av begroingsorganismer på nøter før og under spyling av nøtene).

Dr. Alf Dalum har vært ansvarlig histopatologiske undersøkelser (APIV) i første del av prosjektet. Etter at Dalum sluttet i Pharmaq Analytiq overtok UiB ansvaret for de histopatologiske undersøkelsene.

Professor Simon MacKenzie (i samarbeid med Benjamin GJ Clokie, Ahmed Elsheshtawy, Amaya Albalat and Allan Beveridge) har vært ansvarlig for kartlegging av immunresponser og kvantitative og kvalitative forandringer i mikrobiota på gjellene hos laks fra arbeidspakkene API – APIII og APVIII.

Dr. Linda Andersen og Steffen Blindheim har vært ansvarlig for gjennomføring av de eksperimentelle behandlingsforsøkene i laboratorium (APVIII).

Professor Are Nylund har, i tillegg til å være prosjektleder, hatt ansvaret for innsamling av materialet fra fisk i API – APIII og APVIII, for analysene i APVI, og delvis for analysene i APIV.

I referansegruppen har det vært representanter fra Måsøval Fiskeoppdrett (Arnfinn Aunsmo), Lerøy Seafood Group (Bjarne Reinert), Cermaq (Henrik Duesund), Salmar (Marianne Halse), Hav Line (Carl Erik Arnesen), AS Bolaks (Florian Sprater), Bremnes Seashore (Øystein Staveland), og Blom Fiskeoppdrett (Glenn Sundnes). Referansegruppen har en rådgivende rolle i prosjektet.

Prosjektet har vært gjennomført i samarbeid med følgende produsenter av laksefisk på Vestlandet: Bolaks AS, Firda Sjøfarmer AS, Blom Fiskeoppdrett AS, Lerøy Seafood Group ASA.

3. Problemstilling og formål

• Redegjøre for prosjektets effektmål

FHF har hatt som prioritert forskningsområde å *«fremskaffe kunnskap og verktøy som kan forebygge dødelighet og velferdsutfordringer forbundet med nedsatt gjellehelse og gjellelidelser hos oppdrettet*

laksefisk.» Nye løsninger på problemer knyttet til fiskehelse og -velferd er nødvendig for å sikre videre, god vekst i norsk laksefisk oppdrett. De siste årene er en rekke nye teknologier tatt i bruk for avlusing (mekaniske avlusinger), AGD-behandling (med ferskvann), og rengjøring av nøter. Alle slike behandlinger medfører stress for laksen og bruk av disse teknologiene synes å gi en noe økt dødelighet under og i etterkant av behandling. Særlig har slik dødelighet vært knyttet til dårlig gjellehelse i forkant og etter behandling. Med dette som utgangspunkt hadde prosjektet som mål å fremskaffe ny kunnskap som kan bidra til bedre driftsrutiner og metodevalg ved ulike typer behandlinger, og dermed sikre bedre gjellehelse og fiskevelferd hos oppdrettet laksefisk.

Resultatene fra prosjektet kan brukes som en veiledning til lakseprodusenter med henblikk på hvilke undersøkelser som bør gjennomføres før behandling for å sikre best mulig gjellehelse hos laksen under og etter behandling. Videre gir prosjektet en veiledning om konsekvensene for laksens gjellehelse ved bruk av de oppgitte behandlinger. Bør noen av de tilgjengelige teknologiene endres/modifiseres eller tas ut av bruk? Reduserte tap etter behandlinger mot lakselus, AGD og notvask vil i betydelig grad øke lønnsomheten/reducere kostnadene i norsk lakseoppdrett. Og like viktig er at en bedre gjellehelse gir generelt en bedre fiskehelse, noe som er svært viktig for dyrevelferden.

• Redegjøre for prosjektets resultatmål

Hovedmålet var å fremskaffe ny kunnskap som skal resultere i anbefalte tiltak (driftstiltak) som vil gi bedre gjellehelse hos laks i sjø og følgelig redusere tap knyttet til drift av sjøanlegg. Prosjektet har fokusert på identifisering av risikofaktorer (miljøstress, patogener, og endringer i gjellemikrobiota) for utvikling av gjellelidelser, og indikatorer (patologi, immunresponser, mikroparasitt prevalens, tetthet og diversitet) som kan brukes til objektiv vurdering av gjellehelse før og etter stressbelastninger (mekanisks avlusing, bruk av ferskvann til behandling mot AGD, og notvask).

Delmål har vært:

- Kartlegge effekten av mekanisk avlusing
 - o i vanlig produksjon med flere gjellepatogener til stede (API), og
 - o i eksperimentelt oppsett med kun *L. salmonis* til stede på gjellene hos laks (APVIII).
- Kartlegge effekten av behandling mot AGD ved bruk av ferskvann
 - o i vanlig produksjon med flere gjellepatogener til stede (APII), og
 - o i eksperimentelt oppsett med kun *P. perurans* til stede på gjellene hos laks (APVIII).
- Kartlegge effekten av utvalgte metoder for rengjøring av nøter (APIII).

Analysen av materialet fra Arbeidspakkene API – APIII og APVIII har vært gjennomført i arbeidspakkene APIV – APVII.

4. Prosjektgjennomføring

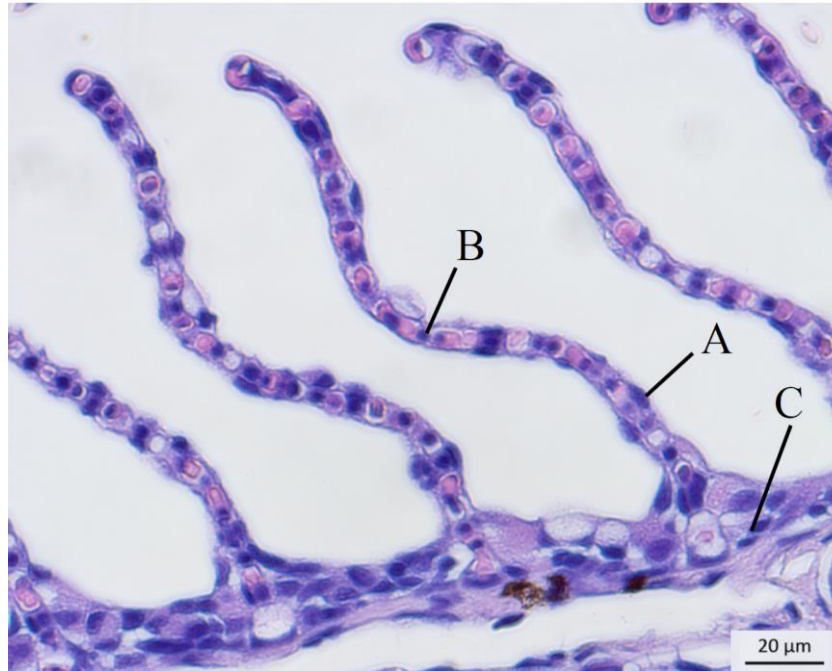
• Beskrivelse av metodikk

Gjellesykdommer hos laksefisk i Norge er som regel forårsaket av et kompleks av flere patogener og ytre faktorer som påfører fisken stress (Nylund et al. 1998, 2007, 2011; Steinum et al 2010; Gjessing et al. 2019). Det faktum at det ikke har vært mulig å dyrke flere av disse i ren kultur for testing i kontrollerte smitteforsøk har bidratt til manglende forståelse av de forskjellige patogener sin betydning for gjellesykdom og dødelighet. Det foreligger heller ingen klar forståelse av hvilke bakterier (mikrobiota) som er essensielle for god gjellehelse og hvilke som utgjør et mulig problem for fisken. Det en imidlertid har observert er at dårlig gjellehelse kan føre til betydelig dødelighet i forbindelse med mekanisk avlusning, behandling mot AGD, og ved rengjøring av nøter, dvs situasjoner som påfører laksefisk i anleggene kortere eller lengre perioder med stress. I denne sammenheng er selvfølgelig også andre patogener (PMCV, PRV1, SAV, IPNV, ISAV) av betydning og kan være medvirkende årsak til dødelighet. I kartlegging av gjellehelsens betydning for hvilke avlusingsmetoder, AGD-behandlinger og rensing av nøter, som kan benyttes uten å resultere i en betydelig økt dødelighet, er det derfor nødvendig å følge aktuelle metoder som brukes i kommersiell drift i områder med gjellesykdommer (API – APIII). For å kartlegge hvilke patogener og mikrobiota som kan disponere for dødelighet i forbindelse med nevnte behandlinger har det vært nødvendig å ta prøver fra fiskepopulasjonene før behandling i tillegg til prøver fra fisk som dør under behandling, og umiddelbart etter behandling. Ved analyser (screening for patogener, immunresponser og endringer i mikrobiota) av innsamlet materiale vil en kunne få kunnskap om hvilke patogener og endringer i mikrobiota som bidrar til dødelighet. Uttak av fisk innen en kort periode etter behandling vil gi svar på om metodene for behandling har hatt en negativ effekt på fiskens gjellehelse, dvs endringer i sammensetning og tetthet av patogener og histologiske endringer i gjellevevet (histopatologi).

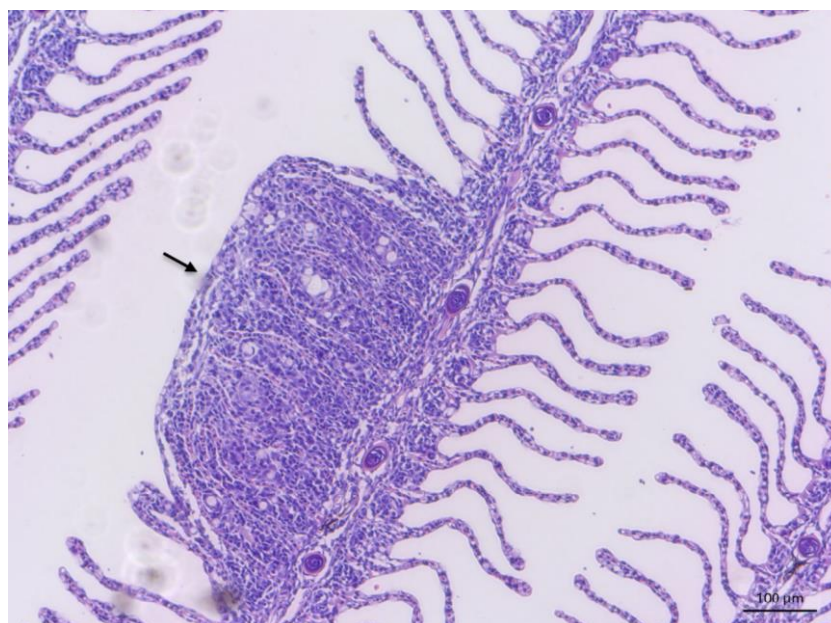
For å kartlegge prevalens, tetthet og diversitet av gjellepatogener, og andre patogener som kan være av mulig betydning for dødelighet i forbindelse med behandlinger, har vi valgt å benytte real time RT PCR analyser for ca 20 vanlige forekommende agens hos laksefisk. Resultatene fra disse analysene blir koblet sammen med klinikk og histopatologi hos fisk før behandling og hos fisk som dør under behandling, og dette gir informasjon om hvilke patogener som dominerer i tetthet hos død-fisk i forhold til tilsvarende forekomst hos fisk før behandling. Tilsvarende kan en også se på endringer i immunresponser og mikrobiota før og etter behandling. Undersøkelse av fisk en til to uker etter

behandling vil også gi informasjon om behandling har hatt en negativ påvirkning på gjellehelsen (målt som økt forekomst av patologi, patogen tetthet, endringer i immunrespons og endringer i mikrobiota). Metodene i dette prosjektet er derfor valgt med utgangspunkt i den gitte målsetting for prosjektet.

Normalstruktur av en primærlamme fra oppdrettslaks (**Figur 1**) og en vanlig observasjon i forbindelse med redusert gjellehelse, dvs sammenvoksinger av sekundærlameller (**Figur 2**).



Figur 1. Mikroskopisk snitt av sekundærlameller hos atlantisk laks. Snittet viser oppbygningen til sekundærlamellene. **A:** epitelcelle, **B:** pillarcelle og **C:** primærlamelle. Bar = 20 µm.



Figur 2. Snittet viser sammenvoksinger av sekundærlammer som følge av inflammasjon og hyperplasi av epitelceller (pil). Bar = 100 µm.

Gjennomføring av prosjektet

Alt feltarbeid (API – APIII), prøvetaking til arbeidspakkene APIV – APVII, har vært utført av UiB i samarbeid med Norce (APIII). Første del av arbeidet på APIV (patologi) ble utført av Alf Dalum mens hovedvekten av arbeidet på denne arbeidspakken har vært utført ved UiB. Videre, har alt arbeidet på APVI (kvantitative forandringer i påvisning av gjellepatogener) vært utført ved UiB. Alle analyser i arbeidspakkene APV (immunresponser hos laks) og APVII (kvantitative og kvalitative forandringer i mikrobiota på gjellene) ha vært utført ved UoS. APVIII (effekt av mekanisk stress i patogenfritt miljø har vært utført av ILAB med noe innsats fra UiB. Analysene av dette materialet er utført ved UoS og UiB.

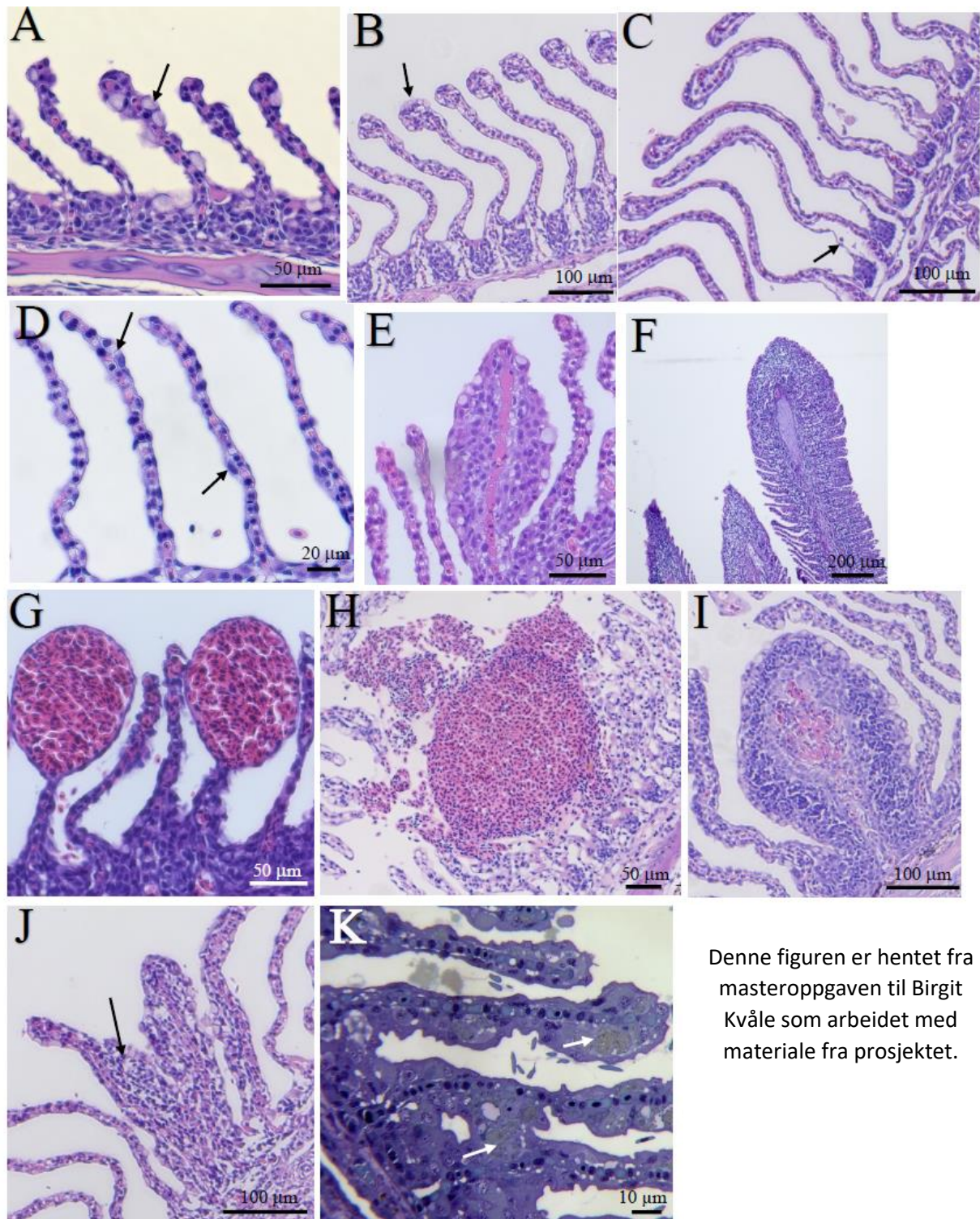
5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Mekanisk avlusing (API og APVIII). Påvirkning på gjellehelse (histopatologi - APIV) og forekomst av patogener (APVI)

Seks mekaniske avlusinger ble fulgt i dette prosjektet: OB (April 2019), BG (September 2019), LK (Desember 2019), SB (September 2021), BG (Juni 2022) og BL (September 2022). De tre første var mekaniske avlusinger hvor det er benyttet Thermolicer (OB og BG) og Optilicer (LK), mens de tre siste (SB, BG, BL) var en termisk avlusing etter fire timers opphold i kjølt ferskvann. I tillegg ble effekten av termisk avlusing undersøkt i patogenfritt miljø (smitteforsøk med lakselus fulgt av termisk avlusing uten pumping av fisk, - APVIII).

Resultatene fra analyse av fisk fra de tre anleggene (OB, BG, LK) som benyttet termisk avlusing, uten først å behandle med nedkjølt ferskvann, viste at hverken patogenbelastningen eller gjellestrukturen (histologi) ble negativt påvirket av behandlingen. Det som påvirket dødelighet i forbindelse med behandlingen, var dårlig gjellehelse og tilstedeværelse av virussykdommer i forkant av behandlingen. Anleggene som ble behandlet om høsten (BG, LK) hadde høyere patogenbelastning enn anlegget som ble behandlet om våren (OB), og dette gav utslag i noe høyere dødelighet i forbindelse med behandlingen. Dødeligheten økte også etter behandlingen på høsten mens det etter vårbehandlingen ikke ble observert økt dødelighet etter behandling (Kvåle 2020). Den termiske avlusningen i alle tre anleggene var effektiv med henblikk på fjerning av lakselus.

Den histologiske gjellescore som ble benyttet i dette prosjektet er basert på 11 karakterer og er eksemplifisert i **Figur 3**.

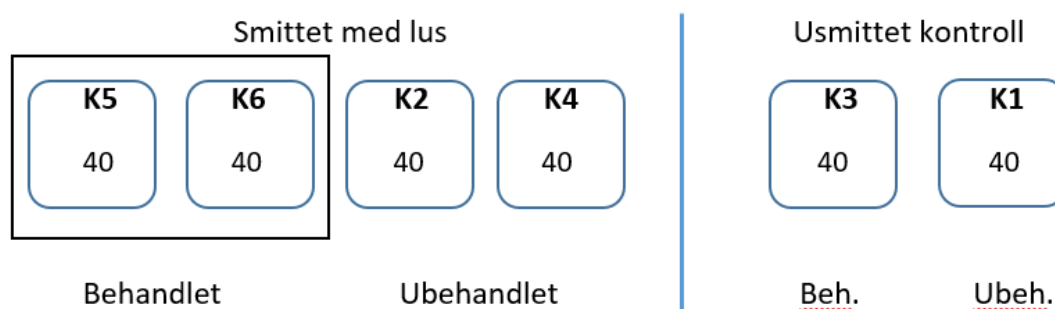


Denne figuren er hentet fra masteroppgaven til Birgit Kvåle som arbeidet med materiale fra prosjektet.

Figur 3. Histologiske snitt som illustrerer 11 patologiske endringer som inngår i det histologiske gjellescoringssystemet benyttet i dette studiet. A. Slimcelle hyperplasi. B. Klubbing. C. «Lifting». D. hypertrofi av epitelceller. E. hyperplasi av epitelceller. F. Fortykket distal primærlamelle. G. Fersk anurisme. H. Blødende anurisme. I. gammel anurisme. J. Inflammasjon. K. Nekrose. Piler viser de ulike endringene. Forstørrelse er gitt på hvert bilde.

Eksperimentell termisk avlusing (APVIII)

I arbeidspakke APVIII ble fire grupper laks (240 laks på 217 gram i snitt fordelt på seks kar: N = 40 per kar) smittet med lakselus (N = 25/fisk) og to grupper ble holdt usmittet (Karmiljø: temperatur = 12 °C og 34‰) (**Figur 4**).



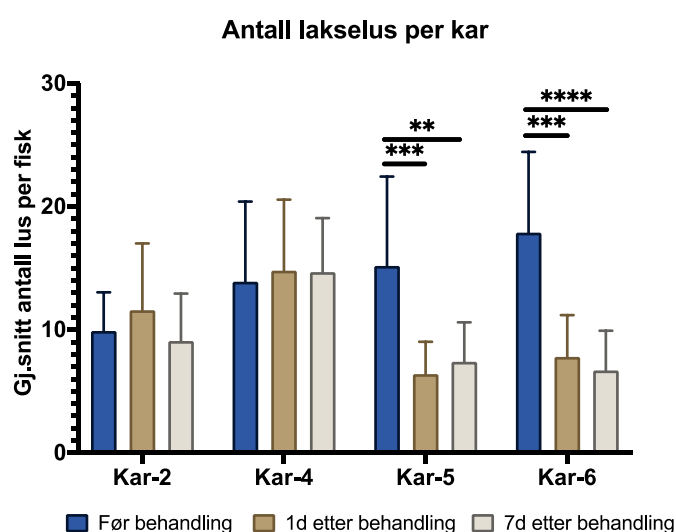
Figur 4. Oppsett for smitteforsøk og termisk behandling mot lakselus. Karene K3, K5 og K6 ble behandlet med 34 °C vann.

Det ble foretatt et uttak av fisk dagen før behandling. Når lusene nådde preadult stadium ble utvalgte grupper (en kontroll og to grupper smittet med lakselus) behandlet med varmt vann (34 °C, og 34‰) i 30 sekunder for så å bli tilbakeført til det opprinnelige karmiljøet. Varmtvannsbehandling ble gjort ved å varme opp ca 150 liter sjøvann til 34°C. Til dette ble det brukt en 1500W varmekolbe, trykkluft (for å unngå overmetning av O₂), og en akvariepumpe for å få sirkulasjon. Trykkluft ble tilsatt karet, vannflyten stoppet, og 2,5 ml aqui-s (forhåndsblandet) ble tilsatt hvert kar. Når fisken var rolig (ca 15 min) ble vannstanden senket. Tre og tre fisker ble så håvet over i behandlingskaret og holdt i 34°C i 30 sekunder, før de ble overført til oppvåkningskaret (12°C sjøvann, tilsatt trykkluft og aqui-s). Når alle fiskene i det aktuelle karet var behandlet ble de overført tilbake til et opprinnelige karet. Etter behandling av hvert kar med lakselus ble vannet i oppvåkningskaret tappet ut og filtrert for å fange opp lakselus som falt av under behandling. Etter hver behandling (av 3 fisk), ble også lus i håven samlet opp i en hvit bakke. O₂ i behandlingskaret var stabilt på rundt 104%, og saliniteten var på 34,4‰. Under behandling var fisken rolig de 5-10 første sekundene, for så å sprelle de neste 20 sekundene. I oppvåkningskaret var de rolige. Det ble observert svart snute på fisker med lakselus som ble behandlet.



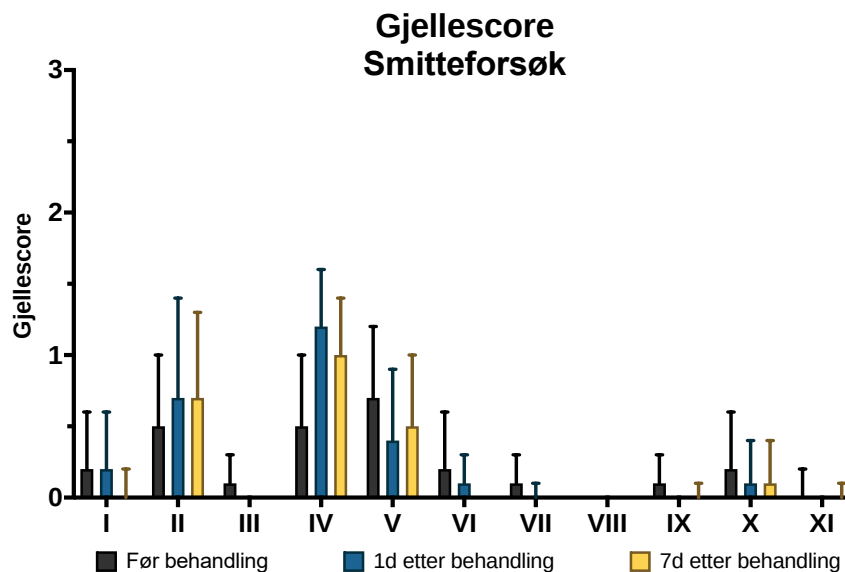
Figur 5. Bildene viser fisk med mørkfarging på snute etter varmtvannsbehandling. Lesjonen på snute oppstod sannsynligvis som følge av fluktrespons i håv under eksponering for varmt vann.

Dagen etter behandling, samt etter 7 dager ble det tatt ut prøver av fiskene. En rekke ulike prøver ble tatt; vekt, lengde, blodplasma, telling av antall lus, gjelleprøver til mikrobiota (swab begge sider 1. gjellebue og ulike gjellebuer i PBS, milt, nyre, lever), real-time PCR (gjeller og nyre) og histologi (blant annet hud og gjeller), samt vannprøver fra karene. Det ble tatt prøver av 10 fisk fra hvert kar ved hvert uttak (til mikrobiota). Den 15.03.2019 ble det observert 2 svimere (1 i K5, 1 i K6) som det også ble tatt prøver av. Svimerne hadde øyelesjoner, sår ved hale, og sår i ansikt der de tidligere hadde hatt svarte områder rett etter behandling. Fisk med lus ble mer påvirket av varmtvannsbehandlingen enn fisk uten lus som ble varmtvannsbehandlet. Dette fordi svarte snuter ikke kunne ses i gruppe som ble eksponert for varmtvann, men som ikke hadde lus. Dette kan indikere at slike svarte snutelesjoner lettere oppstod hos fisk med lus som kan ha vært stresset, svekket eller hatt nedsatt immunforsvar grunnet luseinfestasjonen (og hvor alle lus var i samme utviklingsstadium, preadult I/II). Behandlingen førte til reduksjon av lakselus på fisken (**Figur 6**), men førte ikke til endringer i gjellescore (**Figur 7**).

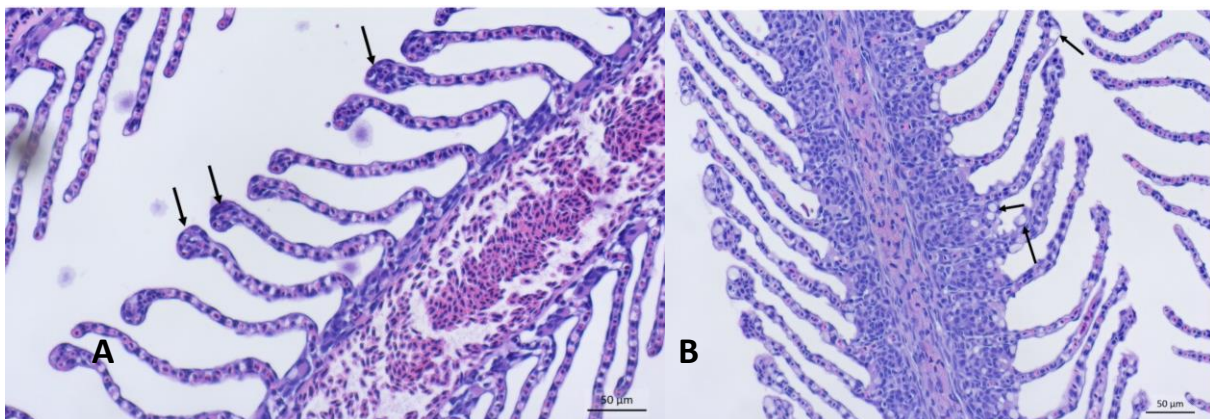


Figur 6. Effekt av varmt vann på lakselus. Lakselus i karene 2 og 4 ble kun behandlet med vann av samme temperatur som i holdekarene, men fisk i karene 5 og 6 ble behandlet med oppvarmet vann (34 °C) i 30 sekunder. Behandlingen med varmt vann gav en signifikant reduksjon i antall lus på fisken.

Aktivitetsnivået til fisken økte i betydelig grad de siste 20 sekunder av behandling og en kunne observere mørkpigmentering på snuten (sannsynligvis som et resultat av kollisjon med karvegg under behandlingen). Det ble ikke observert andre ytre endringer eller skader på fisken, og behandlingen førte ikke til økt dødelighet i karene. Basert på disse data foreligger det ingen indikasjoner på at fisken ble alvorlig skadet under den termiske behandlingen. Denne behandlingen skiller seg fra termisk behandling i felt hvor fisken først trenges sammen og så pumpes opp i kar med varmt vann. Ved behandling i felt vil laksen med andre ord utsettes for en betydelig mer stressende behandling enn det som den ble utsatt for i dette forsøket.



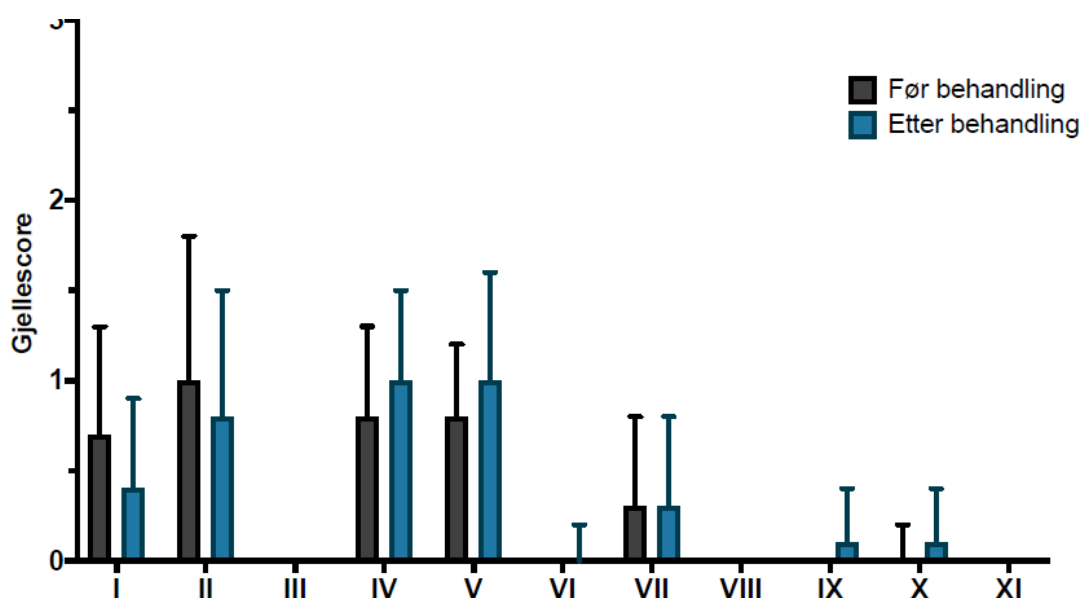
Figur 7. Gjellescore av fisken fra alle seks karene i forsøket (I – XI er de histopatologiske karakterene som det ble fokusert på). Karene smittet med lakselus (karene 4,5,6) fikk en noe høyere score på hyperplasi og hypertrofi av epitelceller, men det ble ikke observert en signifikant forskjell mellom fisk i de seks karene.



Figur 8. A. Klubbing distalt på sekundærlameller hos laks smittet med lakselus (før behandling). **B.** Hyperplasi av epitelceller ved basis av sekundærlameller (kontrollfisk).

Termisk avlusing i felt

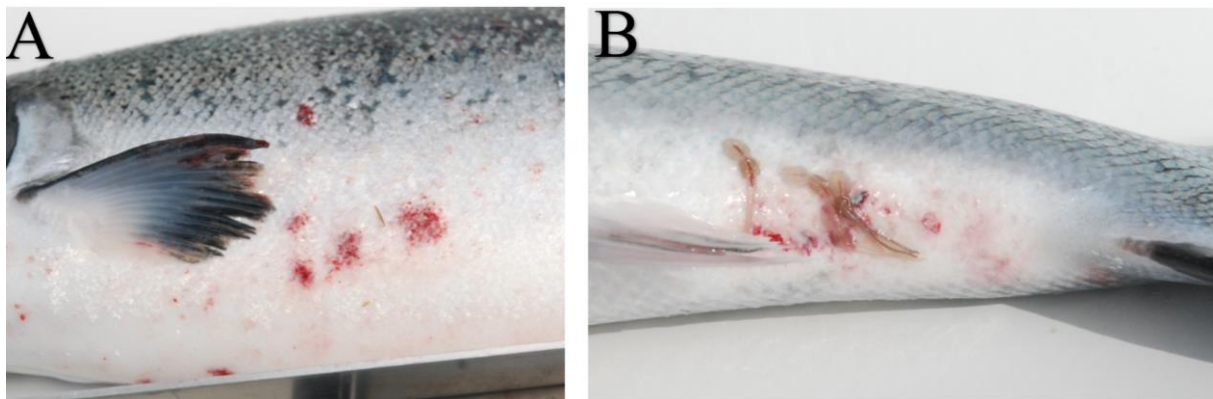
I et av feltforsøkene (anlegg OB) ble laks (vekt = 1046 gram, lengde 45 cm) behandlet med Thermolicer i april 2019. Temperaturen i sjøen var ca 7 °C (salinitet = 32 ‰) og behandlingstemperaturen var 32 °C. Dødeligheten i forkant av behandling var 11/dag mens det døde ca 500 på behandlingsdagen (0,4 % av fisken i merden). Det ble ikke observert noe «gross» patologi på fisken som døde under behandling. I de tre påfølgende dagene døde det henholdsvis 43, 19 og 39 fisk, dvs en dødelighet tilnærmet lik den som var før behandling. Etter dette var den gjennomsnittlige dødeligheten 11/døgn som før behandlingen. Det totale antall lakselus ble redusert fra 4,1 til 0,1 lus/fisk, dvs en signifikant reduksjon ($P < 0,0001$). Hos laksen i anlegget var det signifikant høyere tetthet av *Cand. B. cysticola* hos laks som døde i forbindelse med behandlingen enn hos laks før behandling, og dette høyere nivået av bakterien ble også observert etter behandling. Det var lite endringer i tetthet av andre patogener. Gjellescoren var relativt lik før og etter behandling (**Figur 9**).



Figur 9. Gjellescore av fisken fra anlegg OB (I – XI er de histopatologiske karakterene som det ble fokusert på). Det ble ikke observert en signifikant forskjell mellom fisk fra uttaket før og etter behandling (data fra Kvåle 2020).

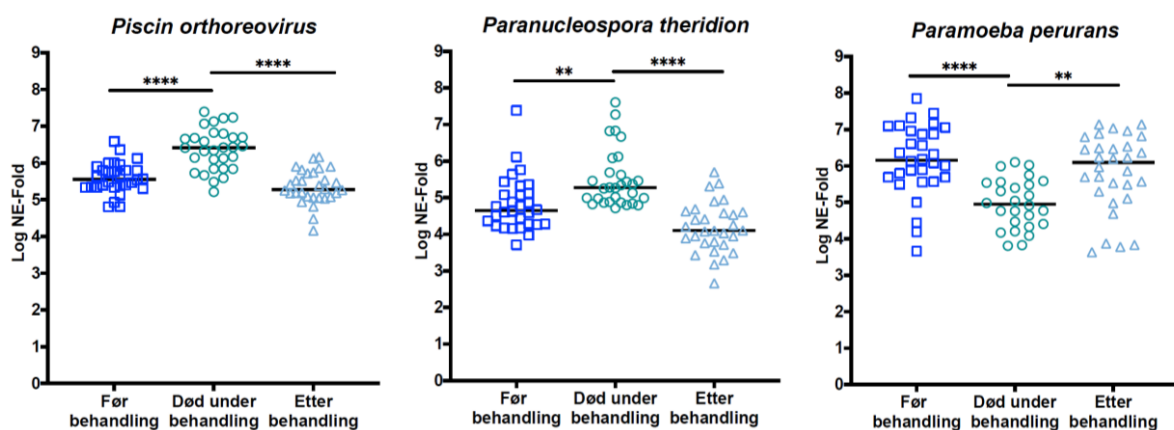
Det andre anlegget (BG) som behandlet laks (vekt = 2894, lengde 61 cm) med Thermolicer i september hadde i gjennomsnitt 4,6 mobile lus /fisk og behandlingen førte til en signifikant reduksjon i antall. Temperaturen i sjø var ca 15 °C før behandling (salinitet ca 34 ‰) og behandlings temperaturen var ca 34 °C. Enkelte fisk i anlegget hadde tydelige hudblødninger før behandlingen startet hvor noen av disse kunne relateres til beiting fra lakselus (**Figur 10**). De fleste fiskene i uttaket etter behandlingen hadde hudblødninger på buken. Det døde 1366 fisk i den aktuelle merden på behandlingsdagen (dvs 0.9 % av fisken i merden) og disse hadde blødninger på buken i tillegg til koagulert blod i perikardial-hulen. I de

påfølgende dagene sank dødeligheten og frem til 23 dager etter behandling var dødeligheten relativt stabil med ca 32 døde per dag.



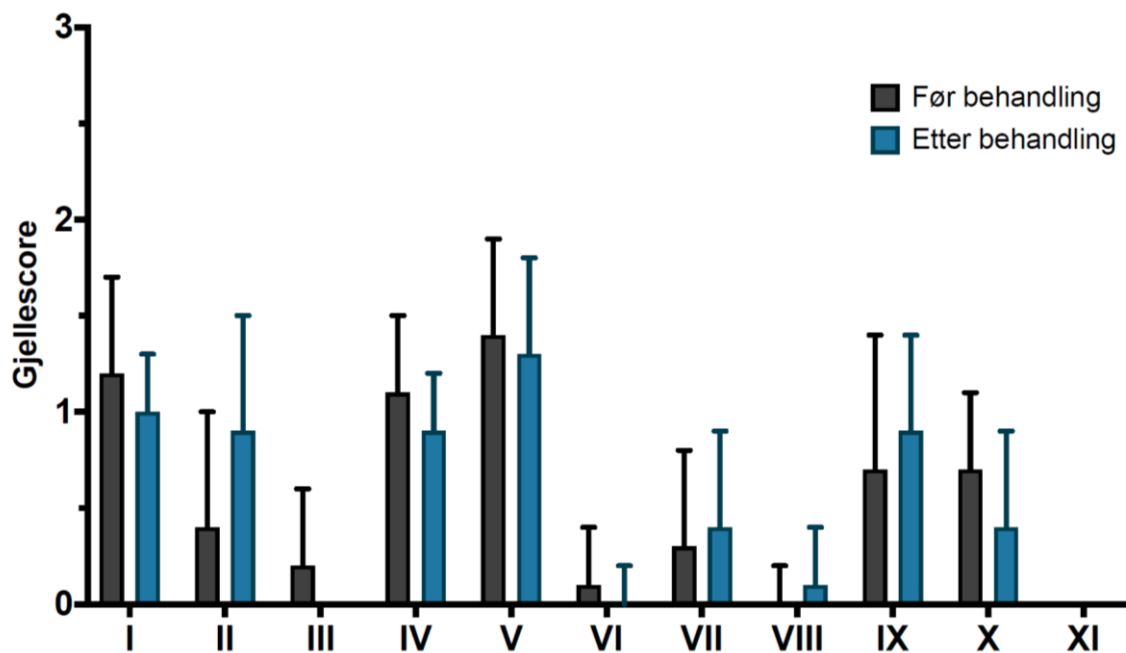
Figur 10. AB. Atlantisk laks fra lokalitet BG med blødninger i huden før behandling med Thermolizer.

En rekke gjellepatogener ble påvist hos fisken i tillegg til PRV1 og PMCV. Det var en signifikant høyere forekomst av PRV1 hos fisk som døde under behandlingen (**Figur 11**) enn hos fisken som ble tatt ut før og etter behandling, mens tettheten av PMCV var tilnærmet lik i alle uttakene. Det ble også observert en signifikant høyere forekomst av *P. theridion* hos dødfisken enn hos fisk tatt ut før og etter behandling, mens det motsatte for tilfelle for tetthet av *P. perurans* på gjellene (**Figur 11**).

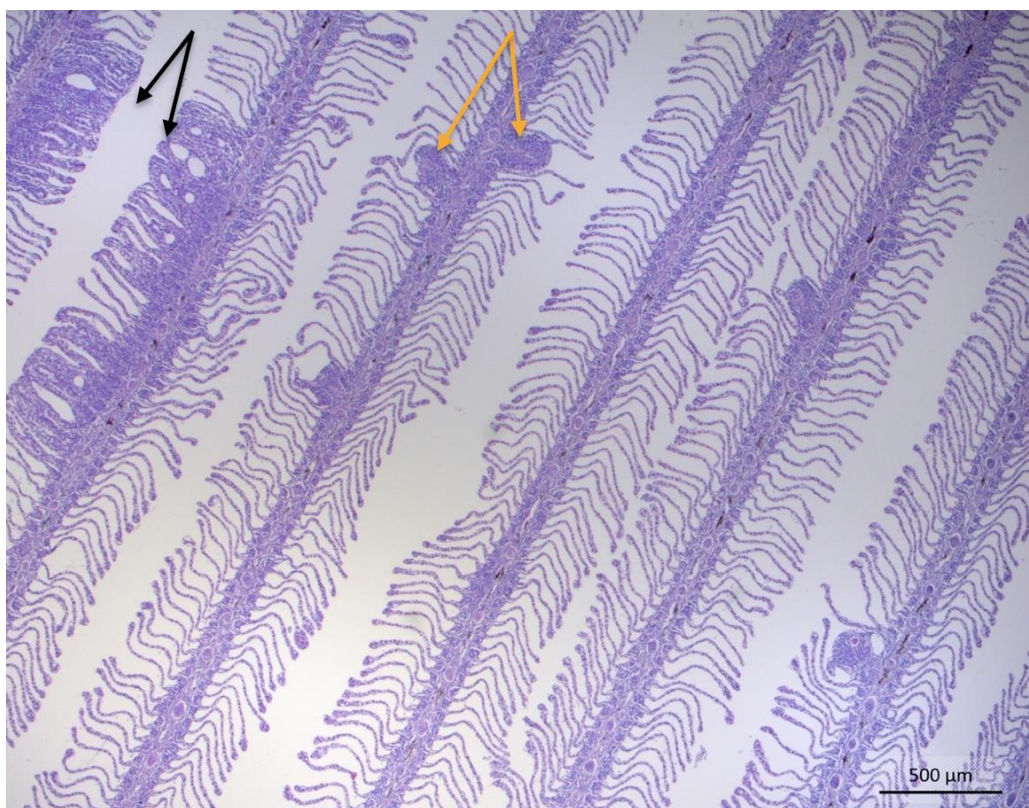


Figur 11. Tetthet av PRV1, *P. theridion* og *P. perurans* før og etter behandling, samt hos laks som døde under behandling. Data er presenter som Log NE-fold (Data fra kvåle 2020).

Undersøkelsene av gjellene hos fisken før og etter behandling viste moderate endringer og det var ingen klar endring av gjellescore hos fisk før og etter behandling (**Figur 12**). Det histologiske hovedfunnene var hyperplasi og sammenvoksninger av sekundærlameller, samt enkelte anurismer (**Figur 13**).

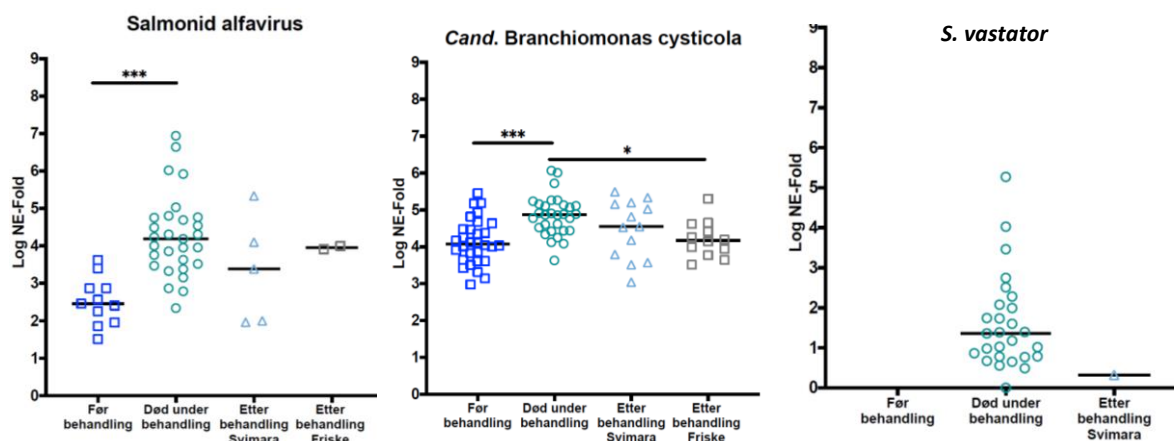


Figur 12. Gjennomsnittlig gjellescore av fisken fra anlegg BG (I – XI er de histopatologiske karakterene som det ble fokusert på). Det ble ikke observert en signifikant forskjell mellom fisk fra uttaket før og etter behandling med unntak av karakter II (= klubbing) (Data fra Kvåle 2020)..



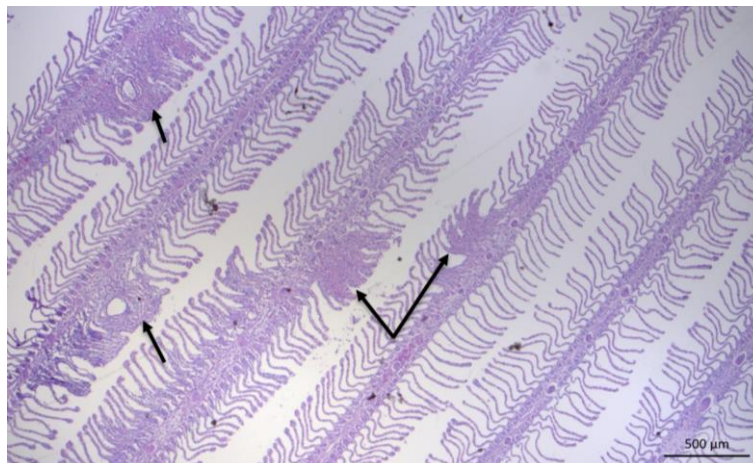
Figur 13. Figuren viser de dominerende endringer i gjellevevet observert hos laksen før og etter behandling (Data fra Kvåle 2020).

På lokaliteten LK ble regnbueørret, *O. mykiss* (vekt = 2185, lengde = 54 cm), behandlet mot lakselus ved hjelp av Optilicer. Før behandling var fisken uten ytre tegn på sykdom, men 23 % av fisken var kjønnsmodne hanner. Temperaturen i sjø under behandling varierte mellom 9,0 til 11,6 °C og saliniteten var 27-31 ‰. Det ble registrert høy dødelighet i forbindelse med behandlingen, men det nøyaktige tallet er ikke kjent. Det var 1,1 lus/fisk før behandling og 0,5 etter behandling. Ved analyse av gjelle- og nyrevev var fisk fra denne lokaliteten positive for følgende patogener: SAV, *PRV1*, *IPNV*, *Cand. B. cysticola*, *Cand. S. salmonis*, *Tenacibaculum spp.*, *T. maritimum*, *P. theridion*, *P. perurans*, *I. salmonis* og *Salmoxcellia vastator*. Prevalens av SAV var høyest hos dødfisken og med en signifikant høyere tetthet sammenlignet med før behandling (**Figur 14**). Tettheten av *P. theridion*, *P. perurans* og *I. salmonis* var lik i uttakene eller fallende (*P. perurans*, *I. salmonis*).



Figur 14. Tetthet av SAV (nyren), *Cand. B. cysticola* (gjeller) og *S. vastator* (nyren) hos hvert enkelt individ. Data er presenter som Log NE-fold (Data fra Kvåle 2020).

Det ble ikke observert betydelige endringer i gjellescore etter behandling (Figur 13). Den dominerende gjellepatologien var hypertrofi og hyperplasi av epitelceller (**Figur 15**).



Figur 15. Vanlige patologiske endringer observert før og etter behandling (Kvåle 2020).

Konklusjon - termisk behandling

Termisk behandling, uten patogener til stede og uten trenging av fisken (eksperimentell gjennomføring), førte ikke til dødelighet og redusert gjellehelse hos laks (Kvåle 2020).

I felt var belastning med patogener på gjellene var høyest om høsten, dvs. i perioden med høy temperatur. Av de patogener, som tidligere har vært trukket frem som viktige gjellepatogener hos laks på Vestlandet, var *P. theridion* og *P. perurans* til stede (Nylund et al. 2008, 2011, Gunnarsson et al. 2017). Den første ble påvist i alle anleggene og på lokalitetene OB og BG var tettheten høyst hos fisk som døde under behandling. *P. perurans* ble påvist i begge anleggene som ble behandlet om høsten, men tetthet av denne parasitten var ikke overrepresentert hos fisk som døde under termisk behandling. Termisk behandling av laks, slik det ble gjennomført i dette studiet, gav ingen betydelig økt dødelighet og ingen klar endring i gjellepatologi og tetthet av gjellepatogener. Årsak til dødelighet hos regnbueørret kan ha vært utvikling av PD etter smitte med SAV3. Ved termisk behandling av fisk smittet med SAV3 må det i hvert enkelt tilfelle vurderes om det er tilrådelig.

Termisk behandling kan gi økt dødelighet ved tilstedeværelse av høy tetthet av enkelte gjellepatogener (*P. theridion*, *Cand. B. cysticola*), samt virusinfeksjoner som SAV, PMCV og PRV1. Det anbefales at det gjennomføres en screening for utvalgte patogener før termisk avlusning gjennomføres. (Detaljer om forsøkene med termisk avlusning finnes i mastergraden til Birgit Kvåle (2020), Universitetet i Bergen, <https://hdl.handle.net/1956/22549>).

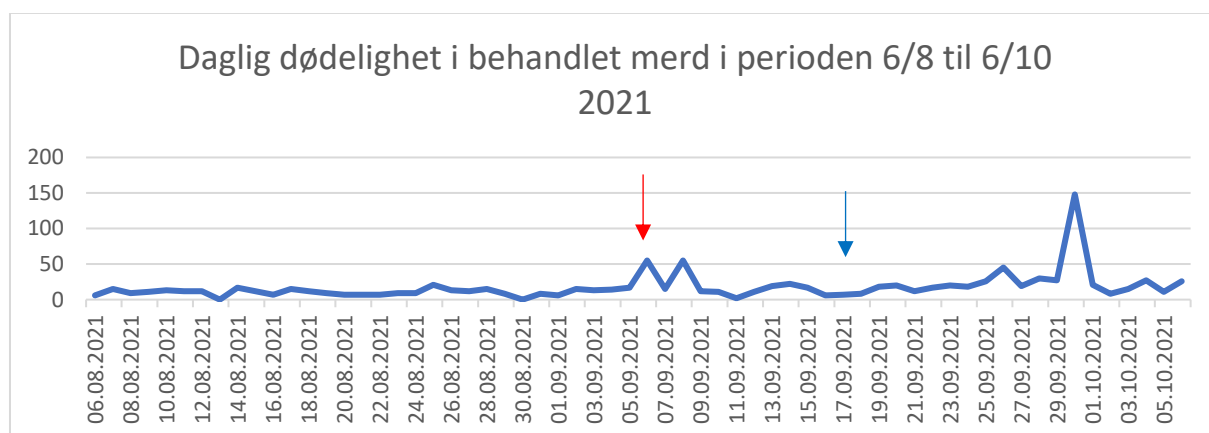
Termisk avlusning av laks etter fire timers opphold i kjølt ferskvann

Basert på erfaringer med kun termisk behandling mot lakselus ble det bestemt å følge tre behandlinger hvor det ble benyttet kjølt ferskvann (6,0 - 8,0 °C) fulgt av termisk behandling med maksimum temperatur på 28-30 °C. Den første behandlingen ble gjennomført i september 2021 (anlegg SB), den andre i juni 2022 (anlegg GB), og den tredje i september 2022 (anlegg LB). Behandlingen i september 2021 (SB) vil bli presentert i detalj i masteroppgaven til Gjerde (November 2022), mens resultatene av behandlingene GB (juni 2022) og LB (september 2022) vil bli presentert i masteroppgaven til Johansen (Juni 2023). Behandling i alle tre anlegg er gjennomført.

Anlegg SB (september 2021)

Første termisk behandling med opphold i ferskvann ble gjennomført i september 2021 (SB) og hadde som mål å redusere forekomsten av både *P. perurans* og lakselus 2021. Fisken (*Salmo salar*) ble først behandlet med ferskvann (8 °C) i fire timer fulgt av en termisk behandling (30 °C). Prøver av 30 laks (gjennomsnittlig lengde, vekt og kondisjonsfaktor var L = 44,3 cm, 1099 gram, og K = 1,3) ble tatt ut 6/09-21, før gjennomføring av

behandling, og 11 dager etter behandling (17/09-21). Prøvene inkluderte telling av lakselus, gjellescore, vevsprøver for histologi og real time RT PCR analyser. I tillegg ble det tatt ut 30 laks som døde under/etter at behandlingen var gjennomført (gjennomsnittlig lengde, vekt og kondisjonsfaktor var $L = 39,5$ cm, 770 gram, og $K = 1,2$). Temperaturen i sjø, ved behandling, var $14,7^{\circ}\text{C}$ og fisken ble overført direkte til ferskvann med en temperatur på 8°C . Den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 30 dager før behandling av 10,6 individer per dag (0,01 %). Behandlingsdagen med de påfølgende to dager var den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 41,6 individer (0,05 %). I de påfølgende dager frem til siste uttak 17. september var den gjennomsnittlige dødeligheten 11,8 individer per dag (0,01 %). Behandling førte med andre ord ikke til noen betydelig økning i dødelighet i observasjonsperioden (**Figur 16**).



Figur 16. Daglig dødelighet i behandlet merd i perioden 6 august til 6 oktober. Behandlingen ble gjennomført 6 september. Rød pil = tidspunkt for behandling. Blå pil = tidspunkt for uttak av fisk etter behandling.

At fiskevelferden i merden var relativt god før, under, og etter behandling støttes også av den registrerte appetitten hos fisken som begynte å spise samme dag som behandlingen hadde vært gjennomført.

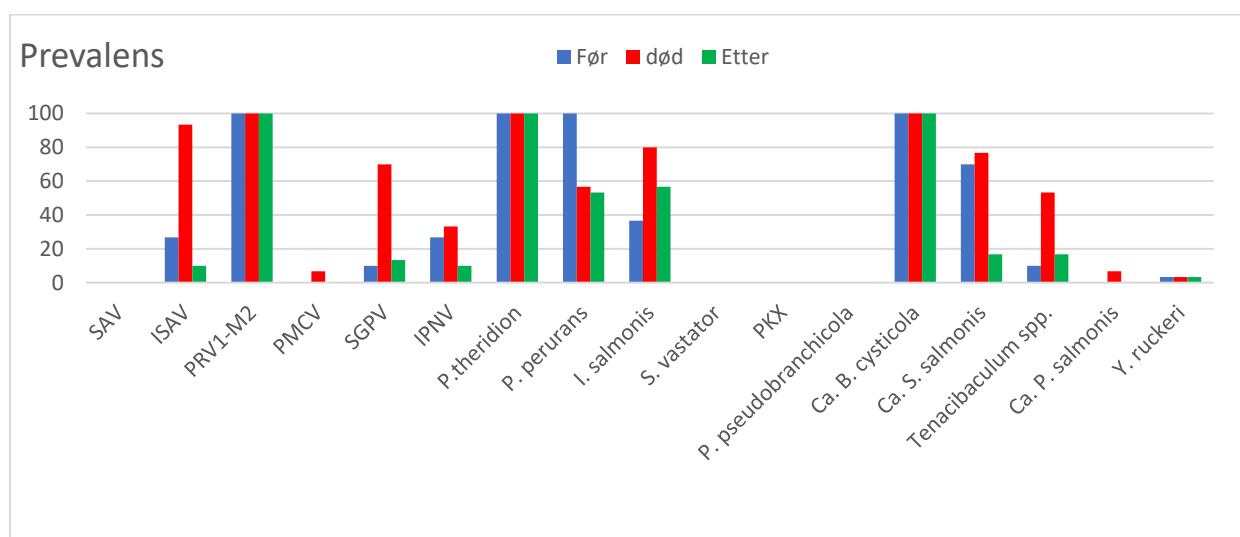
Hos de 30 laks som ble tatt ut før behandling var det i gjennomsnitt 8,6 bevegelige lakselus per fisk, mens 11 dager etter behandling ble det observert et gjennomsnitt på 0,8 bevegelige lus per fisk. Fisken som døde i forbindelse med behandlingen hadde 1.3 bevegelige lus i gjennomsnitt. Beiteskader etter lakselus ble observert både før og etter behandling, mens gjelleforandringer i hovedsak ble observert før behandling (**Figur 17**). Forandringene (gjelle epitelcelle hyperplasi) var forenelig med AGD forårsaket av *Paramoeba perurans* (**Figur 17B**), mens andre gjelleforandringer har tidligere vært assosiert med *Paranucleospora theridion* og Salmonid gjellepox virus (SGPV) (**Figur 17C**). Etter behandling ble det påvist små punktblødninger i huden hos noen få laks. Slike skader har en tidligere sett i forbindelse med mekanisk avlusning (**Figur 17D**). Hos fisken i dette feltstudiet var de observerte skadene få og mindre enn det som har vært observert ved tidligere mekaniske avlusninger.

Prevalens for PRV1, *P. theridion*, og *Cand. B cysticola* var 100 % i alle uttakene, mens den var signifikant lavere for *P. perurans* og *Cand. S. salmonis* etter behandling (**Figur 18**). Tettheten av de to siste var også signifikant

lavere etter behandling av laksen. Behandling hadde en reduserende effekt på både *P. perurans* og lakselus og hadde dermed en ønsket virkning. De laksene som døde under behandlingen hadde en betydelig høyere prevalens av ILAV HPR0, SGPV og *I. salmonis* en hos fisken før og etter behandling. Tettheten av disse var imidlertid den samme i alle tre uttakene. For de andre påviste agens var det kun mindre forandringer i prevalens og tetthet. Detaljer vil bli presenter i masteroppgaven til Oda Gjerne (november 2022).



Figur 17. A. Beitesakder etter lakselus. B & C. Gjelleforandringer (B. epitelcelle hyperplasi og C. Hyperplasi og nekroser). D. Hudsår (piler) observert etter behandling på noen få individer.

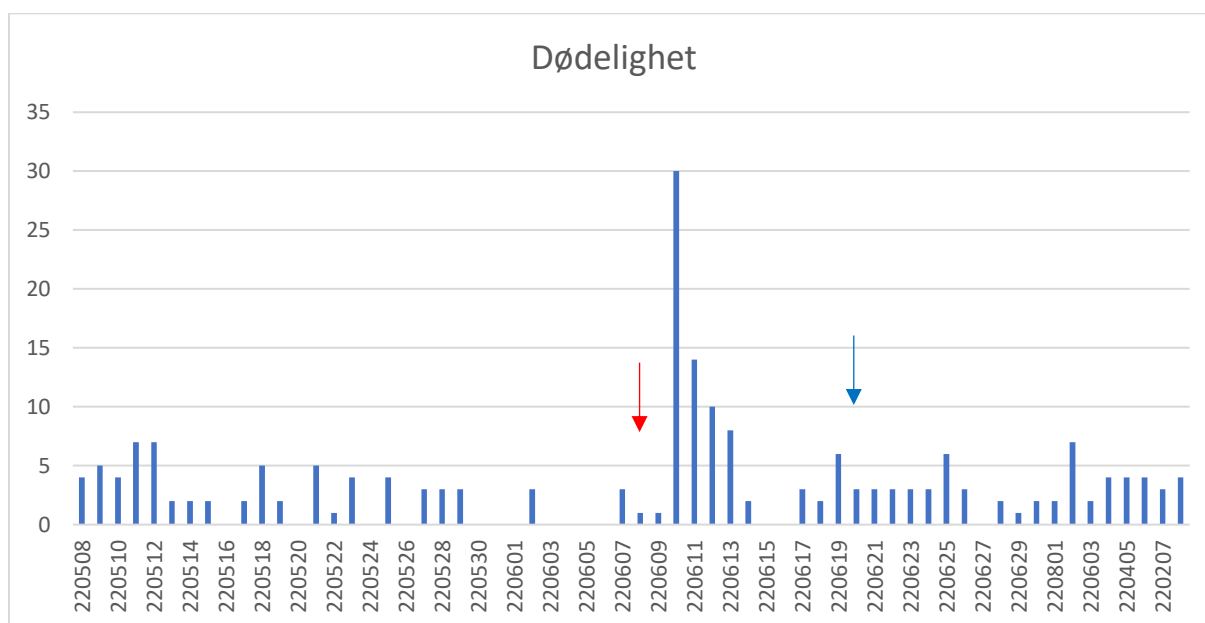


Figur 18. Prevalens av patogener før og etter behandling, samt hos fisk som døde etter behandling.

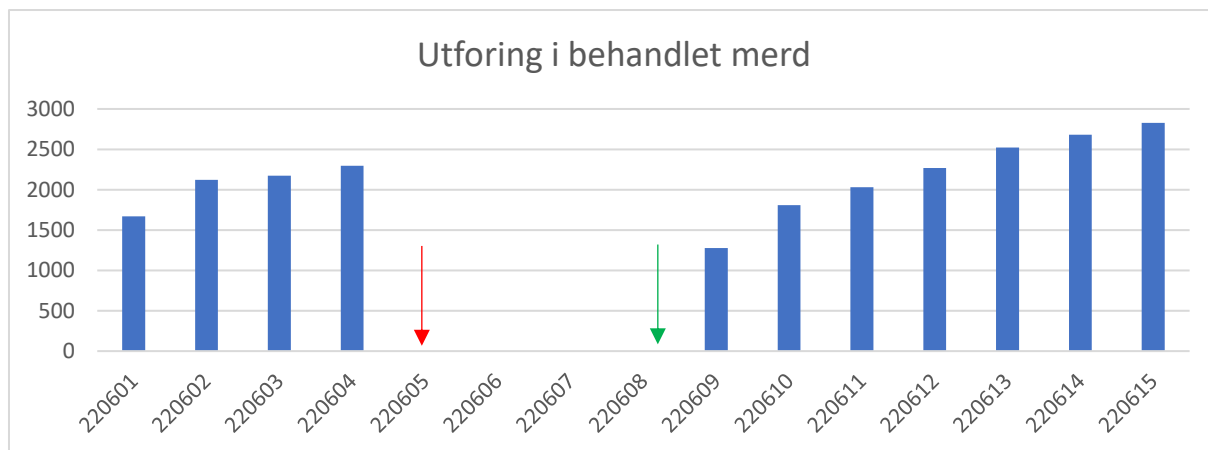
Anlegg GB (juni 2022)

Den andre termiske behandling av laks etter opphold i kjølt ferskvann ble gjennomført i juni 2022 (anlegg GB). Behandlingen hadde kun som mål å redusere forekomsten av lakselus. Fisken (*Salmo salar*) ble først gitt et opphold i ferskvann (8,5 °C) i fire timer fulgt av en termisk behandling (28,5 °C). Prøver av 30 laks (gjennomsnittlig lengde, vekt og kondisjonsfaktor var L = 50,6 cm, 1501 gram, og K = 1,1) ble tatt ut 8/06-2022, før gjennomføring av behandling, og 12 dager etter behandling (20/06-22) (L = 54,1 cm, V = 2000 gram, og K = 1,3). Prøvene inkluderte telling av lakselus, gjellescore, vevsprøver for histologi og real time RT PCR analyser. I tillegg ble det tatt ut 30 laks som døde under/etter at behandlingen var gjennomført (gjennomsnittlig lengde, vekt og kondisjonsfaktor var L = 50,0 cm, 1519 gram, og K = 1,2). Temperaturen i sjø, ved behandling, var 9,1 °C og fisken ble overført direkte til ferskvann med en temperatur på 8,5 °C. Den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 30 dager før behandling var 2,5 individer per dag (0,002 %). De påfølgende fire dager var den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 13,8 individer/dag (0,01 %). I de resterende dager frem til siste uttak 20. juni var den gjennomsnittlige dødeligheten 3,0 individer per dag (0,003 %), og i de følgende 14 dager, etter siste uttak, var den gjennomsnittlige dødeligheten 2,9 individer/dag (0,003 %). Behandlingen førte med andre ord ikke til noen betydelig økning i dødelighet i observasjonsperioden (**Figur 19**).

Fiskevelferden i merden var god før, under, og etter behandling, noe som støttes av appetitten hos fisken som begynte å spise samme dag som behandlingen hadde vært gjennomført. Utforing var tilbake på normalt nivå to dager etter behandling (**Figur 20**).

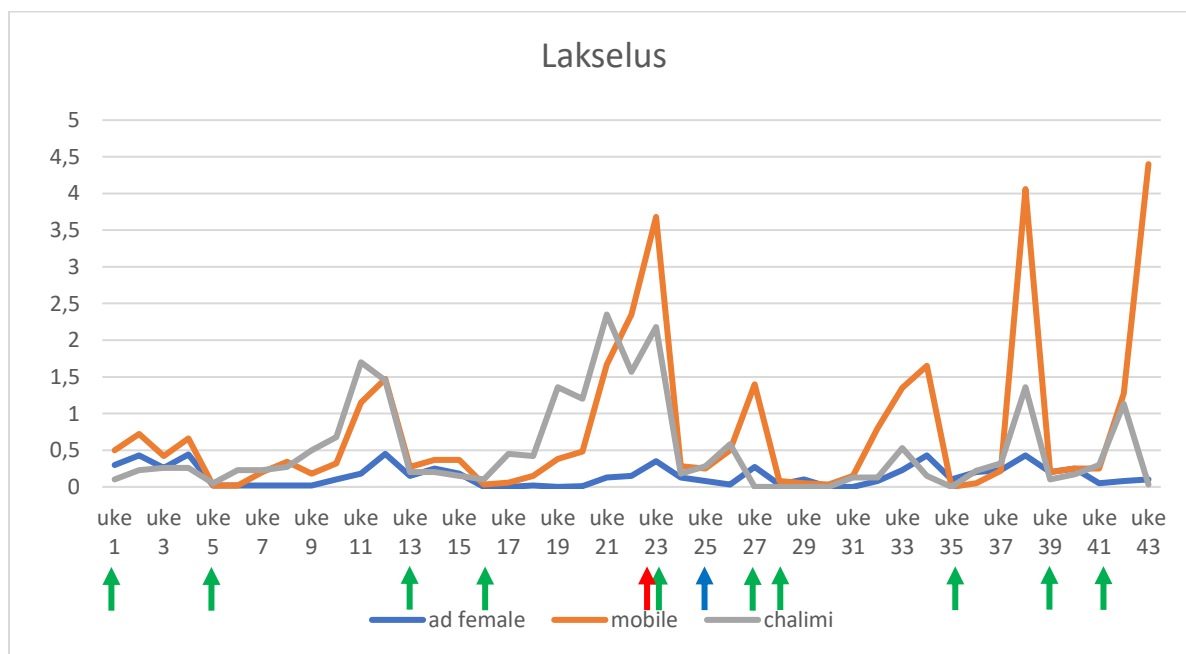


Figur 19. Daglig dødelighet i behandlet merd på lokalitet GB før og etter behandling (ferskvann – termisk behandling). Rød pil = uttak av fisk før behandling (08.06.2022). Blå pil = uttak av fisk 15 dager etter behandling (20.06.2022).

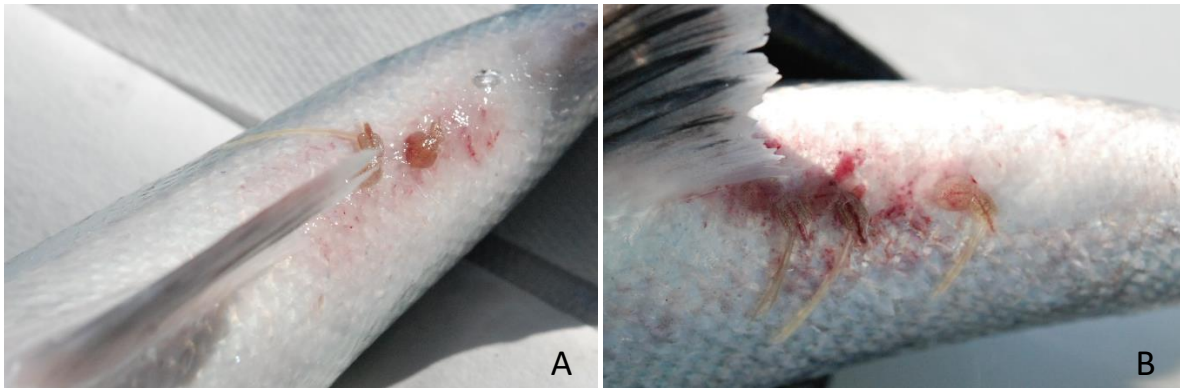


Figur 20. Utforing i behandlet merd før og etter behandling. Rød pil = stopp i utforing før behandling. Grønn pil = tidspunkt for behandling. (X-akse gir dato).

Hos de 30 laks som ble tatt ut før behandling var det i gjennomsnitt 2,9 bevegelige lakselus per fisk, mens 12 dager etter behandling ble det observert et gjennomsnitt på 0,9 bevegelige lus per fisk. Fisken som døde i forbindelse med behandlingen hadde 0,9 bevegelige lus i gjennomsnitt. Anleggets offisielle lusetall kommer frem av **Figur 21**. Beiteskader etter lakselus ble observert hos noen fisk både før og etter behandling (**Figur 22**), mens gjellescore 1 ble observert på enkelte gjelleflater hos 14 individer både før og etter behandling. Det ble ikke observert andre hudsår hos fisk etter behandling, dvs ingen tegn på mekaniske skader hos fisken etter behandling. Enkelte av fiskene som døde etter behandling hadde bleke gjeller og et individ hadde hvite inklusjoner i leveren (**Figur 23**). Ingen av fiskene som døde hadde klare ytre skader som kunne være et resultat av mekanisk påvirkning.



Figur 21. Offisielle lusetall på fisken i anlegget (Uttak før behandling, 8/6 -uke 23, rød pil. Uttak etter behandling, 20/06-22, blå pil). Mekanisk fjerning av lakselus i anlegget (grønn pil).

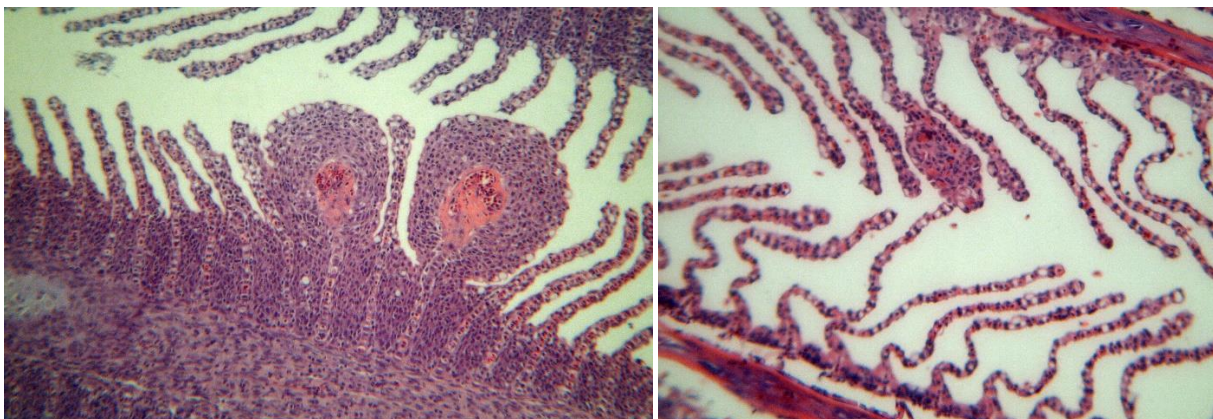


Figur 22. Beiteskader etter lakselus hos noen individer før (A) og 12 dager etter (B) behandling på lokalitet GB.



Figur 23. Bleke gjeller og hvite inklusjoner i lever hos en laks som døde etter behandlingen.

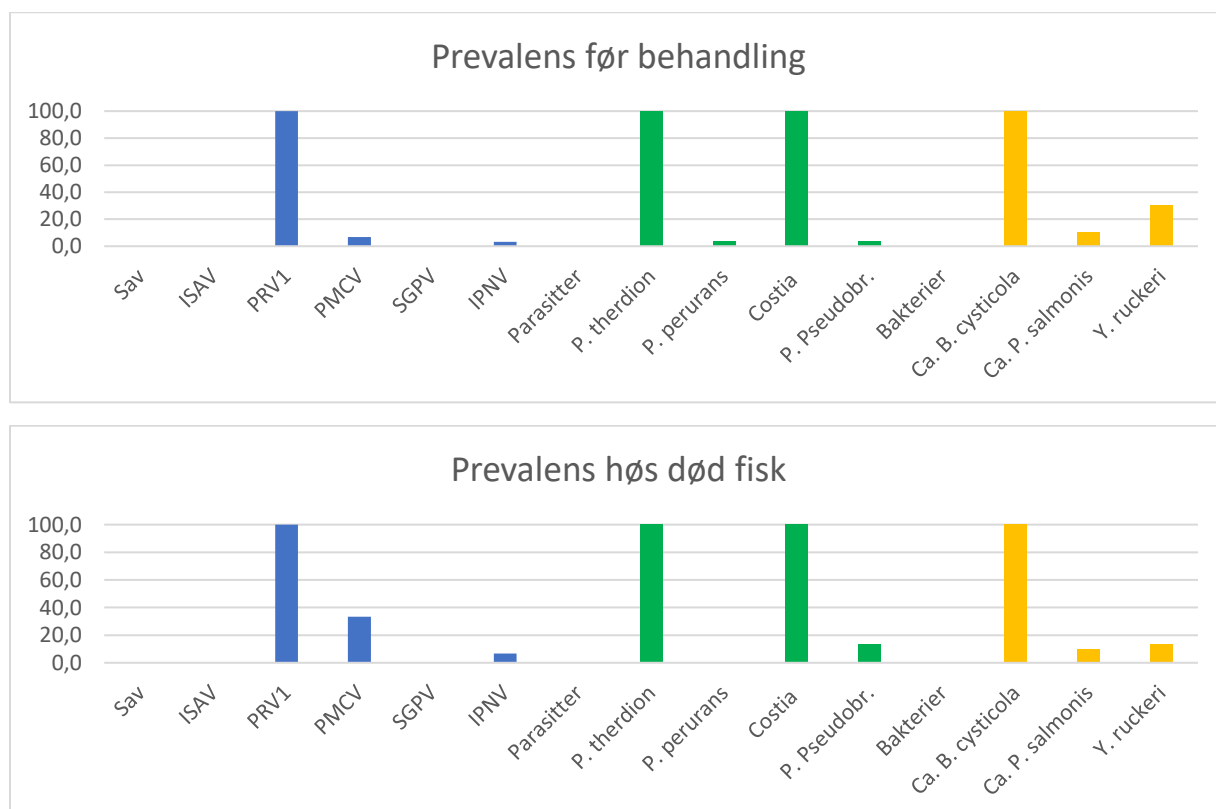
Det ble ikke observert alvorlige histologiske gjelleforandringer hos fisken før og etter behandlingen. Noen få individer hadde små aneurismer på gjellene før behandling, og det ble ikke påvist økning i aneurismer etter behandling (**Figur 24**).

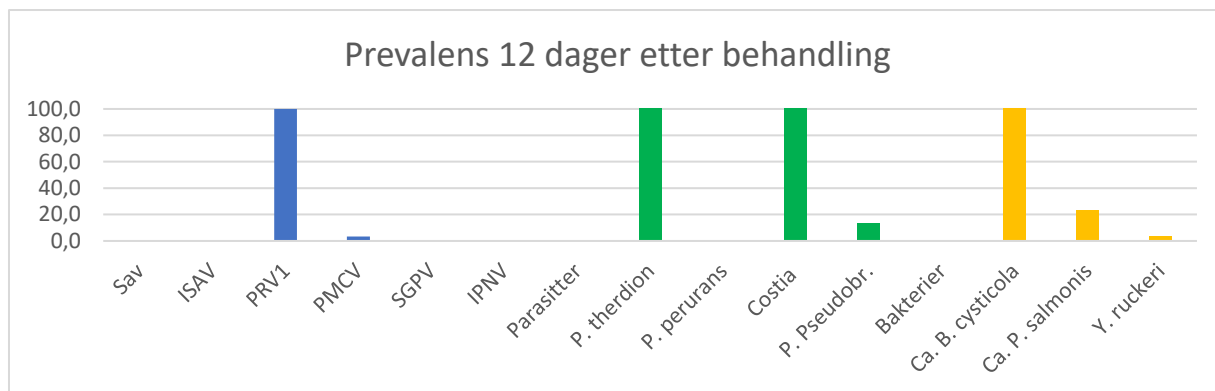


Figur 24. Aneurismer i gjellene hos laks før behandling på lokalitet GB.

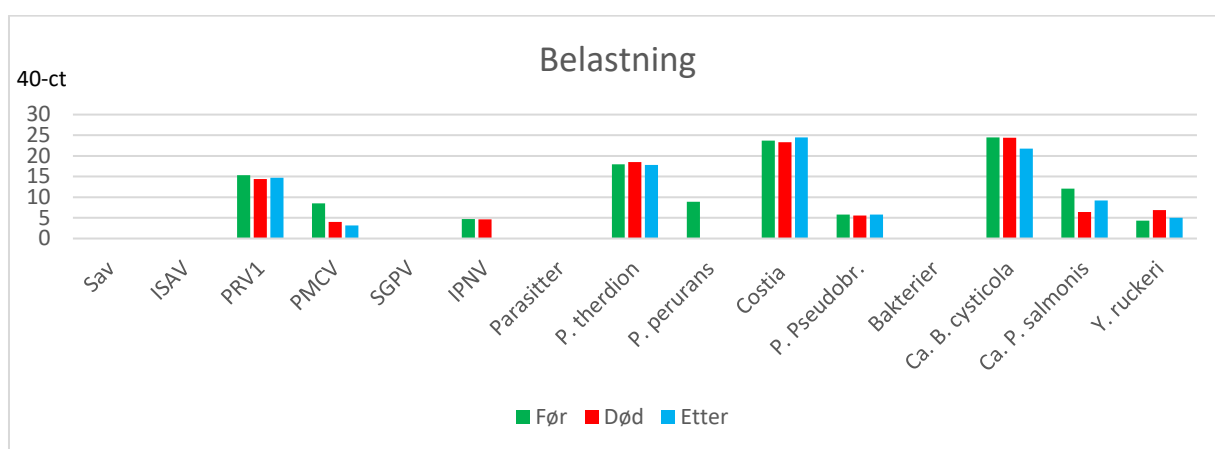
Prevalens for PRV1, *P. theridion*, *Ichthyobodo salmonis* (Costia), og *Cand. B cysticola* var 100 % i alle uttakene (**Figur 25**). Den gjennomsnittlige tettheten av disse fire var den samme både før og etter behandlingen, samt hos død fisk etter behandlingen (**Figur 26**). Hos tre av de døde individene var det imidlertid ekstreme mengder med RNA (Ct verdier < 10) fra *Ichthyobodo salmonis* (Costia) og *Cand. Branchiomonas cysticola*. Dette samt en betydelig belastning av *P. theridion* hos de fleste laksene kan ha svekket gjellene og dermed bidratt til dødelighet i forbindelse med behandlingen.

De andre mikroparasittene forkom i relativt lav prevalens i gjellene. Imidlertid var det en signifikant høyere prevalens av PMCV hos laks som døde etter behandling sammenlignet med laks fra uttakene før og etter behandling. Kun to av de undersøkte laksene før behandling var positive for PMCV (Ct verdier = 24,7 og 38,4), mens en laks var positiv (Ct = 36,8) i uttaket 12 dager etter behandling. Hos fisken som døde under behandling var 10 individer positive for PMCV. Selv om den gjennomsnittlige tettheten av PMCV var høyere hos fisken som døde er det lite sannsynlig at dette viruset var en medvirkende årsak til dødelighet da mengden av virus RNA var lavere enn det som er vanlig å påvise hos laks med utviklet CMS. Alle de positive individene hadde Ct-verdier > 30 med unntak av et individ med Ct-verdi = 25. Her er det imidlertid viktig å være klar over at gjellene ikke er et målorgan for PMCV. Hos individet som døde, med Ct verdi = 25, ble også hjertet undersøkt for RNA fra PMCV og her var Ct-verdien = 21,7. Dette er en verdi som vi tidligere har påvist hos laks med hjertesprekk (CMS). Detaljer vil bli presentert i masteroppgaven til Anna N. Johansen (Juni 2023).





Figur 25. Prevalens av mikroparasitter i gjellen hos laks før og etter behandling, samt hos død fisk.



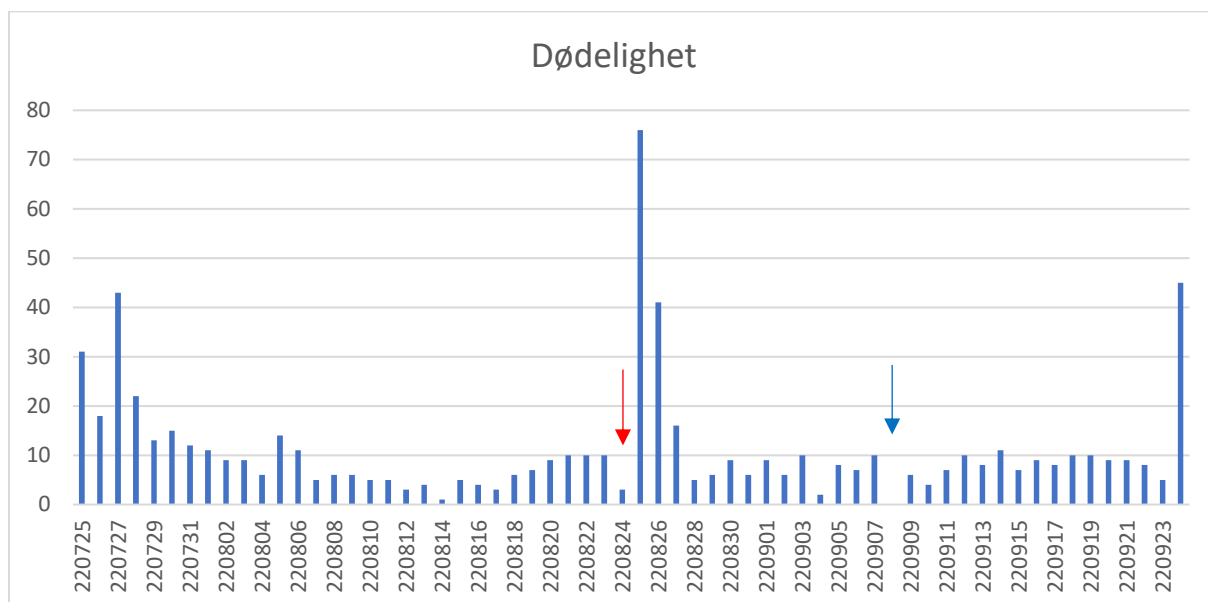
Figur 26. Belastning av mikroparasitter før og etter behandling, og hos død fisk.

Anlegg LB (september 2022)

Den tredje termiske behandlingen av laks etter opphold i kjølt ferskvann ble gjennomført i august/september 2022 (anlegg LB). Fisken (*Salmo salar*) ble først overført til ferskvannsopphold (6,0 °C) i fire timer fulgt av en termisk behandling (28,0 °C). Prøver av 30 laks (gjennomsnittlig lengde, vekt og kondisjonsfaktor var L = 60,1 cm, 2822 gram, og K = 1,3) ble tatt ut 24/08-2022, før gjennomføring av behandling, og 15 dager etter behandling (8/09-22) var L = 61,2 cm, V = 3670 gram, og K = 1,6. Prøvene inkluderte telling av lakselus, gjellescore, vevsprøver for histologi og real time RT PCR analyser. I tillegg ble det tatt ut 30 laks som døde under/etter at behandlingen var gjennomført (gjennomsnittlig lengde, vekt og kondisjonsfaktor var L = 57 cm, 2543 gram, og K = 1,3). Temperaturen i sjø, ved behandling, var 15,8 °C og fisken ble overført direkte til ferskvann med en temperatur på 6,0 °C.

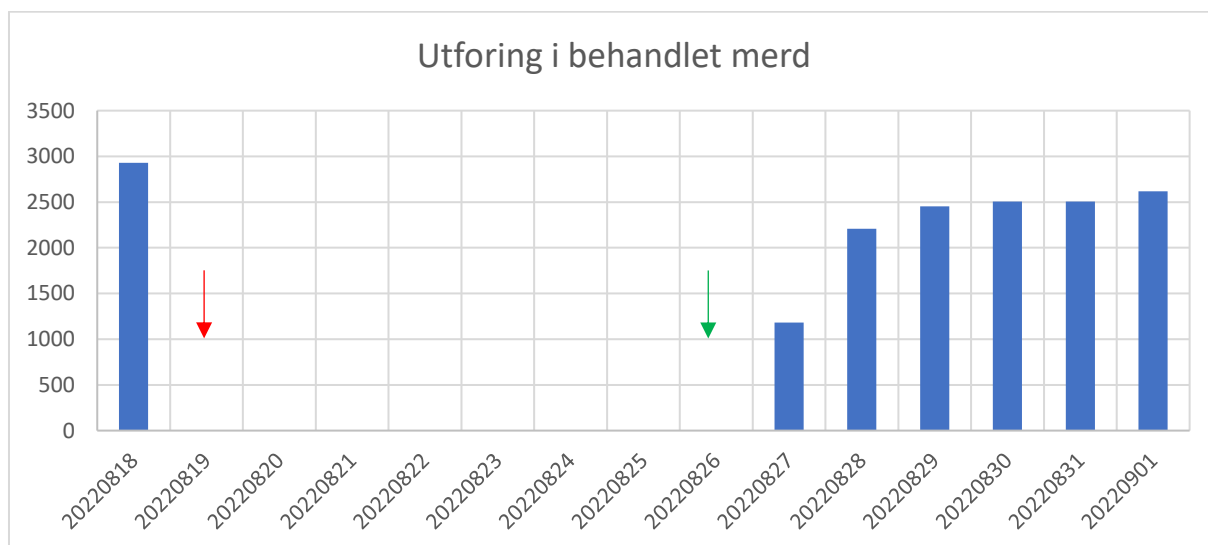
Den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 31 dager før behandling var 10,9 individer per dag (0,02 %). Behandlingsdagen, og de påfølgende tre dager, var den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 44,3 individer

(0,08 %). I de påfølgende dager frem til siste uttak 8. september var den gjennomsnittlige dødeligheten 6,5 individer per dag (0,01 %). De første 14 dager etter siste uttak var den gjennomsnittlige dødeligheten i merden 11,5 individer/dag (0,02 %). Behandling førte med andre ord ikke til noen betydelig økning i dødelighet i observasjonsperioden (**Figur 27**).



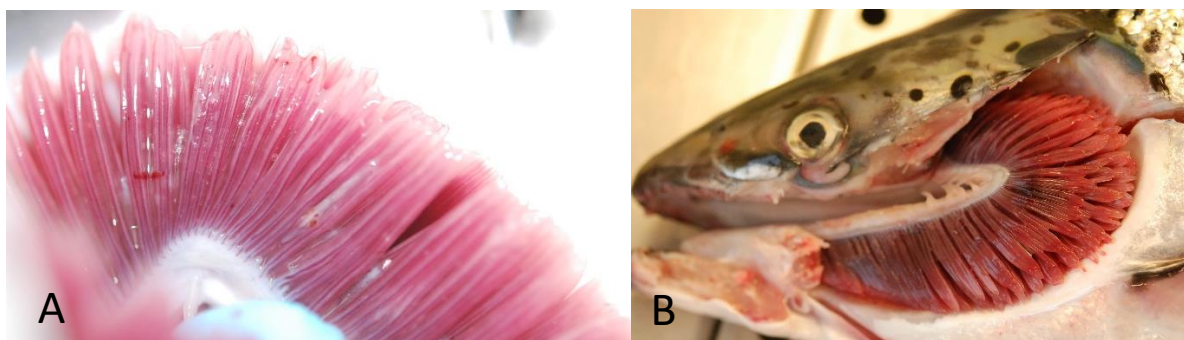
Figur 27. Dødelighet i behandlet merd på lokalitet LB før og etter behandling (ferskvann - termisk). Rød pil = uttak av fisk før behandling 24/08-2022. Blå pil = uttak av fisk 15 dager etter behandling.

Fiskevelferden i merden var god før, under, og etter behandling, noe som støttes av den registrerte appetitten hos fisken, dvs. de begynte å spise kort tid etter behandlingen hadde vært gjennomført (**Figur 28**).



Figur 28. Utforing i behandlet merd før og etter behandling. Rød pil = stopp i utforing før behandling. Grønn pil = tidspunkt for behandling. (X-akse gir dato).

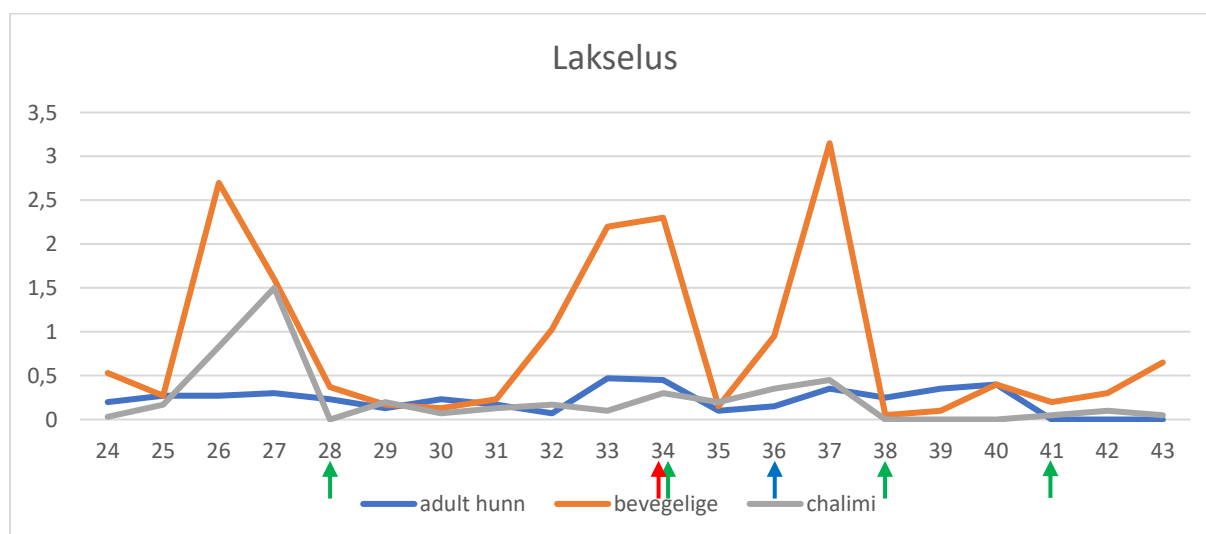
De fleste fiskene hadde lytefrie gjeller og det ble kun registrert gjellescore 1 på enkelte gjelleflater hos fem laks før behandling. En laks hadde gjellescore 2 på en flate. Etter behandling hadde enkelte gjelleflater hos flere fisk (N = 12) gjellescore, men graden var den samme som før behandlingen. Fisken som døde under behandlingen gav samme bilde av gjellene, men enkelte individer hadde bleke gjeller og hos et individ var det blødninger på gjellene (**Figur 29**).



Figur 29. A. Gjelleforandringer hos laks før behandling. B. Gjeller fra død fisk etter behandling.

Hos de 30 laks som ble tatt ut før behandling var det i gjennomsnitt 1,6 bevegelige lakselus per fisk, mens 12 dager etter behandling ble det observert et gjennomsnitt på 0,9 bevegelige lus per fisk. Fisken som døde i forbindelse med behandlingen hadde 0,0 bevegelige lus i gjennomsnitt. Anleggets offisielle lusetall kommer frem av **Figur 30**.

Beiteskader etter lakselus ble observert hos noen fisk før behandling, (**Figur 31**). Etter behandling ble det ikke påvist beiteskader eller sår i huden hos de 31 undersøkte individene.

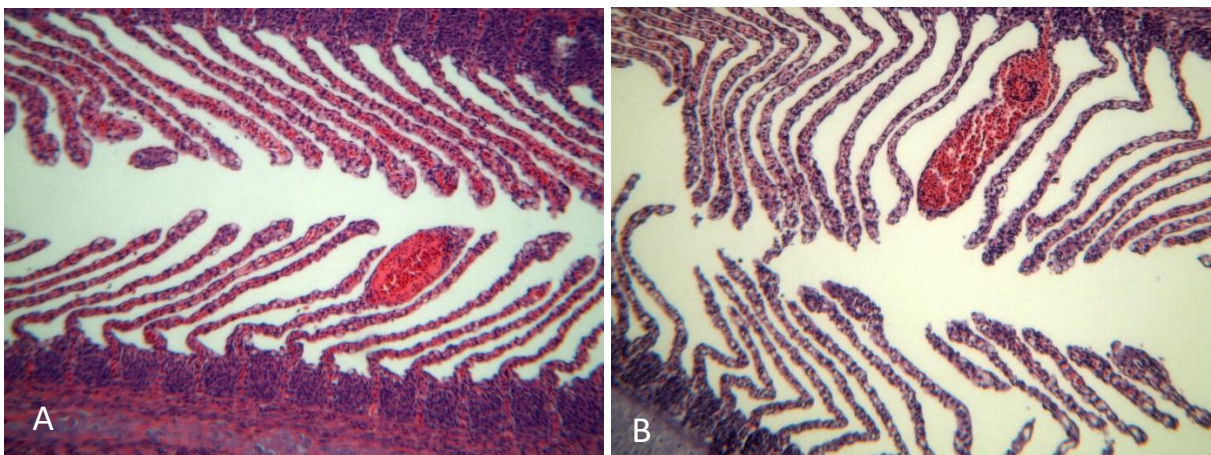


Figur 30. Offisielle lusetall på fisken i anlegget (Uttak før behandling, 24/8 -uke 34, rød pil. Uttak etter behandling, 8/09-uke 36, blå pil). Mekanisk fjerning av lakselus i anlegget (grønn pil).



Figur 31. Beiteskader etter lakselus ble observert hos noen fisk før behandling,

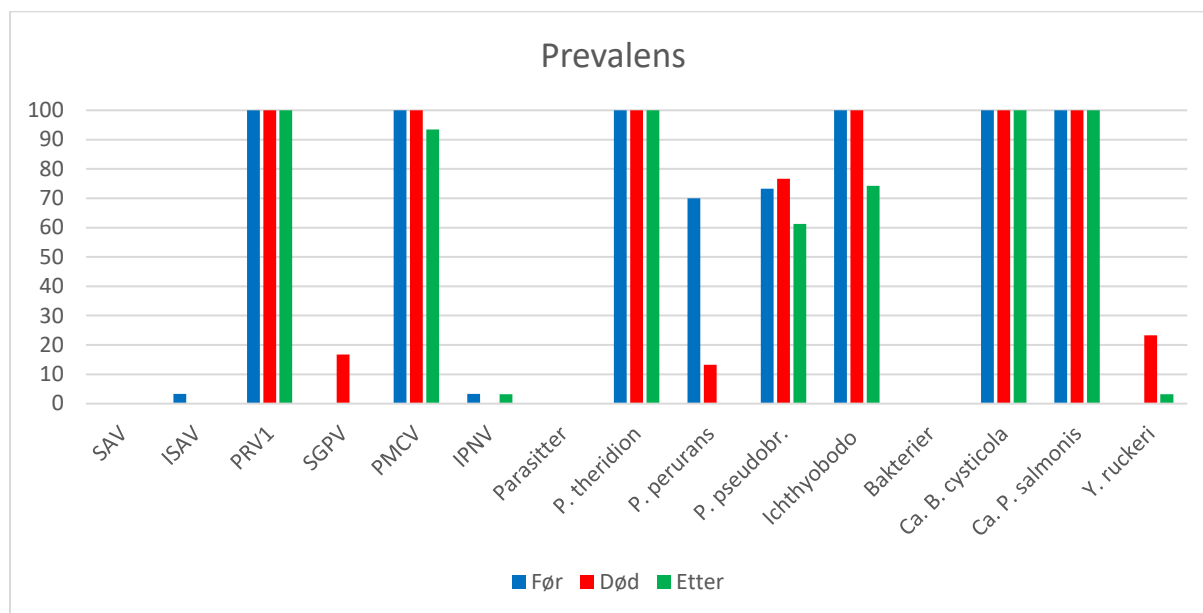
Det ble ikke observert alvorlige histologiske gjelleforandringer hos fisken før og etter behandlingen. Noen få individer hadde små aneurismer og «klubbing» på sekundærlamellene før behandling (**Figur 32**). Det ble ikke påvist økning i aneurismer etter behandling (**Figur 32**).



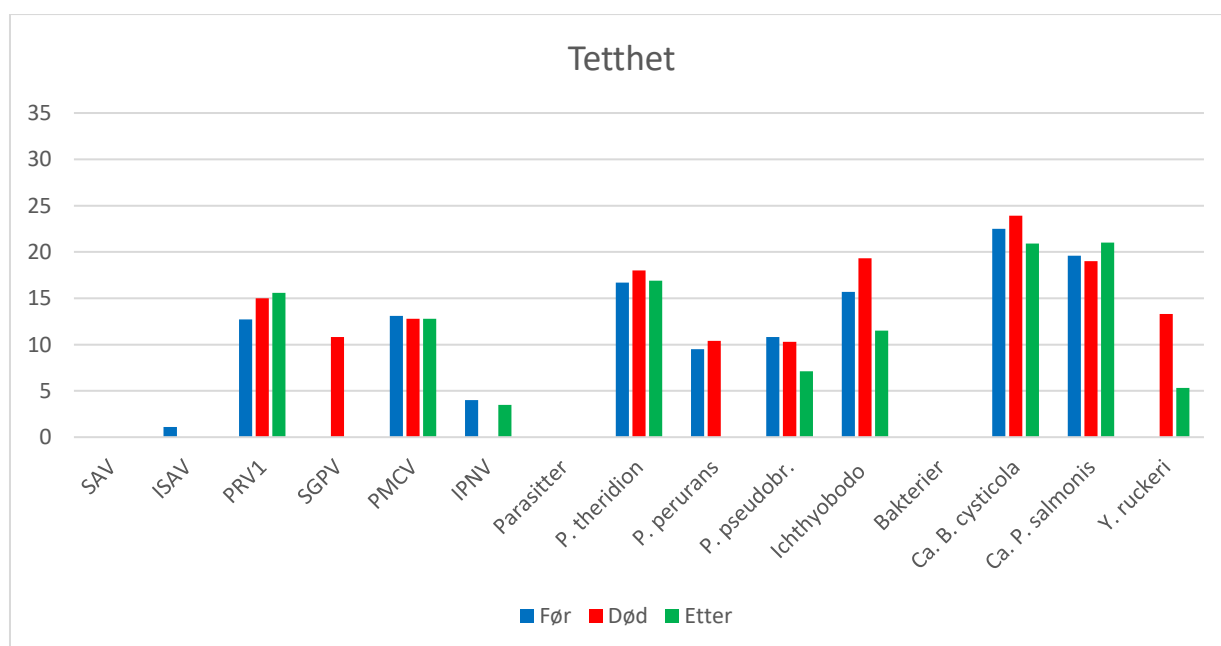
Figur 32. Aneurismer på gjelle hos laks før (A) og etter (B) behandling.

Prevalens for PRV1, *P. theridion*, *Cand. B. cysticola* og *Ca. P. salmonis* var 100 % i alle uttakene (**Figur 33**). Det ble observert en svak økning i tetthet av PRV1 og *Ca. P. salmonis* hos laks tatt ut etter behandling mens tettheten av *P. theridion* og *Ca. B. cysticola* var høyere hos fisken som døde enn hos de som ble tatt ut før og

etter behandling (**Figur 34**). Tettheten av *P. perurans*, *Ichthyobodo salmonis* og *Y. ruckeri* var også høyere hos fisken som døde enn hos de som ble tatt ut før og etter behandling. Her er det viktig å merke seg at prevalens av *P. perurans* var svært lav hos fisken som døde, og at prevalens av *Y. ruckeri* var lav i alle tre uttakene. SGPV ble kun påvist hos laksen som døde under behandlingen.

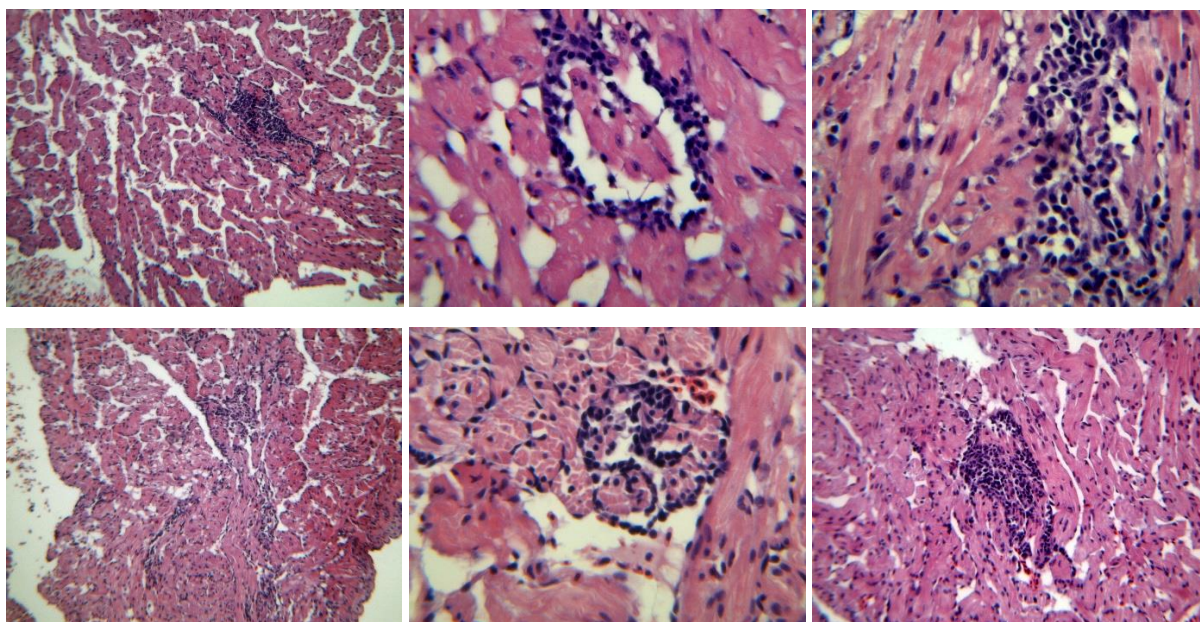


Figur 33. Prevalens av mikroparasitter hos laks før (N = 30) og etter (N = 31) behandling i anlegg LB, samt hos fisk som døde under/etter (N = 30) behandlingen.



Figur 34. Tetthet av mikroparasitter (målt som uttrykking av RNA) hos laks før og etter kbehandling i anlegg LB, samt hos fisk som døde under/etter behandlingen.

Behandlingen gjennomført i august/september 2022 (LB) hadde som mål å redusere forekomsten av lakselus. Kun få laks døde i forbindelse med behandlingen, noen av de døde laksene hadde bleke gjeller, men ingen av fiskene har sårskader som følge av behandlingen. Histologiske undersøkelser av hjerte (atrium og ventrikel) viste fokale områder med inflammasjon i myofibre i atriet hos de fleste fiskene (**Figur 35**). Selv om det ikke ble påvist hjertesprekk (CMS) hos noen av fiskene i dette studiet er det rimelig å forvente at denne sykdommen kan komme innen relativt kort tid etter siste uttak i september. Detaljer vil bli presentert i masteroppgaven til Anna N. Johansen (Juni 2023).



Figur 35. Nekrose og innvandring av betennelsesceller i myokardet i atrium hos seks laks.

Termisk avlusing av laks etter fire timers opphold i kjølt ferskvann

Behandlinger (ferskvann og termisk avlusing) har en signifikant reduserende effekt på prevalens og tetthet av både lakselus og *P. perurans*. Termisk behandling av laks i etter opphold i kjølt ferskvann, slik det ble gjennomført i dette studiet, gav ingen signifikant økning i dødelighet på lokalitetene. Det ble heller ikke observert noen negative endringer i gjellepatologi etter behandling.

Behandlingen med kjølt ferskvann fulgt av termisk avlusing synes å være en mer skånsom avlusingstrategi sammenlignet med kun bruk av Thermolicer.

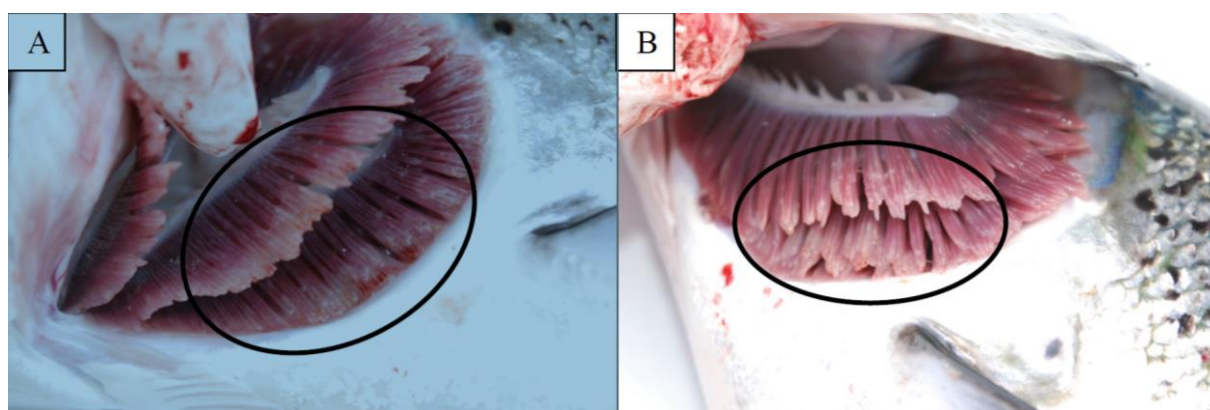
Det har vært hevdet at bruk av ferskvann kan øke sjansene for at lakselus skal kunne tilpasse seg ferskvann. I den sammenheng kan det være betimelig å påpeke at lakselus har tilpasset seg ørret og laks over tusenvis av år uten at lakselusen har tilpasset seg den anadrom tilværelsen til vertene. Lakselusen er en ren marin parasitt og en tilpassing til liv i ferskvann vil ikke bli et resultat av ferskvanneksponering i forbindelse med avlusing.

Ferskvannsbehandling mot AGD (APII). Påvirkning på gjellehelse (histopatologi - APIV) og forekomst av patogener (APVI).

To ferskvannsbehandlinger mot AGD (*P. perurans*) ble fulgt i dette prosjektet: LB (September 2020), AB (September 2021), samt en behandling med kjølt ferskvann (4 timer) og termisk avlusing (SB september 2021).

Laks (gjennomsnittlig: vekt = 2448 gram, lengde = 60 cm) på lokalitet LB (Rogaland) var diagnostisert med AGD og undersøkelser før behandling viste endringer i gjellene forenelig med AGD (**Figur 36**) og tilstedeværelse av store mengder *P. perurans* i tillegg til en betydelig tetthet av en rekke andre mikroparasitter; PRV1, PMCV, SGPV, *P. theridion*, *Ichthyobodo salmonis*, og *Cand. B. cysticola*. Det var 1,2 mobile lakselus per fisk i anlegget.

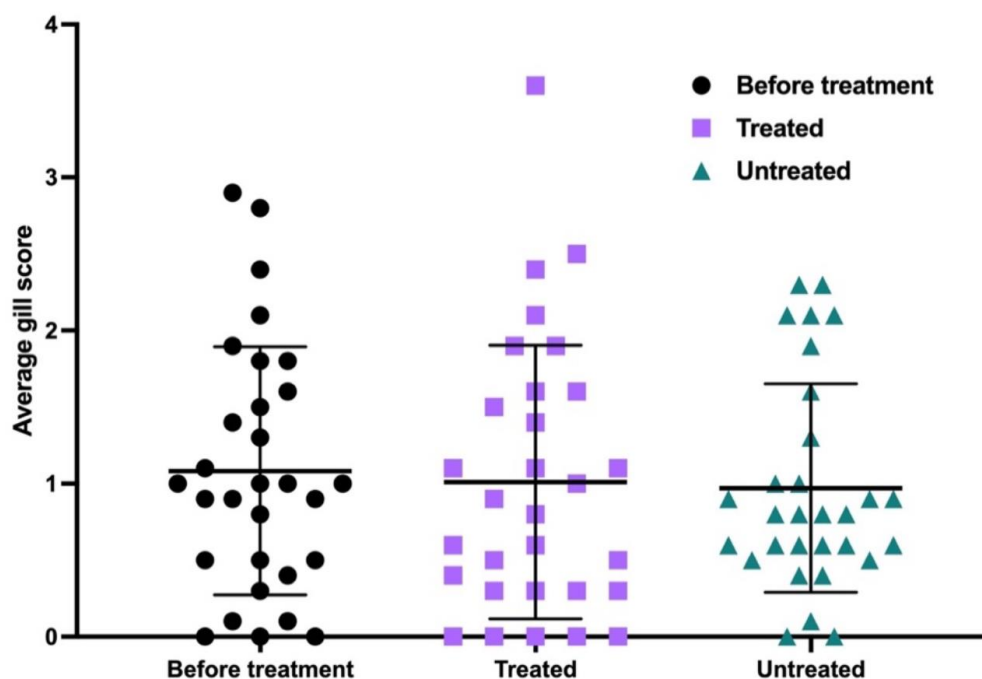
Anlegget hadde to polarringer med til sammen ca. 300 000 laks og en gjennomsnittlig dødelighet per dag mellom 100 og 300 individer de siste 14 dager før behandling. Fisken i en av merdene ble behandlet med ferskvann (10 timer) i september (sjø temperatur = 14,9 °C), og under behandlingen døde ca. 1500 individer (ca. 1,0 % av fisken i merden). Etter behandlingen ble dødeligheten redusert til 10 – 60 individer i behandlet merd mens dødeligheten i ubehandlet merd varierte mellom 150 – 200 individer/dag. Observerte endringer i gjennomsnittlig gjellscore (alle åtte flater på venstre side) 8 dager etter behandling var minimale: før behandling = $1,1 \pm 0,8$, behandlet = $1,0 \pm 0,9$, ubehandlet = $1,0 \pm 0,7$ (**Figur 37**). Det var også minimale endringer i histologisk gjellescore (**Figur 38**).



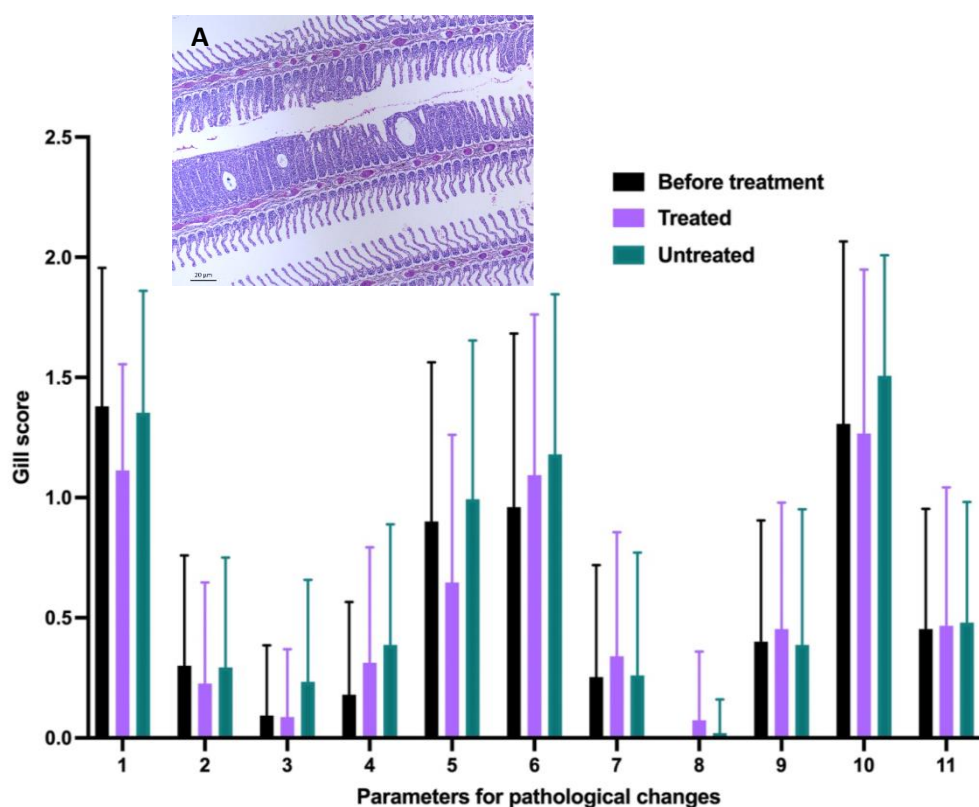
Figur 36. A) Gjeller før behandling og B) gjeller etter behandling.

Real time RT PCR analyser viste imidlertid en signifikant nedgang i tetthet av *P. perurans* hos død fisk og i behandlet gruppe. I tillegg ble prevalens av *P. perurans* redusert fra 100 % før behandling til 33,3

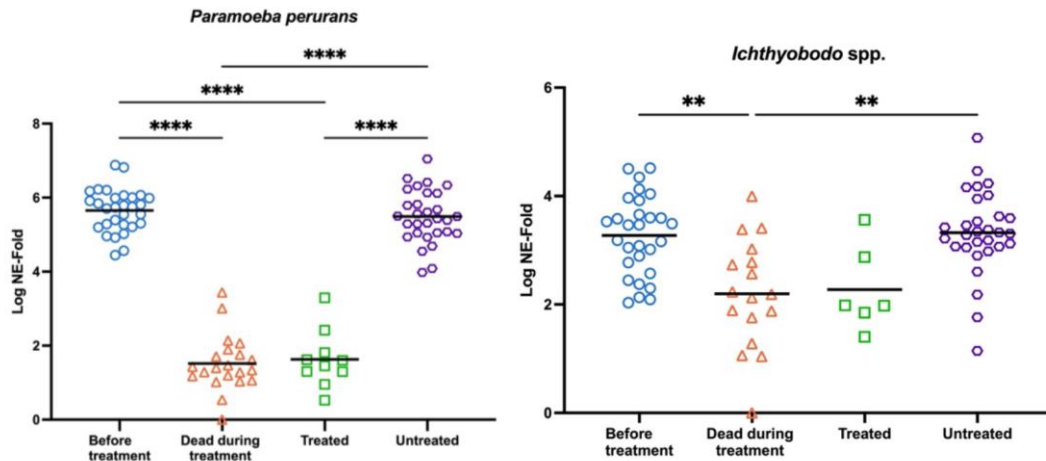
% i behandlet gruppe (**Figur 39**). Det ble også observert en signifikant reduksjon av *I. salmonis* i behandlet gruppe.



Figur 37. Gjennomsnittlig gjellescore for før behandling, og behandlet gruppe og ubehandlet gruppe 8 dager etter behandling (Data fra PL. Lyng 2021).

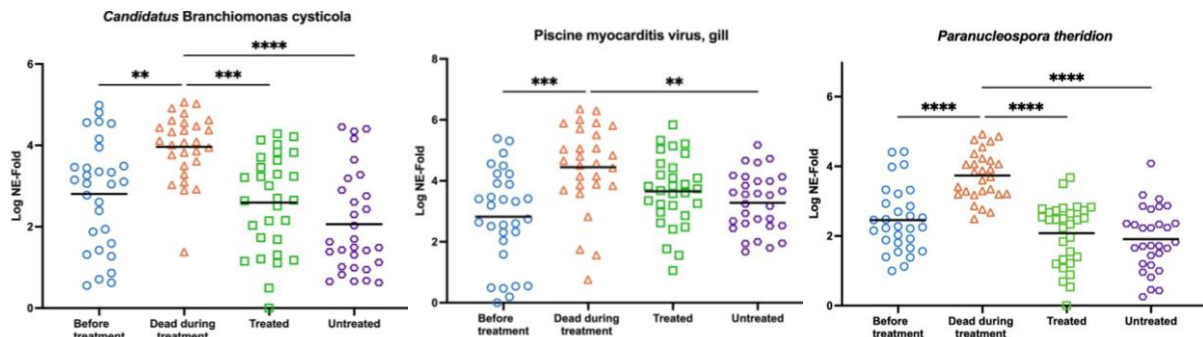


Figur 38. Gjennomsnittlig histologisk gjellescore i gruppene: Før behandling, behandlet, og ubehandlet. **A)** Histologisk snitt av gjellene hos laks før behandling (Data fra PL. Lyng 2021).



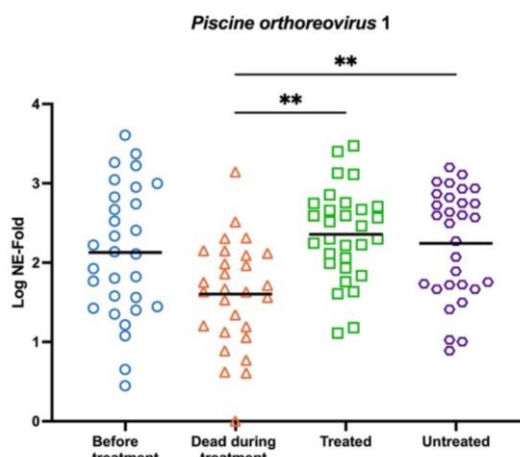
Figur 39. Tetthet av *P. perurans* og *I. salmonis* i gruppene: før behandling, døde under behandling, etter behandling, og ubehandlet (Data fra PL. Lyng 2021).

Fisken som døde under behandling hadde signifikant høyere tetthet av mikroparasittene; *Cand. B. cysticola*, PMCV og *P. theridion* (**Figur 40**). Dette er patogener som i andre studier har vært assosiert med dødelighet i lakseoppdrett og kan ha vært hovedårsakene til den observerte dødelighet på lokaliteten både før og etter behandling.



Figur 40. Tettheten av *Cand. B. cysticola*, PMCV, og *P. theridion* var signifikant høyere hos gruppen som døde enn hos individene tatt ut før behandling (Data fra PL. Lyng 2021).

Det ble observert en signifikant økning i PRV1 hos behandlet og ubehandlet laks etter behandlingen (**Figur 41**). Fisken som døde under behandling, hadde signifikant lavere tetthet av dette viruset enn det som ble observert etter behandling. Trenging av og pumping av laks i forbindelse med behandlinger vil medføre stress og kan være årsak til en økning i tetthet av PRV1. På tross av økningen i tetthet av PRV1 var gjennomsnittlig tetthet lavere enn det en har observert i forbindelse med hjerte skjellettmskel betennelse (HSMB) og dødelighet. Det vurderes derfor som lite sannsynlig at dette viruset har bidratt til dødelighet i anlegget i studieperioden.

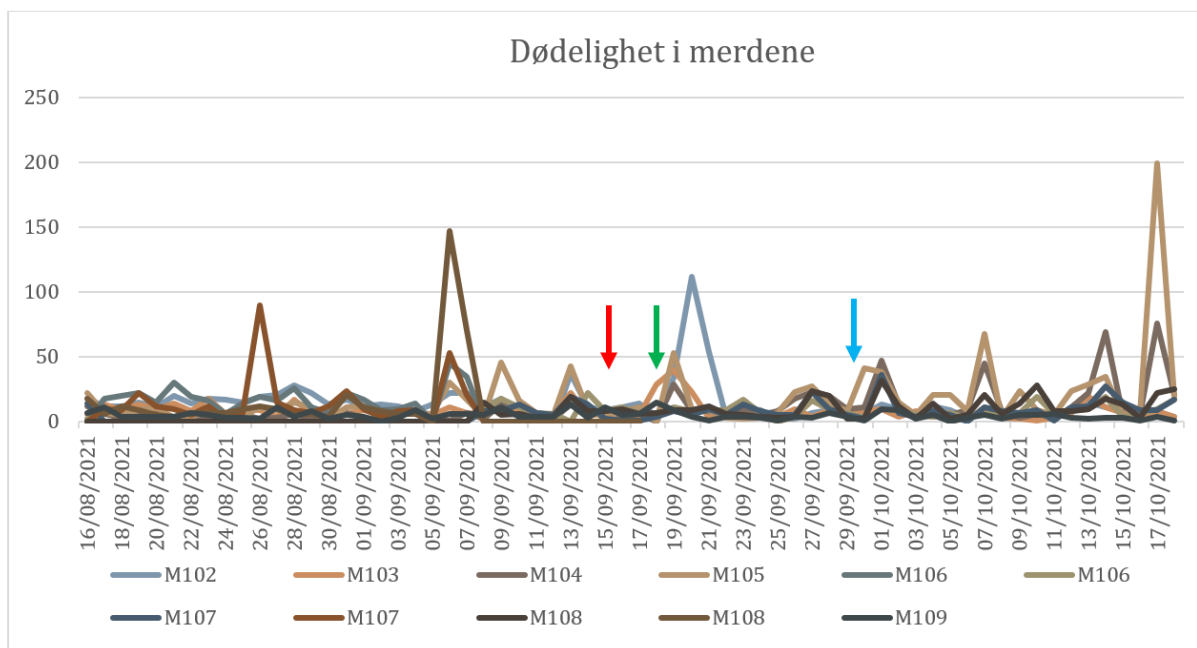


Figur 41. Tetthet av *PRV1* i gruppene: før behandling, døde under behandling, etter behandling og ubehandlet (Data fra PL. Lyng 2021).

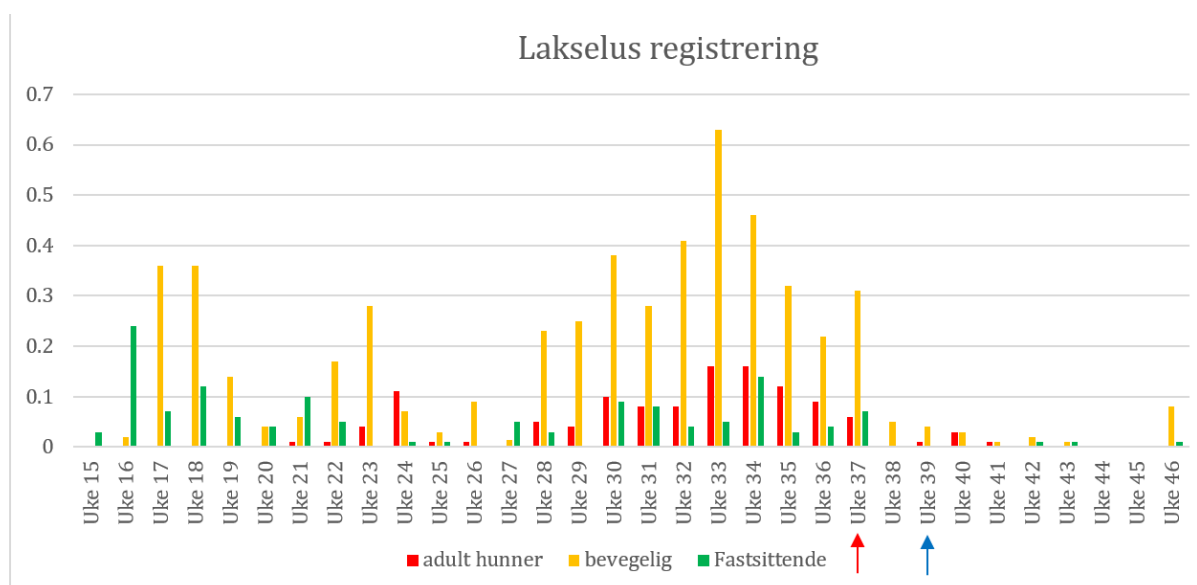
(Detaljer om forsøket finnes i mastergraden til Pernille Lyng (2021), Universitetet i Bergen: <https://hdl.handle.net/11250/2761223>).

I tillegg til termisk behandling av laks hold i kjølt ferskvann (4 timer), lakselus/AGD behandlingen presentert ovenfor (lokalitet SB), ble det gjennomført en behandling med ferskvann mot AGD gjennomført i september 2021 (lokalitet AB). Anlegget hadde diagnosen gjellesykdom med påvisning av *Paramoeba perurans*. Laks i anlegget ble behandlet i 4 timer med ferskvann (14,0 °C) 18 september 2021. Sjøtemperaturen ved behandling var 14,8 °C. Det ble tatt prøver av 30 fisk 3 dager før behandling (15.09.2021) og 30 fisk 11 dager etter behandling (29.09.2021). Prøvetakingen inkluderte registrering av bevegelige stadier av lakselus, gjellescore, vev for histologiske undersøkelser, og gjelle, nyre og hjerte-vev for real time RT PCR analyser. Gjennomsnittlig daglig dødelighet i de enkelte merdene de siste 14 dagene før behandling varierte mellom 4,3 og 15,4, mens den samlede dødeligheten under behandling og i de tre påfølgende dagene varierte fra 29 til 204 individer (**Figur 42**). Fisken i anlegget var sjøsatt mars 2021, og ved første uttak var gjennomsnittlig vekt = 1905 gram og lengde = 53 cm, mens fisken ved siste uttak var 2019 gram og 54,1 cm. Tre avlusninger ble gjennomført i anlegget (en kjemisk behandling via for, og to mekaniske behandlinger). Oppgitte antall adulte hunner, bevegelige stadier og fastsittende stadier kommer frem av **Figur 43**.

Det ble registrert enkelt fisk med beiteskader fra lakselus og alle hadde en relativt høy gjellescore i uttaket før behandling med ferskvann (**Figur 44**). Gjelle «score» for alle gjellebuene på venstre side (8 flater) ble registrert. Maksimal «score» (= 100 %) oppnås ved «score» 5 på alle gjelleflatene. 30 Laks tatt ut før behandling hadde en GS = 48,8 % av max GS, mens de 30 fiskene som ble tatt ut etter behandling hadde en GS = 7,1 % av max GS.

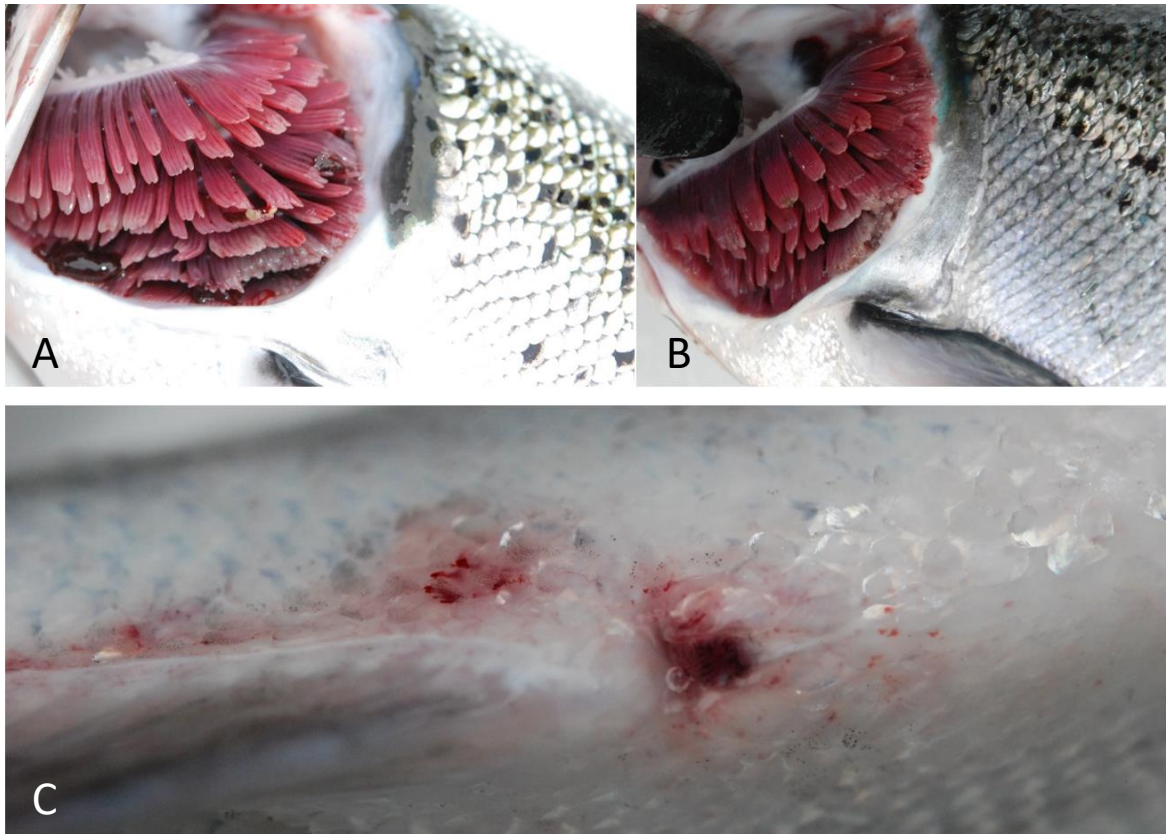


Figur 42. Dødelighet i merdene før, under og etter ferskvannsbehandling mot AGD. Rød pil = uttak av fisk før behandling, grønn pil = behandlingstidspunkt, og blå pil = uttak av fisk etter behandling. Dødelighet er oppgitt i antall individer/dag i de enkelte merdene.

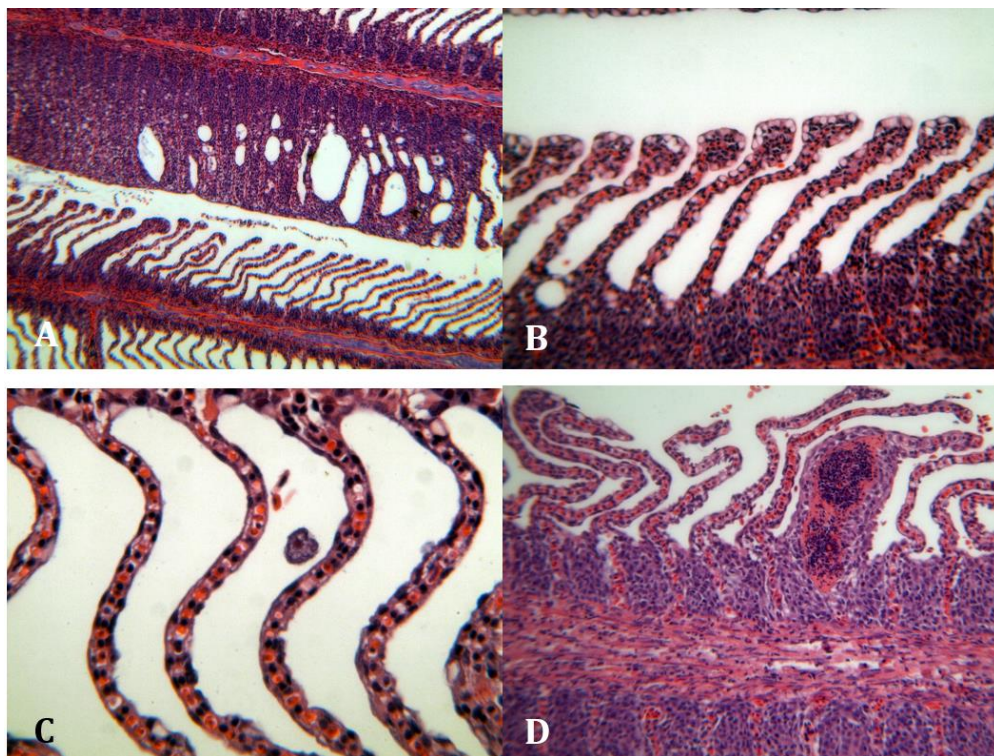


Figur 43. Oversikt over registrering av lakselus (gjennomsnitt/fisk) i anlegget. Rød pil = uttak av fisk før behandling, blå pil = uttak av fisk etter behandling

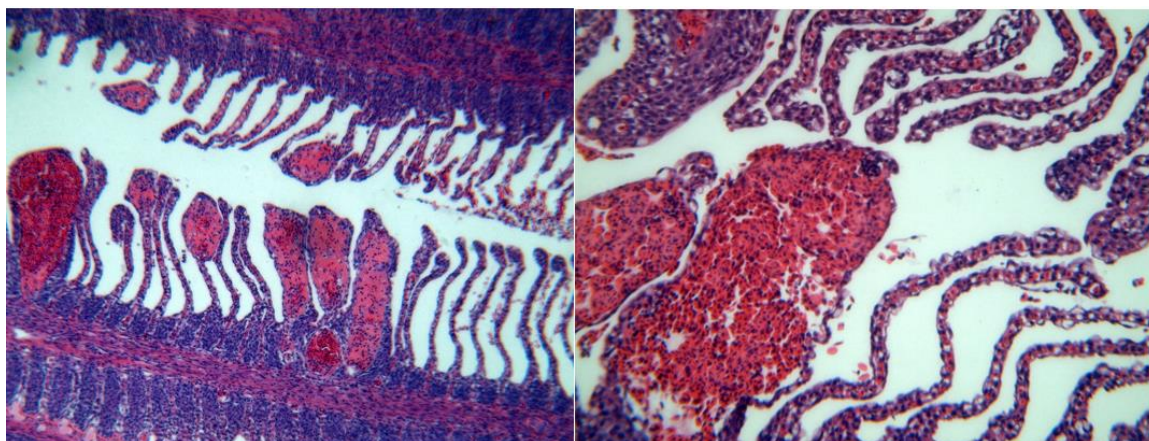
Histologiske analyser viste endringer forenelig med AGD hos fisken i anlegg AB tatt ut før behandling med ferskvann (**Figur 45**). I uttaket etter behandling (14 dager senere) er tegnene på AGD redusert, men det observeres en signifikant økning i blødende gjelle aneurismer (**Figur 46**).



Figur 44. A & B. Gjellepatologi hos laks tatt ut før behandling med ferskvann. C. Beiteskader etter lakselus.

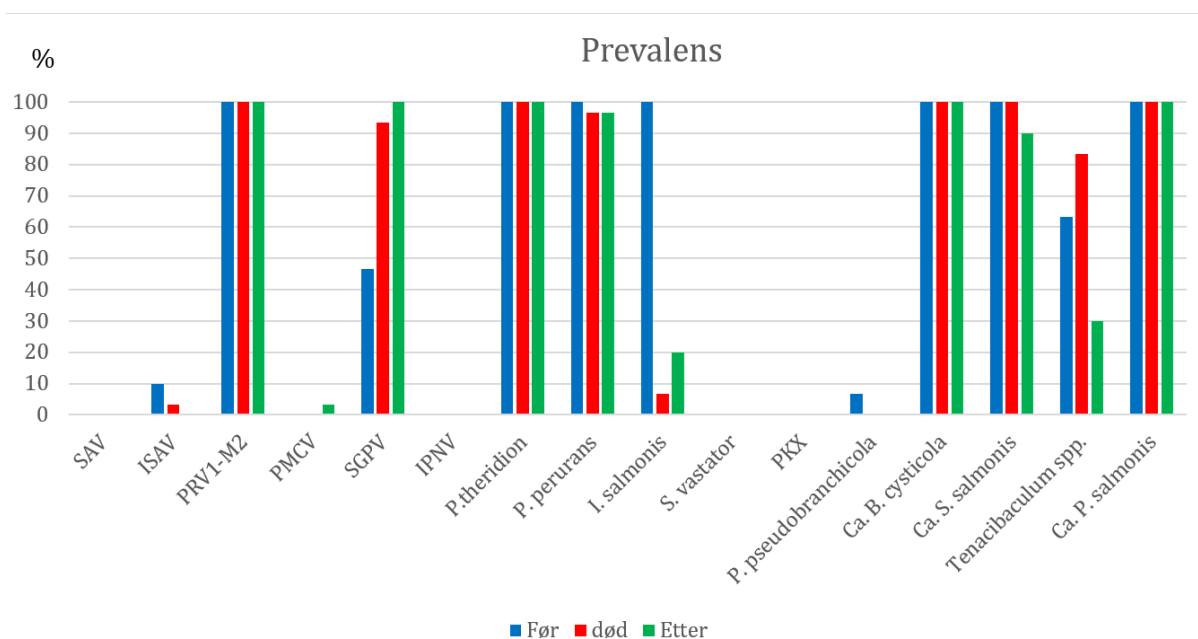


Figur 45. A. Gjellelev fra laks tatt ut før behandling med ferskvann (anlegg AB). A. Gjelleepitel hyperplasi. B. Høyt antall mukus-celler på sekundærlamellene. C. Amøbe. D. Anurisme.



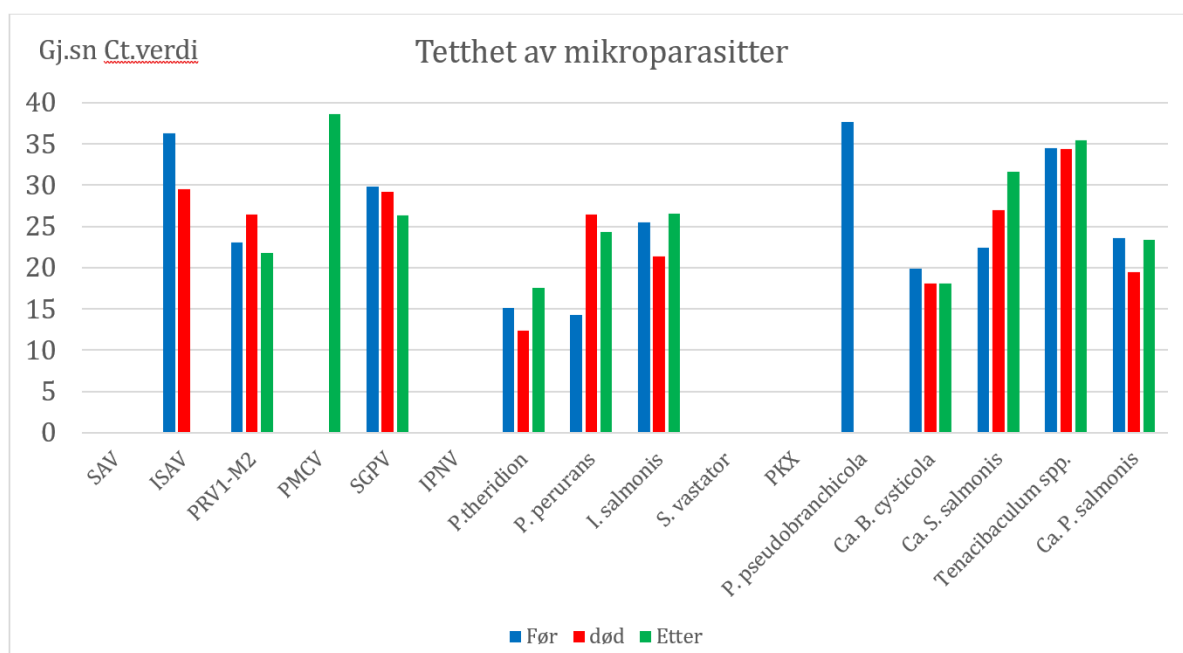
Figur 46. A & B. Blødende anurismer i høyt antall på gjeller hos laks tatt ut 14 dager etter behandling med ferskvann.

Real time RT PCR analyser av materiale fra anlegg AB ble gjennomført med henblikk på kartlegging av prevalens, tetthet og diversitet av mikroparasitter. Gjellene fra fisken ble undersøkt for et utvalg av mikroparasitter. Prevalens av PRV1, *P. theridion*, *P. perurans*, *Cand. S. salmonis*, og *Cand. B. cysticola* var tilnærmet 100 % i alle gruppene. Alle fiskene var negative for SAV, IPNV, *S. vastator*, og PKX, og kun noen få fisk var positive for ISAV (HPR0), PMCV, og *P. pseudobranchicola* (**Figur 47**). Prevalensen av *I. salmonis* og *Tenacibaculum* spp. ble redusert etter ferskvannsbehandlingen. Det ble også observert en svak reduksjon i prevalens av *P. perurans* og *Cand. S. salmonis*, mens prevalensen økte for SGPV.



Figur 47. Endringer i prevalens av mikroparasitter på gjellene hos laks (anlegg AB) før og etter behandling med ferskvann, samt hos laks som døde under behandling.

Det ble observert økt tetthet av virusene SGPV og PRV1 etter ferskvannsbehandling, mens behandlingen hadde en signifikant reduserende effekt på tettheten av *Paramoeba perurans* og *Cand. Syngnamydia salmonis* (**Figur 48**). Den intracellulære bakterien, *Cand. Syngnamydia salmonis*, kan formere seg i både gjelle-epitelceller og i *P. perurans* og reduksjon i tetthet kan derfor være et resultat av reduksjon i tettheten av *P. perurans*. Dette indikerer sannsynligvis at hovedmengden av denne bakterien er til stede hos *P. perurans* og ikke på gjellene hos laks.



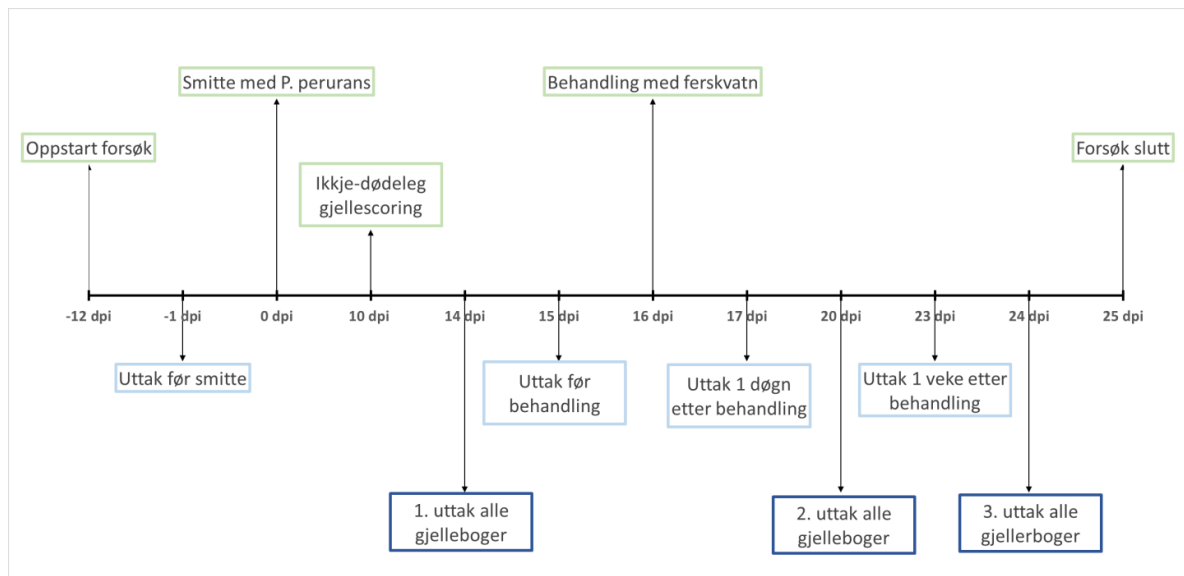
Figur 48. Tetthet (oppgitt som gjennomsnittlig Ct-verdi for positive individer) av utvalgte mikroparasitter på gjellene hos laks før (blå) og etter behandling (grønn), samt hos laks som døde (rød) under behandling.

Enkelte patogener (*P. theridion*, *I. salmonis*, og *Cand. P. salmonis*) var til stede i høyere tetthet hos laks som døde i forbindelse med ferskvannsbehandlingen (**Figur 48**), og det kan ikke utelukkes at disse kan bidratt til dødelighet både før og under behandlingen.

Ferskvannsbehandlingen hadde en positiv (reduserende tetthet) effekt på tettheten av *P. perurans*, og førte til en betydelig reduksjon i gjellescore (fra 48,8 % til 7,1 % av maksimal score). Den observerte dødeligheten i forbindelse med behandling var sannsynligvis et resultat av svekket gjellehelse knyttet til *P. perurans*, *P. theridion* og enkelte andre patogener. Detaljer kommer i mastergraden til O. Gjerde (november 2022).

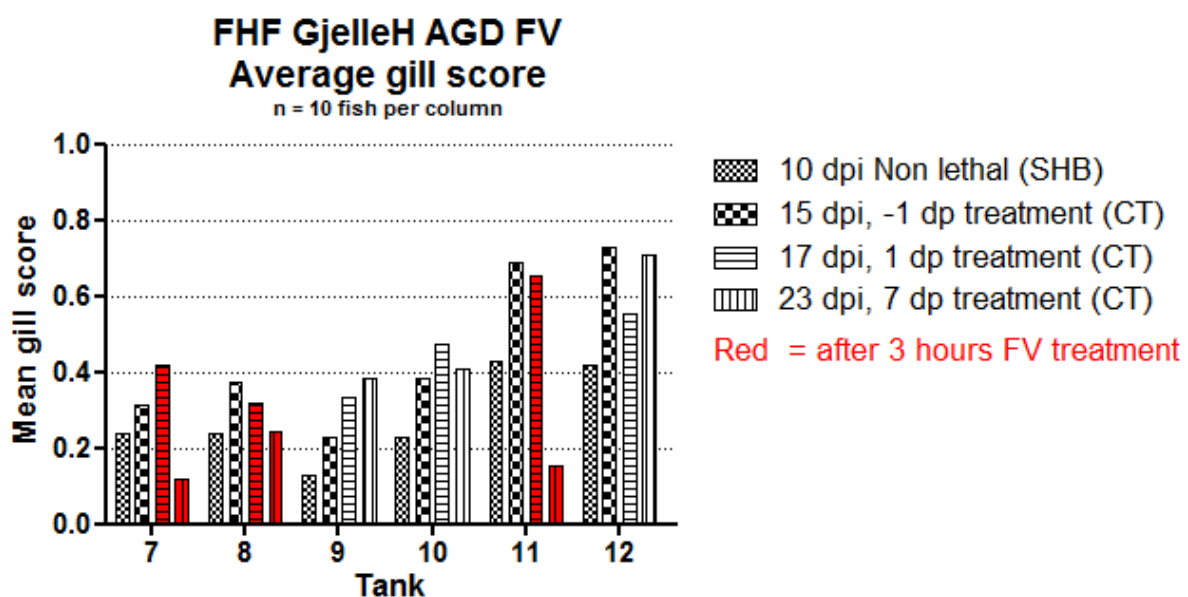
Eksperimentell ferskvannsbehandling mot P. perurans

Trehundrede og seksti fisk med en snittvekt på 180 gram ble fordelt på seks kar. Etter akklimatisering til 14 °C og fullt sjøvann (34 ‰) ble fisk i alle karene smittet med *Paramoeba perurans* (1000 amøber / liter i en time) etter et uttak av 10 fisk fra hvert kar (**Figur 49**). Etter 10 dager ble sykdomsutviklingen vurdert med ikke-dødelig gjellescore (**Figur 50**).



Figur 49. Tidslinje for forsøket fra oppstart (12 dager før smitte) til forsøket ble avsluttet 25 dager etter smitte. Dpi = «days post infection».

Det ble foretatt et nytt prøveuttak av 10 fisk fra hvert kar før fiskene i kar 7, kar 8 og kar 11 dagen etter (ved 16 dager etter smitte) ble behandlet 3 timer med ferskvann. Prøver av et tilsvarende antall fisk ble tatt ut 1 og 7 dager etter behandling. Følgende prøver ble tatt ut: vekt, lengde, gjellescore, blodplasma, nesehule og mukus (histologi), hud, gjeller (real time PCR, histologi og mikrobiota), samt vannprøver. Det ble forsøkt reisolert amøber fra fem fisk per tidspunkt på MYA og inkubering på 15 °C.



Figur 50. Gjellescore i uttakene etter smitte og behandling (data fra Wiik 2020).

Det var relativt store forskjeller mellom utviklingen av gjellescore i de ulike karene (**Figur 50**). Kar 7 – 10 lå ganske jevnt, men lavt (0,2 til 0,4 gjennomsnittlig gjellescore over 23 dager), mens K11 og K12 lå på 0,4 til 0,7 i gjennomsnittlig gjellescore i samme tidsrom. Kar 7, 8 og 11 ble behandlet med ferskvann i 3 timer, og det var en tydelig reduksjon i gjellescore hos fiskegruppen i K7 og K11, men mindre i K8. Dette er nok trolig kun fordi scoren var så lav fra før at utslaget etter behandling ikke vises.

Som en del av en masteroppgave (Wiik 2020) ble alle 8 gjellebuene fra fisken undersøkt for tilstedeværelse av *P. perurans* med real-time PCR. Forsøket viste at det ikke var tydelige forskjeller mellom gjellebuene ved høy prevalens og at alle gjellebuene da er egnet for uttak til real-time PCR for påvisning av amøben. Ved lav prevalens, derimot kunne en se at *P. perurans* RNA nivået varierte ved undersøkelser av de ulike gjellebuene, og det anbefales derfor å ta ut prøver fra flere gjellebuer fra samme fisk for påvisning eller fra mange fisk for å få et best mulig bilde av behandlingseffekten. Ved uttaket 23 dager etter smitte var det ingen *P. perurans* positive fisk i de behandlede gruppene (Kar 7, 8 og 11). Det ble ikke registrert dødelighet i noen av karene i løpet av smitteforsøket. (Detaljer om forsøket finnes i mastergraden til Søgne Wiik (2020), Universitetet i Bergen: <https://hdl.handle.net/1956/22929>).

Konklusjon Ferskvannsbehandling mot AGD

Ferskvannsbehandling for å fjerne *P. perurans* fra gjellene hos laks med AGD har en klar effekt målt med både gjellescore, real time RT PCR, og histopatologiske undersøkelser. Reduserte mengde *P. perurans* kan først observeres ved hjelp av real time RT PCR mens endringer i gjellescore og histopatologi kommer på et senere tidspunkt etter behandling (vanligvis mer enn 7 dager etter behandling). Ferskvannsbehandling av frisk laks gir ikke dødelighet, men hos laks med andre sykdommer og generelt dårlig gjellehelse kan behandlingen medføre dødelighet. I dette studiet var det særlig patogener som *P. theridion*, *Cand. B. cysticola* og Piscine myocarditis virus som var assosiert med dødelighet under behandling i felt. Det kan ikke utelukkes at også andre agens kan svekke laksen slik at den ikke tåler stresset som er knyttet til behandling i felt. En kartlegging av laksens helse (sykdomsstatus) før behandling bør gjennomføres i alle tilfeller hvor en er usikker på situasjonen på lokaliteten.

Spyling av nøter (APIII). Påvirkning på gjellehelse (histopatologi - APIV) og forekomst av patogener (APVI)

Fem gjennomføringer av spyling av nøter ble fulgt i dette prosjektet: BL (Mai 2019), BS (August 2019), TB (September 2019), FB (Oktober 2019), FK (August 2020). Uttak av fisk fra BL etter spyling av nøter var ikke mulig på grunn av høy dødelighet assosiert med PMCV, *Pasteurella* sp., *Tenacibaculum* sp., *Cand. B. cysticola*, *Ichthyobodo salmonis*, *P. perurans* og *P. theridion*, i tillegg til en ekstrem oppblomstring av *Emiliana huxleyi*. Materialet fra BL blir derfor ikke inkludert i rapporten.

Begroing av nøter kan gi redusert vanngjennomstrømning og dårlig vannutskiftning i merdene på marine oppdrettsanlegg, noe som i tur kan påvirke fiskens vekst og velferd. Vanlig tiltak for å hindre gjengroing på nøtene i et anlegg under produksjon er spyling. Det er ikke uvanlig at anlegg spylar nøtene ukentlig i vekstsesong (sommer, høst). Rutinemessig spyling av nøter på fiskeanlegg fjerner eller knuser groeorganismer som da frigjøres ut i vannmassene ved lokaliteten og kan gi økt risiko for frigjøring og spredning av smittestoff i merdene og til det omkringliggende miljø.

Formålet med dette studiet var å undersøke om vanlige rutiner for *in situ* notspyling på marine fiskeanlegg kan påvirke fiskens gjellehelse. Målsetninger:

- Identifisere smittestoff i groe på notveggen på matfiskanlegg
- Identifisere smittestoff i avspylte groefragmenter under notspyling
- Undersøke smitte og gjellepatologi til laks før og etter notspyling

Undersøkelsene gjennomført på tre matfisk lokaliteter i Vestland fylke (BS, TB, FB). i perioden 27. august – 30. oktober 2019. Produksjonsdata og spylemetoder for de ulike lokalitetene er vist i **Tabell 1** (Data fra disse tre lokalitetene er presentert i mer detalj i masteroppgaven til Napsøy 2020.)

Tabell 1. Produksjonsdata og spylemetoder. Biomasse for hele anlegget på undersøkelses tidspunktet er gitt med gjennomsnitt fiskevekt i parentes. Effektiv spilletid er per merd.

Lokalitet	Art	MTB	Biomasse	Spylemetode	Effektiv spyletid
BS	Laks	3120 tonn	1949 tonn (2,7 kg)	Stealth Cleaner (175 bar)	2-3 timer
TB	Laks	2340 tonn	1130 tonn (1,8 kg)	Yanmar Østerbø (60 bar)	4-5 timer
FB	Regnbueørret	3120 tonn	278 tonn (0,8 kg)	Stealth Cleaner (60-120 bar)	3 timer

Tabell 2. Oversikt over tidspunkt for innsamling av prøver på ulike behandlingstidspunkt. Behandling er spyling av not på undersøkt merd. Det ble tatt gjelleprøver av fisk før og etter notspyling (N=30 fisk per uttak). Prøveinnsamling og målinger av groe og vannkvalitet ble gjennomført samme dag som spyling. Groeorganismer, hydrografi og håvtrekk ble gjennomført. Groeorganismer var håndplukket fra den øvre del av notveggen. Hydrografiske målinger inkluderer profilmålinger av oksygen, salinitet, temperatur og turbiditet fra 0 til 30 meters dyp. Vertikale håvtrekk ble gjennomført fra 10 meters dyp.

Lokalitet	Behandling	Dato	Prøveinnsamling og målinger			
			Fisk	Groeorganismer	Hydrografi	Håvtrekk
BS	Før	27.08.19	X	X	X	X
	Under	29.09.19			X	X
	Etter	04.09.19	X			
TB	Før	19.09.19	X	X	X	X
	Under	19.09.19			X	X
	Etter	26.09.19	X			
FB	Før	22.0.19	X		X	X**
	Under	22.10.19	X*		X	X**
	Etter	30.10.19	X			

* Tatt ut 8 fisker fra den spylte merden **Både håvtrekk fra 0 til 10 meters dyp og 0 til 5 meters dyp.

Den gjennomførte prøvetakingsplanen er vist i **Tabell 2**. Det ble tatt gjelleprøver av fisk før spyling (n=30) og noen dager etter spyling var gjennomført (n=30). Prøveinnsamling av begroingsorganismer, håvtrekkprøver, og hydrografimålinger ble gjennomført samme dag som spyling. Prøveinnsamling og målinger ble utført like før spyling startet, under spylingen, og 40-60 minutter etter at spyling ble avsluttet. Det ble ikke gjennomført prøveinnsamling og målinger på lokalitet BS før spyling, da arbeidet med notspyling allerede var startet da prøvetakingspersonalet ankom lokaliteten.

Håndplukket groe fra øvre del av merden på lokalitet BS og TB ble samlet inn for videre analyser og identifisering på laboratorium. Det ble ikke samlet inn prøver fra lokalitet FB. Denne lokaliteten hadde generelt lite begroing sammenlignet med lokalitet BS og TB. I tillegg ble det brukt et luseskjørt på lokalitet FB som gjorde det vanskelig å få tak i groeprøver til dette formålet. Innsamlet groeprøver ble videre undersøkt på laboratoriet til NORCE.

Håvtrekkprøvene ble tatt nedstrøms for merden som ble spylt. Det ble benyttet en planktonhåv med maskevidde på 180 µm. Håven hadde en krage med diameter 27 cm. Det totale vannvolumet gjennom håven i hvert vertikale håvtrekk utgjorde 572 liter. Prøver (vann, plankton og partikler) fra håvtrekket ble samlet i en 50ml glassbeholder i enden av håven. Det ble gjennomført fem håvtrekk i hvert prøveuttak. Dette utgjorde et totalvolum på 250 ml som ble samlet på glassflaske. Alle håvtrekkprøvene ble oppbevart mørkt og kjølig for videre analyser på laboratoriet til NORCE.

Partikkelvolum fra de ulike håvtrekkene ble målt med bruk av målesylinder etter en viss tids sedimentering. Partikkel volum ble også sammenlignet med turbiditetsmålingene.

Vannkvalitet ble målt med bruk av CTD/STD sonde (SD208, SAIV AS) påmontert oksygen og turbiditet sensorer. Det ble gjennomført profilmålinger fra 0 til 30 meters dyp på samme sted og tidspunkt som håvtrekkprøvene ble tatt (før, under og etter spyling).

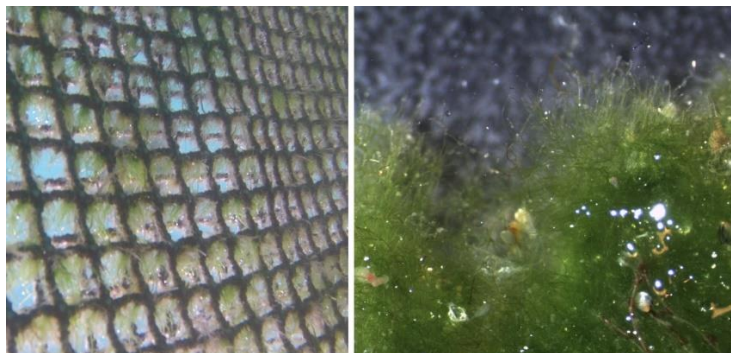
Groeprøvene og partikler fra håvtrekkene ble identifisert med bruk av lupe (Leica M80) påmontert kamera (Leica EC3, programvare Leica LAS EZ) tilkoblet PC for dokumentasjon av ulike groetyper og partikler. Mengden partikler fra håvtrekkprøvene ble målt ved sedimentering i målesylinder (250 ml) for å beskrive endringer i partikkelkonsentrasjon før, under og etter spyling.

Prøver fra ulike groetyper og partikler fra håvtrekk ble alikvotert og overført til cryorør med 1 ml etanol for videre analyser for påvisning av fiskepatogener med bruk av molekylærbiologiske metoder (APVI). Analyseprøvene fra groeorganismer, partikler fra vann og gjelleprøver ble analysert på samme måte med bruk av real-time RT PCR (qPCR). Prøvene ble testet for de vanligste smittestoffene hos laksefisk i oppdrett på Vestlandet, med særlig fokus på patogener assosiert med gjellesykdom. Dette inkluderer virus, bakterier og parasitter.

Begroingsorganismer

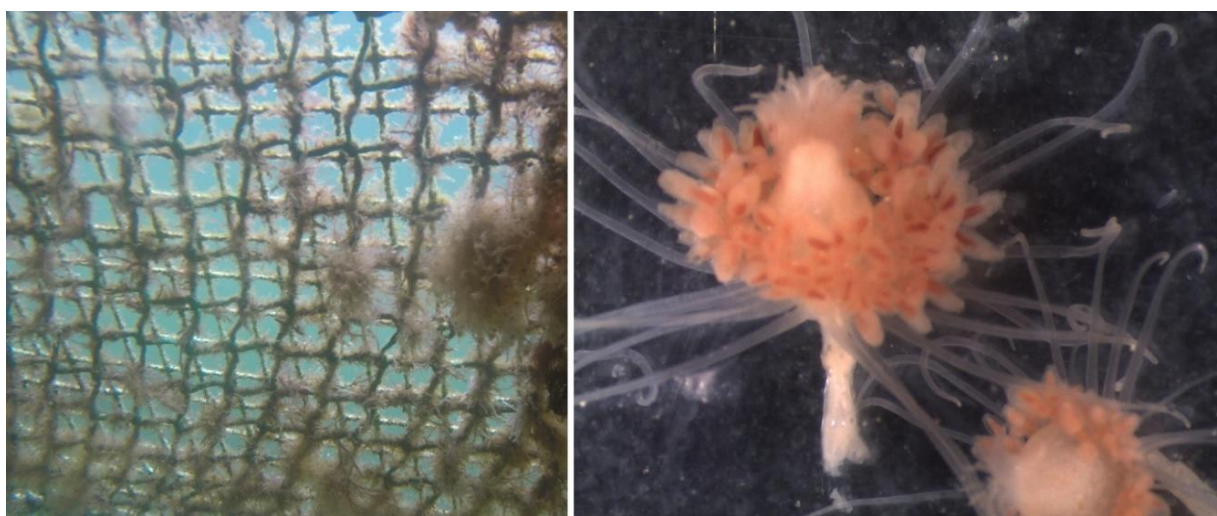
Vanlige og mest dominerende begroingsorganismer observert fra den øvre del av til lokalitet BS og TB var alger (slie), fjærebloomst (hydroider), spøkelseskreps (Caprellider) og mosdyr (Bryozoa). Det ble også funnet små blåskjell, men kun i mindre mengder. Begroingsorganismer fra lokalitet FB ble ikke samlet inn på grunn av lite begroing og bruk av luseskjørt på denne lokaliteten.

Slie var særlig utbredt øverst på notveggen, og de vanligste artene ble identifisert som *Ceramium* spp. (rødalge) og *Ulva* spp. (grønnalge). Disse algetypene er buskaktige og trådformet, og kan være tettvokst på notveggen (**Figur 51**). Slie har god og konstant tilgang på løste næringssalter fra marine oppdrettsanlegg, og det er kjent at slie har rask gjengroing etter notspyling i sommerhalvåret.



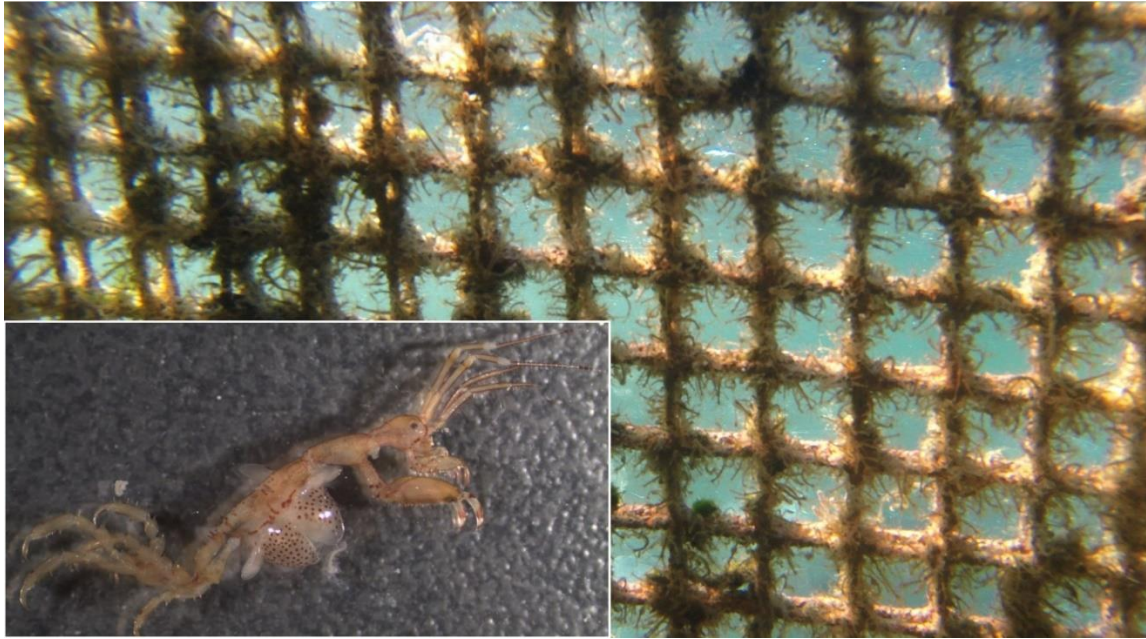
Figur 51. Tettvokst slie på notvegg fra undersøkt lokalitet. Bildet til høyre er tatt med lupe. Det vanlig å finne ulike typer evertebrater i slik slie. Dette kan være små krepsdyr, muslinger og snegler.

Kolonier med fjæreblomst identifisert som *Ectopleura larynx* ble observert på notveggen til begge lokalitetene (BS og TB). Dette er en vanlig art i norske farvann. Kolonier med *E. larynx* kunne også observeres ned mot mer enn 25 meters dyp på notveggen. Dette ble observert med kamera benyttet av operatører av notspylere på de ulike lokalitetene, inklusiv lokalitet C. Fjæreblomst var derfor den mest dominante og utbredte groeorganismen på notveggen til de undersøkte lokalitetene. Fjæreblomst er en hydroide som tilhører gruppen nesledyr (Cnidaria). Slike hydroider er predatorer og fanger byttedyr (zoplankton) med tentakler som lammes med nervergift fra nesleceller (nematocyster). Hydroider gir rask gjengroing av nøter på marine oppdrettsanlegg (**Figur 52**).



Figur 52. Buskaktige kolonier med fjæreblomst (*Ectopleura larynx*) på notveggen til undersøkt lokalitet. Bildet til høyre er tatt med lupe og viser enkelt individ med tentakler og nematocyster.

Spøkelseskreps er samlebetegnelse for ulike krepsdyr arter innen Caprellidae (**Figur 53**). Ulike arter av spøkelseskreps ble observert, men den mest vanlige er identifisert som *Caprella mutica*. Dette er en innført art som har spredt seg langs norskekysten, og er svært vanlig på marine oppdrettsanlegg hvor de kan forekomme fra overflaten og ned mot bunn av merden. Spøkelseskreps på marine oppdrettsanlegg beiter på organiske partikler, små krepsdyr og andre evertebrater. Det ble registrert størst tetthet av spøkelseskreps på lokalitet BS.



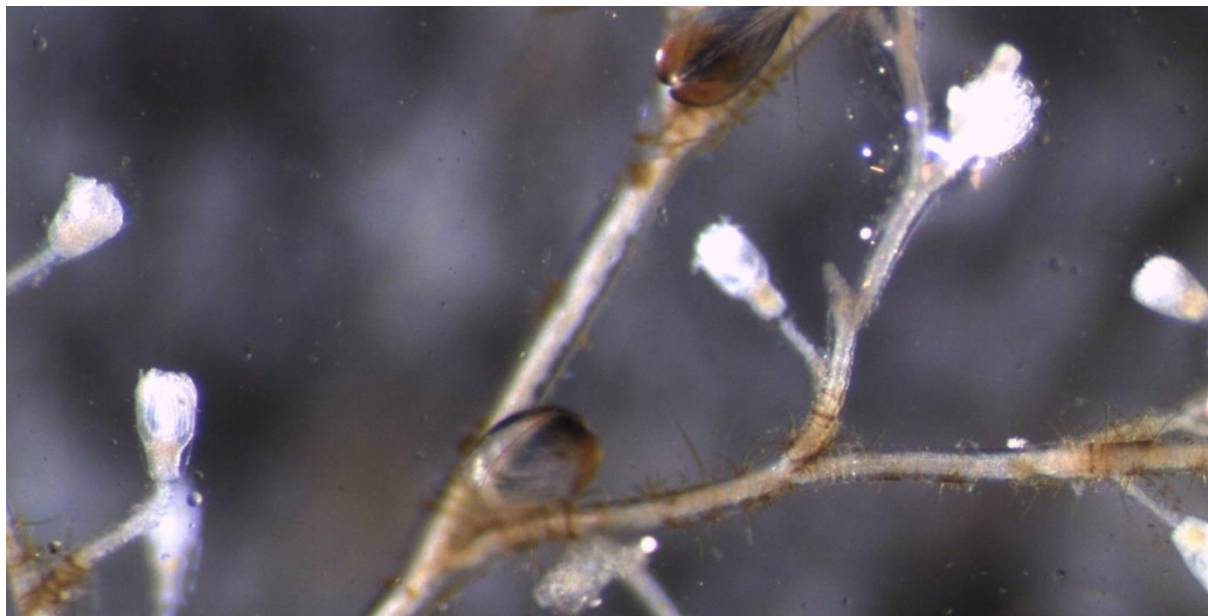
Figur 53. Store mengder spøkelseskreps på notveggen til undersøkt lokalitet.

Mosdyr ble observert i spredte forekomster på notveggen, oftest på og sammen med rødalger. Størst tetthet av mosdyr ble registrert på lokalitet TB. Den mest utbredt arten er identifisert som *Electra pilosa*. Dette er en vanlig og utbredt art langs norskekysten. Mosdyr filtrerer partikler og næringsstoffer fra vann. Eksempler fra mosdyr observert på de undersøkte lokalitetene er vist i **Figur 54**.



Figur 54. Mosdyr som buskdannede koloni på flytering (bildet til venstre). Bildene til høyre er mosdyr (*Electra pilosa*) fotografert med lupe.

Blåskjell (*Mytilus edulis*) ble først og fremst funnet på flyteringene, men også spredte forekomster av små individer ble observert på notveggen til de undersøkte lokalitetene (**Figur 55**). Blåskjell beiter på plankton og fine partikler som filtreres fra vannet.



Figur 55. Blåskjell er den vanligste type musling på marine oppdrettsanlegg i Norge. Bildet viser små blåskjell som er festet til en hydroide.

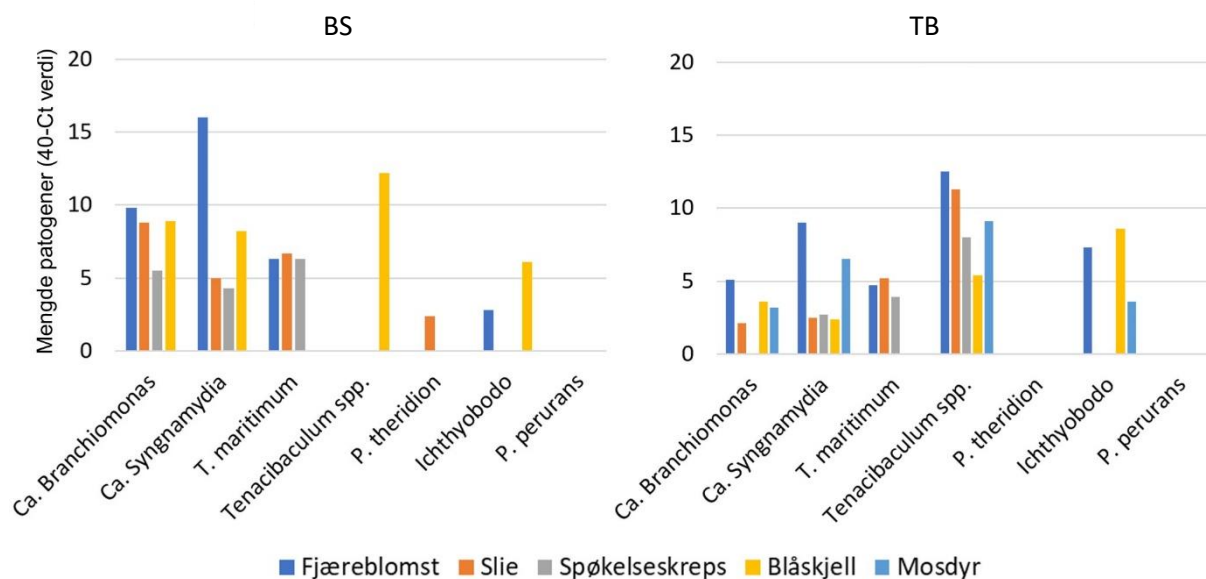
Fiskepatogener påvist i begroingsorganismer

Ulike typer begroingsorganismer samlet fra øvre del av notveggen på lokalitet BS og TB ble kategorisert som slie, hydroider (fjæreblomst), spøkelseskreps, mosdyr og blåskjell. Disse ble testet for virus, bakterier og parasitter.

Bakteriene *Ca. Branchiomonas cysticola* og *Ca. Syngnamydia salmonis* ble påvist i alle groetypene, men med størst mengde i hydroider. Disse bakteriene ble påvist i groe fra begge lokalitetene, men særlig i prøver fra lokalitet BS. Bakteriene *Tenacibaculum* spp. (andre enn *T. maritimum*) ble også påvist i alle groetypene fra lokalitet TB, men kun i blåskjellprøver fra lokalitet BS. Bakterien *Tenacibaculum maritimum* ble også påvist på begge lokaliteter, men kun i hydroider, slie og spøkelseskreps.

Parasitter tilhørende slekten *Ichthyobodo* ble påvist i hydroider og blåskjell på begge lokaliteter. I tillegg ble parasitten påvist i mosdyr fra lokalitet TB. Lave nivåer med *Paranucleospora theridion* ble detektert i slie prøver fra lokalitet BS, men ikke i noen av groep prøvene fra lokalitet TB. Alle

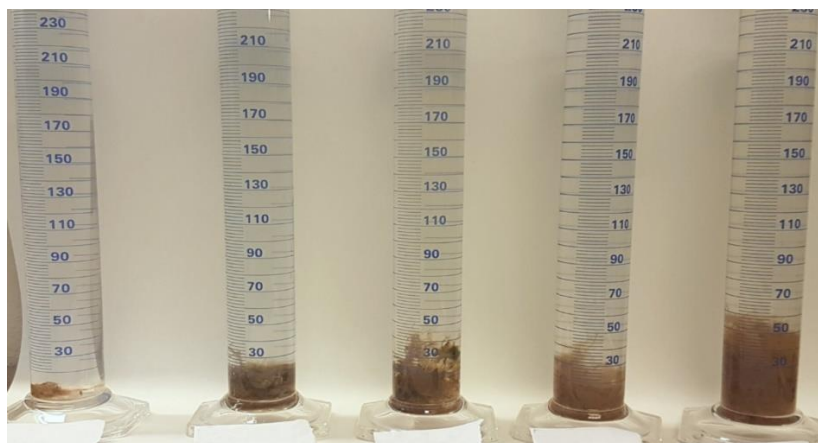
groeprøvene fra begge lokalitetene testet negativ for gjelleamøben *Paramoeba perurans*. Det ble heller ikke påvist noen virus i groeprøvene (**Figur 56**).



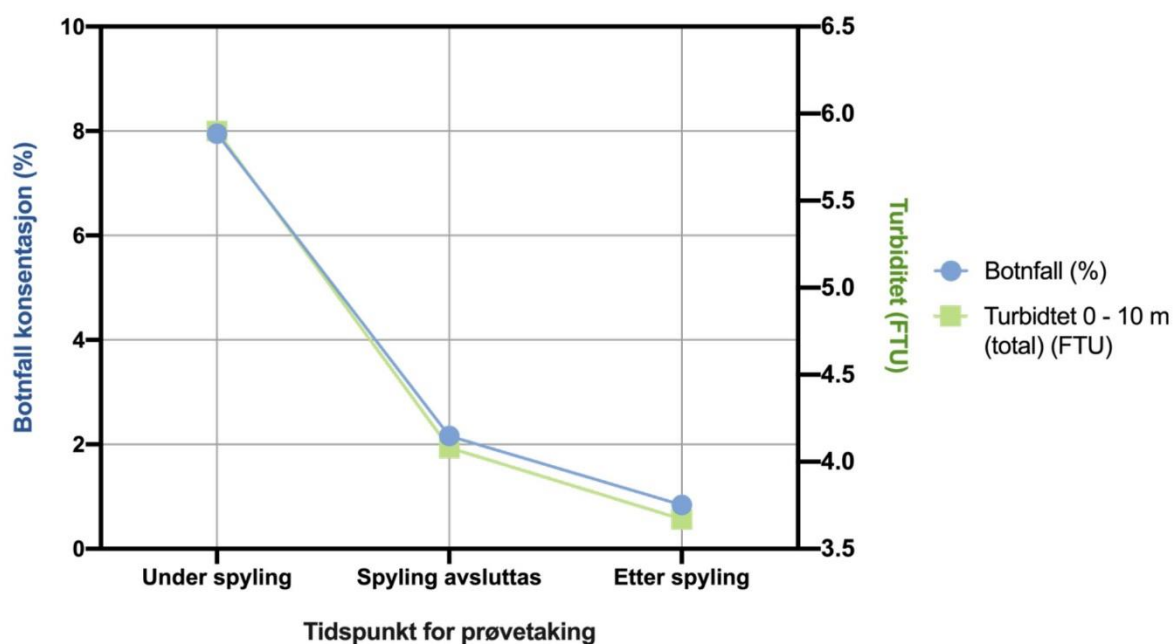
Figur 56. Semi-kvantifisering av mengde patogener i ulike groetyper basert på RNA analyser med bruk av real time RT PCR. Mengde RNA er oppgitt som 40 – Ct verdi.

Effekt av notspyling på vannkvalitet - Partikkeltetthet

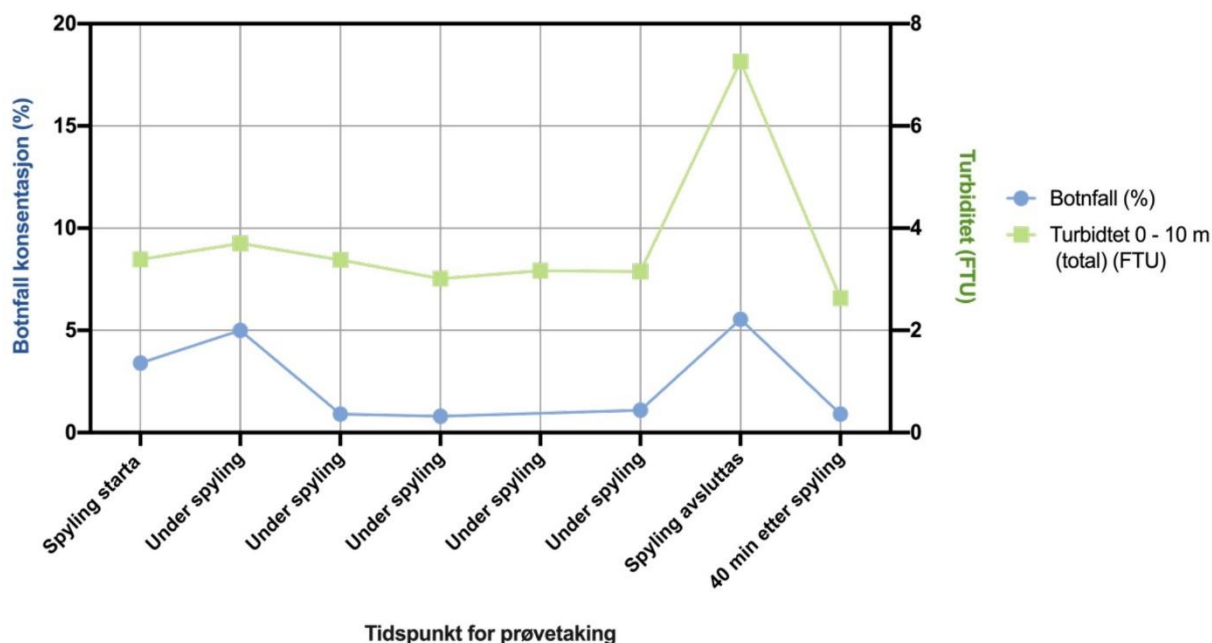
Resultatene fra håvtrekkprøvene og turbiditetsmålingene samsvarte og viste en økning av partikler (avspylte groefragmenter) i vannmassene gjennom spylingen. Denne partikkel konsentrasjonen normaliserte seg innen 40-60 minutter etter at spyling var avsluttet og viste da tilnærmet samme verdier som før spyling startet. På lokalitet TB og lokalitet FB var det en topp i partikkelkonsentrasjon ved slutten av spylingen. Dette skyldes sannsynligvis at spylingen ble avsluttet i den øvre del av notveggen hvor det ble registrert størst diversitet av groeorganismer (**Figur 57**).



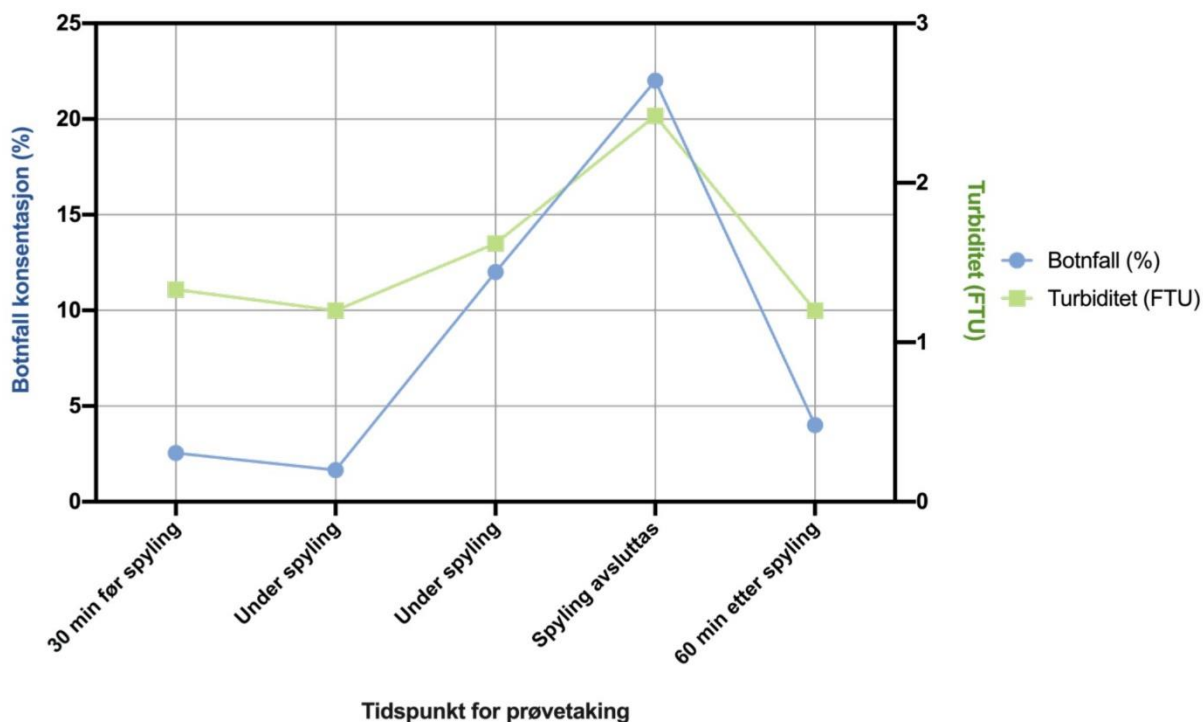
Figur 57. Partikkelvolum fra håvtrekk gjennomført før og under spyling. Partikkelvolum øker gjennom notspyling prosessen, med størst volum på slutten av spylingen.



Figur 58. Lokalitet BS. Partikkelvolum fra håvtrekkprøver oppgitt som bunnfall konsentrasjon (%) sammenlignet med profilmålinger av turbiditet (FTU).



Figur 59. Lokalitet TB. Partikkelvolum fra håvtrekkprøver oppgitt som bunnfall konsentrasjon (%) sammenlignet med profilmålinger av turbiditet (FTU).



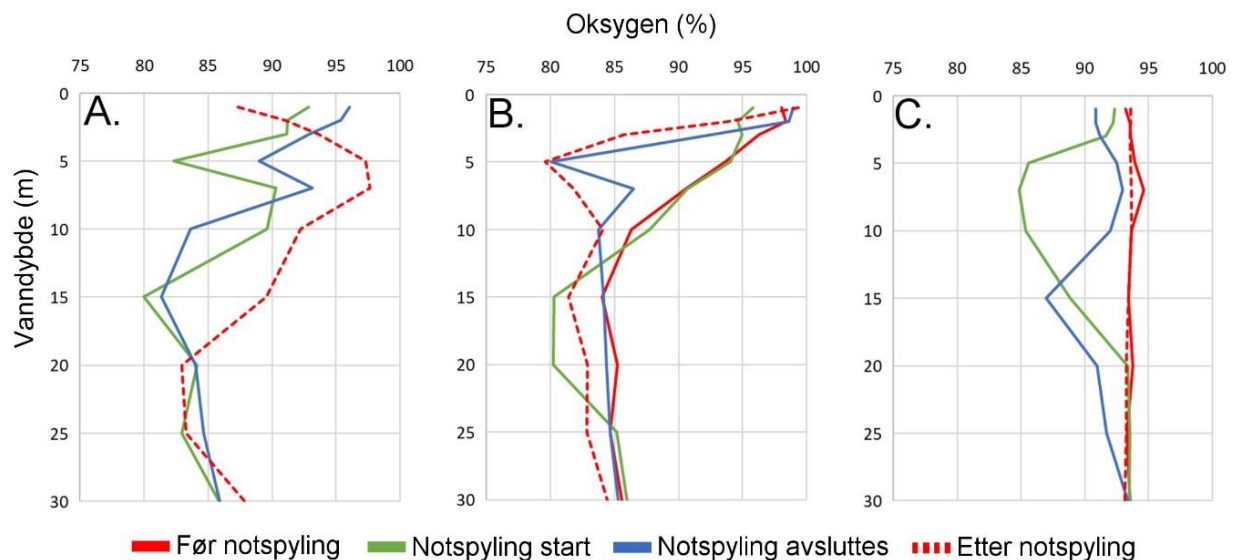
Figur 60. Lokalitet FB. Partikkelvolum fra håvtrekkprøver oppgitt som bunnfall konsentrasjon (%) sammenlignet med profilmålinger av turbiditet (FTU).

Effekt av notspyling på vannkvalitet - Oksygen

Hydrografiske målinger gjennomført før, under og etter spyling viser at oksygenprofilen endrer seg under notspyling. Det ble registrert en betydelig reduksjon i oksygenverdier ved den behandlede merden under spyling sammenlignet med målinger gjennomført før notspyling startet. Lavest oksygennivå ble registrert på 5 og 15 meters dyp under spyling med verdier omkring 80 % oksygen metning. Disse verdiene er 10-14 % lavere sammenlignet med målinger på samme lokalitet og dyp en time etter at notspyling var avsluttet.

På lokalitet TB forble oksygenverdiene lave 40-50 minutter etter at spylingen var avsluttet i motsetning til oksygenverdiene på lokalitet BS og FB som viste økning i oksygenverdier etter at spyling var avsluttet. Denne forskjellen mellom lokalitet TB og de to andre lokalitetene kan kanskje forklares med ulike spylemetode og spyletid. Lokalitet BS og FB brukte samme spylemetode (Stealth Cleaner) og kortere spyletid per merd enn lokalitet TB (Yanmar Østerbø).

Oksygenreduksjonen i merdmiljøet kan indikere økt oksygenforbruk på grunn av økt svømmeaktivitet og stress hos fisk i den behandlede merden. Oksygenprofilene til de ulike lokalitetene er vist i **Figur 61**.

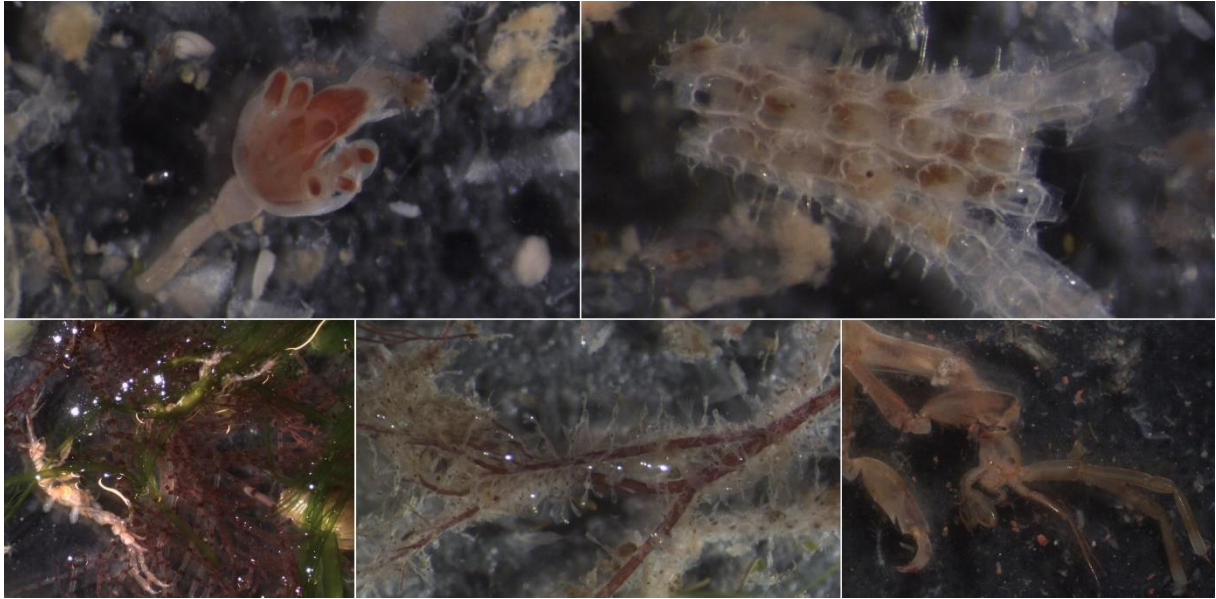


Figur 61. Profilmålinger av oksygen før, under og etter notspyling. Oksygennivåer oppgitt som metning (%).

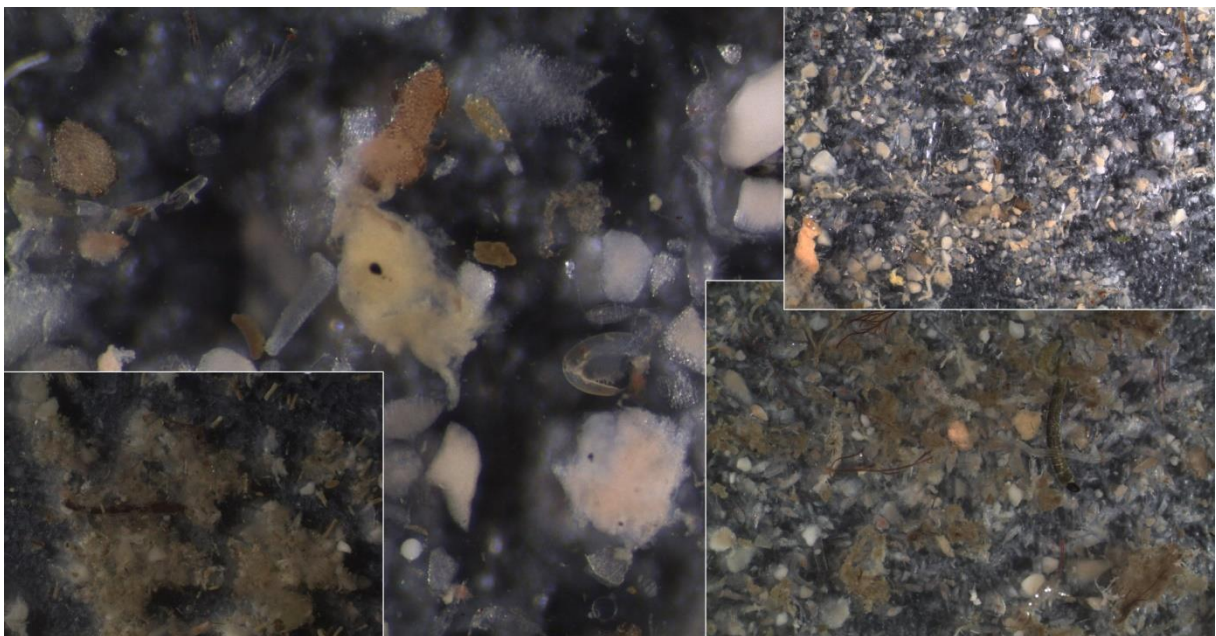
Identifisering av partikler fra håvtrekk

Undersøkinger av partikler samlet med håvtrekk fra de ulike lokalitetene viser høy grad av fragmenterte groeorganismer (**Figur 62**). Det var størst andel av hydroider i prøvene fra alle lokalitetene, men også mindre biter av alger (slie) var vanlig. I prøvene fra lokalitet TB ble det også funnet en del fragmenter av ulike typer mosdyr, men særlig arten *Electra pilosa* dominerte blant disse. Små blåskjell og biter fra blåskjell ble også identifisert i håvtrekkprøver fra lokalitetene BS og TB.

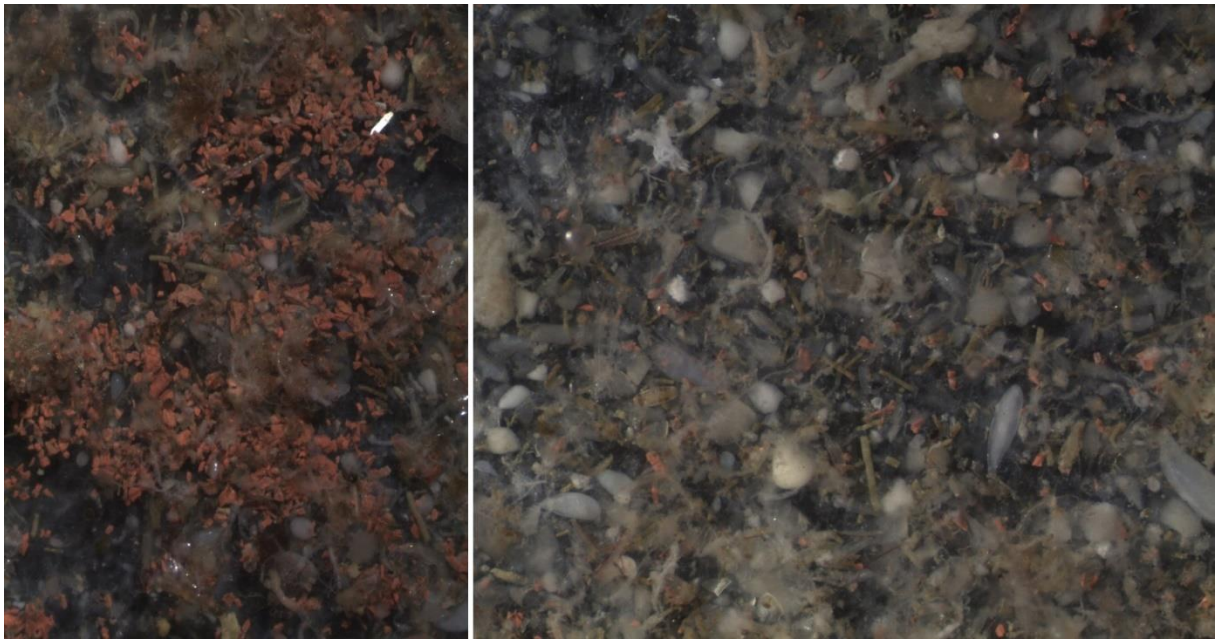
I håvtrekkprøvene fra lokalitet FB ble det også identifisert relativt store mengder med andre typer partikler. Dette inkluderer organisk materiale som kan være fekalier eller fôrrester (**Figur 63**). I tillegg ble det identifisert til dels store mengder av uorganiske partikler. Disse partiklene hadde samme farge som not impregneringen brukt på lokaliteten. Spylingen som ble gjennomført på lokalitet FB var den første spylingen etter utsett av fisk. Nøtene på lokaliteten var følgelig relativt ny-impregnert med kobberbasert anti-groe middel. Det antas derfor at uorganiske partikler i håvtrekkprøvene tatt under spyling var fragmenter av impregneringsstoff (**Figur 64**).



Figur 62. Avspylte groefragmenter fra håvtrekk tatt under spyling. Vanlige groefragmenter identifisert som hydroider, mosdyr, slie og spøkelseskreps. Mosdyr (*Electra pilosa*; øverst til høyre) har et forkalket skjelett med piggstrukturer (denticler).



Figur 63. Avspylte organiske partikler fra håvtrekksprøver tatt under spyling.

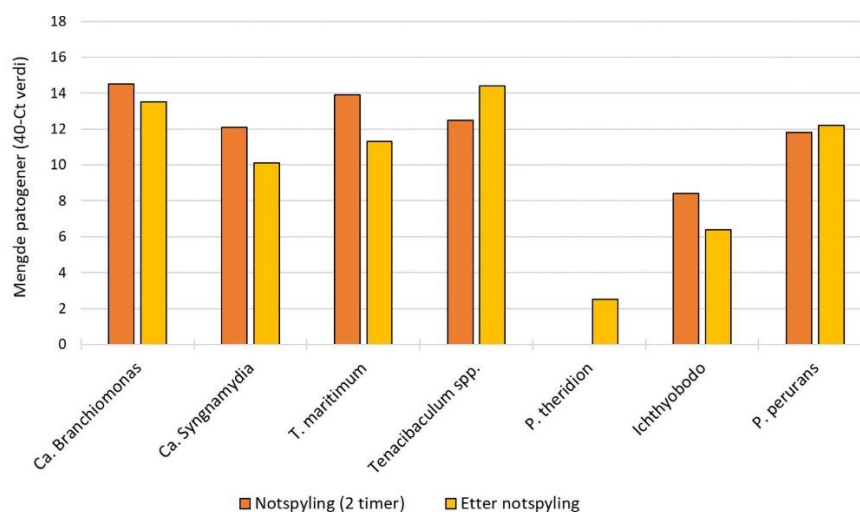


Figur 64. Avspylte uorganiske partikler fra håvtrekkprøver tatt under spyling.

Fiskepatogener påvist i partikler og avspylte groefragmenter fra håvtrekk

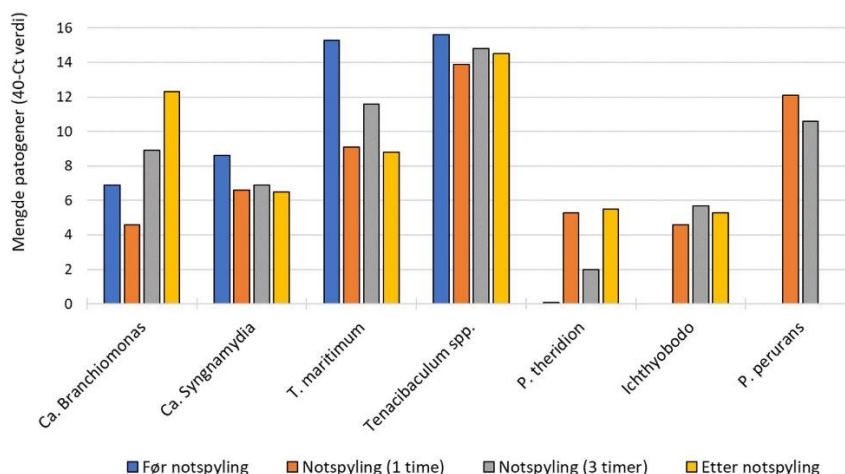
Håvtrekkprøvene tatt før, under og etter spyling ble analysert for de samme patogenene som begroingsorganismene samlet fra øvre del av noten.

Resultatene viste størst mengde med bakterier og gjelleamøben *P. perurans* i håvtrekkprøver tatt under og like etter spyling var avsluttet på lokalitet BS. Det ble ikke påvist *P. perurans* i prøver av håndplukket groeorganismer fra den øvre del av nota fra denne lokaliteten. Prøver fra lokaliteten var også positiv for *Ichthyobodo* sp. og lave nivåer med *P. theridion* ble påvist i prøver tatt etter at spyling var avsluttet. Resultat fra analyser av håvtrekkprøver fra lokalitet BS er oppsummert i **Figur 65**.



Figur 65. Lokalitet BS. Patogener påvist i håvtrekkprøver fra 10 meters dyp ved merd under og etter notspyling.

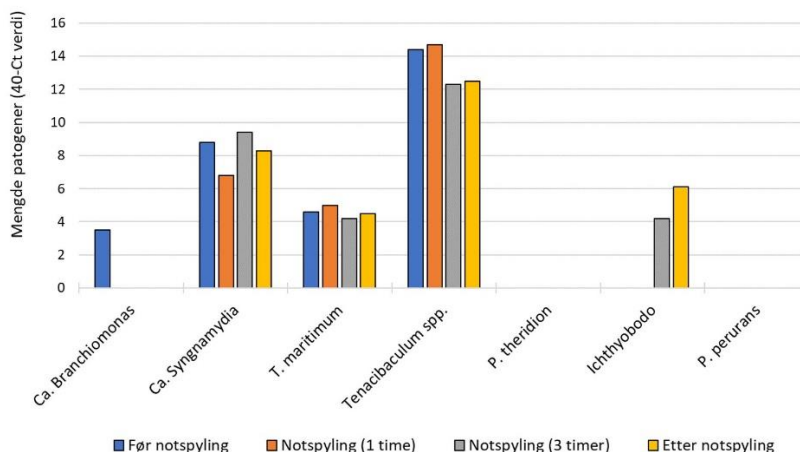
På lokalitet TB var det høyest nivå av *T. maritimum* og *Tenacibaculum* spp., men resultatene viser ingen økning av nivået under spyling. Det var derimot en økning av bakterien *Ca. Branchiomonas cysticola* i håvtrekkprøver tatt under spyling med høyest nivå i prøver tatt 40 minutter etter at spyling var avsluttet. Parasittene *P. theridion*, *Ichthyobodo* sp. og *P. perurans* ble ikke påvist i håvtrekkprøver tatt før spyling startet, men viser en økende tendens i prøver tatt under og etter spyling. Det ble registrert høyest nivå av *P. perurans* i disse prøvene (**Figur 66**). Disse resultatene samsvarer med resultatene fra lokalitet BS.



Figur 66. Lokalitet TB. Patogener påvist i håvtrekkprøver fra 10 meters dyp ved merd under og etter notspyling.

Håvtrekkprøvene fra lokalitet FB viste høyest nivå med *Tenacibaculum* spp., men det var ingen økning i prøvene tatt under spyling og etter spyling. Et lignende mønster er også registrert for andre smittestoffer påvist i håvtrekkprøver fra denne lokaliteten, med unntak *Ichthyobodo* som viser en økning under og etter spyling. Det ble ikke påvist *P. theridion* eller *P. perurans* i prøvene fra lokalitet FB. Resultat fra analyser av håvtrekkprøver fra lokalitet FB er oppsummert i **Figur 67**.

Det ble ikke påvist virus noen av håvtrekkprøvene fra de undersøkte lokalitetene.

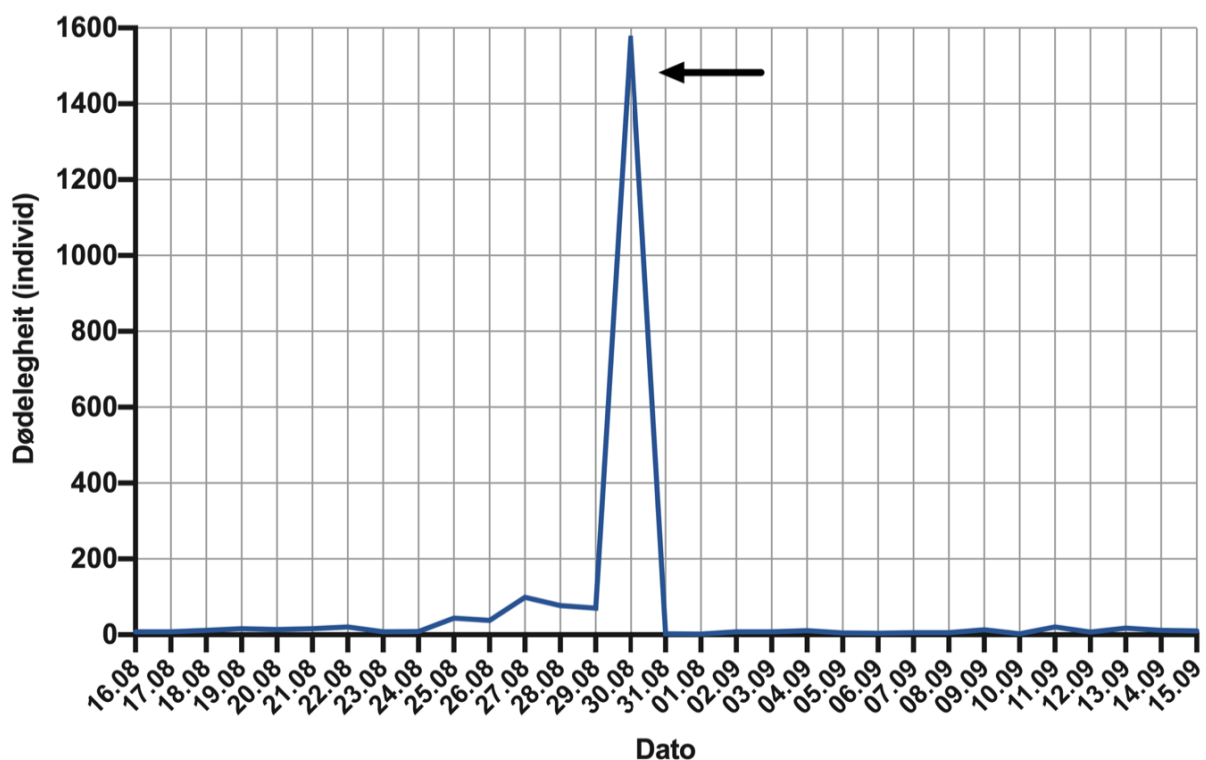


Figur 67. Lokalitet FB. Patogener påvist i håvtrekkprøver fra 10 meters dyp ved merd under og etter notspyling.

Smitte og gjellepatologi til fisk før og etter notspyling

Gjelleprøver av fisk fra de undersøkte lokalitetene ble tatt før notspyling og 5-7 dager etter notspyling var avsluttet. Alle prøvene ble testet for kjente fiskepatogener.

Gjelleprøver fra lokalitet BS ble ikke testet for PRV-3. Resultatene av analyser av laks fra BS viste varierende prevalens for alle de andre virusene. Flest fisk var smittet med PRV-1 og PMCV. Det var ingen statistisk signifikant endring i prevalens av virus smittet fisk før og etter notspyling (FET, $p>0.05$). Ingen av fiskene testet positiv for IPNV. Det ble registrert signifikant reduksjon i prevalens for bakteriene *Ca. Syngnamydia salmonis*, *Tenacibaculum* spp. og parasitten *P. perurans* (FET, $p<0.05$). På denne lokaliteten ble det også registrert høyest dødelighet dagen etter notspyling (**Figur 68**). Det kan ikke utelukkes at dette kan ha påvirket andel positive fisk påvist i perioden etter dersom dødeligheten skyldes sykdom og svinn av taperfisk. Resultat fra analyser av gjelleprøver fra lokalitet BS er oppsummert i **Tabell 3**.

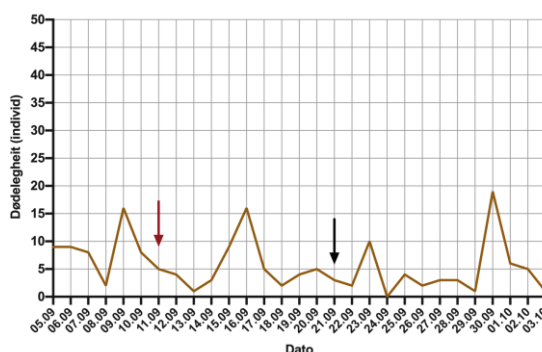


Figur 68. Antall dødfisk på lokalitet BS. Lav dødelighet (gjennomsnittlig 28,5 fisk per dag) i perioden før spyling. Økning i dødelighet dagen etter spyling var gjennomført (markert med svart pil).

Tabell 3. Oversikt over prevalens av patogener identifisert i gjellevev fra lokalitet BS, området til Ct-verdiene og gjennomsnittlig densitet (D). Tallet på undersøkte fisk før og etter spyling var lik (n=30). Område = laveste Ct-verdi til høyeste Ct-verdi. Gjennomsnittlig densitet = 40 - Ct-verdi/positive individ.

	Patogen	Før spyling			Etter spyling		
		Prevalens	Område	D	Prevalens	Område	D
Virus	ISAV	10 %	34,9 - 36,2	4,5	7 %	35,8 - 36,3	4
	SGPV	53 %	25,9 - 36,8	8,1	57 %	25,3 - 37,4	7,4
	SAV	77 %	23,3 - 35,5	10,9	67 %	25,4 - 36,6	10,4
	PRV1	97 %	29,9 - 37,2	7,1	97 %	28,8 - 34,6	8
	PMCV	100 %	22,3 - 38,1	9,4	93 %	21,4 - 36,6	10,9
	IPNV	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
Bakterier	<i>Ca. B. cysticola</i>	100 %	10,3 - 19,6	25,3	100 %	10,1 - 19,4	25
	<i>Ca. C. salmonicola</i>	0 %	ikke påvist		3 %	37,1	3
	<i>Ca. P. salmonis</i>	100 %	20,2 - 32,6	14,9	100 %	19,5 - 33,5	16,1
	<i>Ca. S. salmonis</i>	100 %	20,4 - 36,9	12,7	67 %	23,2 - 39,3	8,5
	<i>T. maritimum</i>	43 %	32,0 - 37,1	4,7	23 %	34,9 - 36,8	3,8
	<i>T. finnmarkense</i>	23 %	34,9 - 37,2	3,7	0 %	ikke påvist	
	<i>Y. ruckerii</i>	100 %	30,7 - 35,5	5,9	93 %	30,0 - 35,3	6,9
Parasitter	<i>Ichthyobodo sp.</i>	97 %	14,1 - 242	20,3	100 %	17,3 - 28,3	17,7
	<i>P. pseudobranchicola</i>	27 %	29,1 - 38,3	6,7	20 %	32,2 - 36,6	5,9
	<i>P. perurans</i>	100 %	11,6 - 28,2	20,7	70 %	15,5 - 32,2	16
	<i>P. theridion</i>	100 %	16,5 - 31,3	16,6	100 %	17,0 - 30,8	16,7

Gjelleprøver fra lokalitet TB ble ikke testet for PRV-3. Generelt sett var det svært lav prevalens med virus smittet fisk fra denne lokaliteten. Ingen av fiskene testet positiv for SAV. De fleste fiskene var derimot smittet med bakteriene *Ca. Branchiomonas cysticola*, *Ca. Synonymydia salmonis*, *T. maritimum* og parasittene *P. perurans* and *P. theridion*. Generelt sett viste resultatene en økning for de fleste smittestoffene når resultatene fra gjelleprøver tatt før notspyling sammenlignes med gjelleprøvene tatt 7 dager etter notspyling. Denne økningen er statistisk signifikant for *Tenacibaculum* spp. (FET, $p < 0.05$). Det ble ikke registrert endringer i dødelighet hos fisk etter notspyling (**Figur 69**). Resultat fra analyser av gjelleprøver fra lokalitet TB er oppsummert i **Tabell 4**.

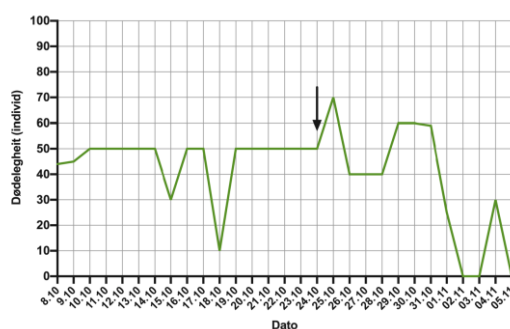


Figur 69. Lokalitet TB. Antall dødfisk per dag. Lav dødelighet gjennom hele perioden. Ingen økning i dødelighet registrert etter spyling. Rød pil markerer dagen etter en tidligere spyling, svart pil markere dagen etter spyling undersøkt i dette prosjektet.

Tabell 4. Oversikt over prevalens av patogener identifisert i gjellevev fra lokalitet BS, området til Ct-verdiene og gjennomsnittlig densitet (D). Tallet på undersøkte fisk før og etter spyling var lik (n=30). Område = laveste Ct-verdi til høyeste Ct-verdi. Gjennomsnittlig densitet = 40 - Ct-verdi/positive individ.

	Patogen	Før spyling			Etter spyling		
		Prevalens	Område	D	Prevalens	Område	D
Virus	ISAV	17 %	34,1 - 37,0	3,9	30 %	32,7 - 37,9	3,6
	SGPV	3 %	37,4	2,6	0 %	ikke påvist	
	SAV	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	PRV1	3 %	27,9	12,1	17 %	24,4 - 37,2	8,1
	PMCV	3 %	35,5	4,5	0 %	ikke påvist	
	IPNV	7 %	36,4	3,6	0 %	ikke påvist	
Bakteriar	<i>Ca. B. cysticola</i>	100 %	13,3 - 23,8	22,8	100 %	12,1 - 18,5	24,5
	<i>Ca. C. salmonicola</i>	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	<i>Ca. P. salmonis</i>	0 %	ikke påvist		3 %	27,5	12,5
	<i>Ca. S. salmonis</i>	90 %	22,1 - 35,3	10,7	100 %	22,7 - 33,7	11,6
	<i>T. maritimum</i>	83 %	26,4 - 32,7	10,7	100 %	24,2 - 31,7	11,2
	<i>T. finnmarkense</i>	0 %	ikke påvist		43 %	29,9 - 35,5	6,5
	<i>Y. ruckeri</i>	60 %	30,7 - 35,5	5,9	57 %	30,0 - 35,3	5,2
	<i>Pasteurella</i> sp.	0 %	ikke påvist		3 %	30,0	10,0
Parasittar	<i>Ichthyobodo</i> sp.	67 %	23,4 - 34,2	12,3	83 %	20,3 - 29,5	13,9
	<i>P. pseudobranchicola</i>	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	<i>P. perurans</i>	100 %	15,2 - 27,7	18,5	100 %	14,1 - 26,0	20,5
	<i>P. theridion</i>	100 %	14,8 - 27,9	20,1	100 %	15,4 - 27,6	19,6

Gjelleprøver fra lokalitet FB ble ikke testet for *Yersinia ruckeri* eller *Pasteurella* sp. Resultatene viser lav prevalens med virus smittet fisk fra denne lokaliteten. Ingen av fiskene testet positiv for ILAV, SGPV, SAV eller PRV-3. De fleste fiskene var smittet med bakteriene *Ca. Branchiomonas cysticola*, *Ca. Syngnamydia* og parasitten *P. theridion*. Det var en økning i prevalens for de fleste smittestoffene når prøver tatt før notspyling sammenlignes med prøver tatt 7 dager etter notspyling ble gjennomført. Økningen var ikke statistisk signifikant, men størst økning ble registrert for PRV1 (14 % økning), *Ca. Branchiomonas cysticola* (17 %) og *Ca. Syngnamydia salmonis* (14 %). Det var ingen markant endring i dødelighet hos fisk etter notspyling (**Figur 70**).



Figur 70. Lokalitet FB. Antall dødfisk per dag. Dagen etter spyling markert med svart pil. En svak økning registrert to dager etter spyling.

Resultat fra analyser av gjelleprøver fra lokalitet FB er oppsummert i **Tabell 5**.

Tabell 5. Oversikt over prevalens av patogen identifisert i gjellevev fra lokalitet FB, området til Ct-verdiene og gjennomsnittlig densitet (D). Prevalens uttrykt i prosent før spyling (n=30) og etter spyling (n=30). Område = laveste Ct-verdi til høyeste Ct-verdi. Gjennomsnittlig densitet = 40 - Ct-verdi/positive individ.

	Patogen	Før spyling			Etter spyling		
		Prevalens	Område	D	Prevalens	Område	D
Virus	ISAV	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	SGPV	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	SAV	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	PRV1	3 %	36,6	3,4	17 %	35,6 - 36,4	4,0
	PRV3	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	PMCV	3 %	36,6	3,4	0 %	ikke påvist	
	IPNV	0 %	ikke påvist		3 %	35,5	4,5
Bakterier	<i>Ca. B. cysticola</i>	83 %	19,3 - 36,0	9,4	100 %	22,0 - 37,0	11,4
	<i>Ca. C. salmonicola</i>	0 %	ikke påvist		3 %	37,7	2,3
	<i>Ca. P. salmonis</i>	0 %	ikke påvist		3 %	36,7	3,3
	<i>Ca. S. salmonis</i>	83 %	18,1-37,0	11,7	97 %	22,3 - 37,7	9,5
	<i>T. maritimum</i>	0 %	ikke påvist		3 %	38,6	1,4
	<i>T. finnmarkense</i>	10 %	35,5-36,6	4,2	0 %	ikke påvist	
Parasitter	<i>Ichthyobodo</i> sp.	63 %	18,0 - 30,5	13,0	67 %	20,5 - 32,5	13,3
	<i>P. pseudobranchicola</i>	0 %	ikke påvist		0 %	ikke påvist	
	<i>P. perurans</i>	63 %	11,3 - 22,7	21,2	67 %	14,2 - 25,1	20,2
	<i>P. theridion</i>	100 %	15,4 - 28,9	17,6	100 %	19,0 - 33,9	16,2
	<i>T. bryosalmonae</i>	63 %	22,2 - 39,3	7,2	10 %	28,1 - 36,6	6,9

Det kunne ikke påvises endringer i gjellepatologi hos fisk undersøkt før spyling sammenlignet med fisk undersøkt 5-7 dager etter spyling på noen av lokalitetene. Generelt var det kun få fisk fra disse lokalitetene som hadde kliniske tegn på gjellesykdom. Gjellepatologi undersøkelsene viste tegn som er assosiert med AGD, noe som samsvarer bra med real time RT PCR resultatene og histologiske undersøkelser av de samme fiskene.

Anlegg FK

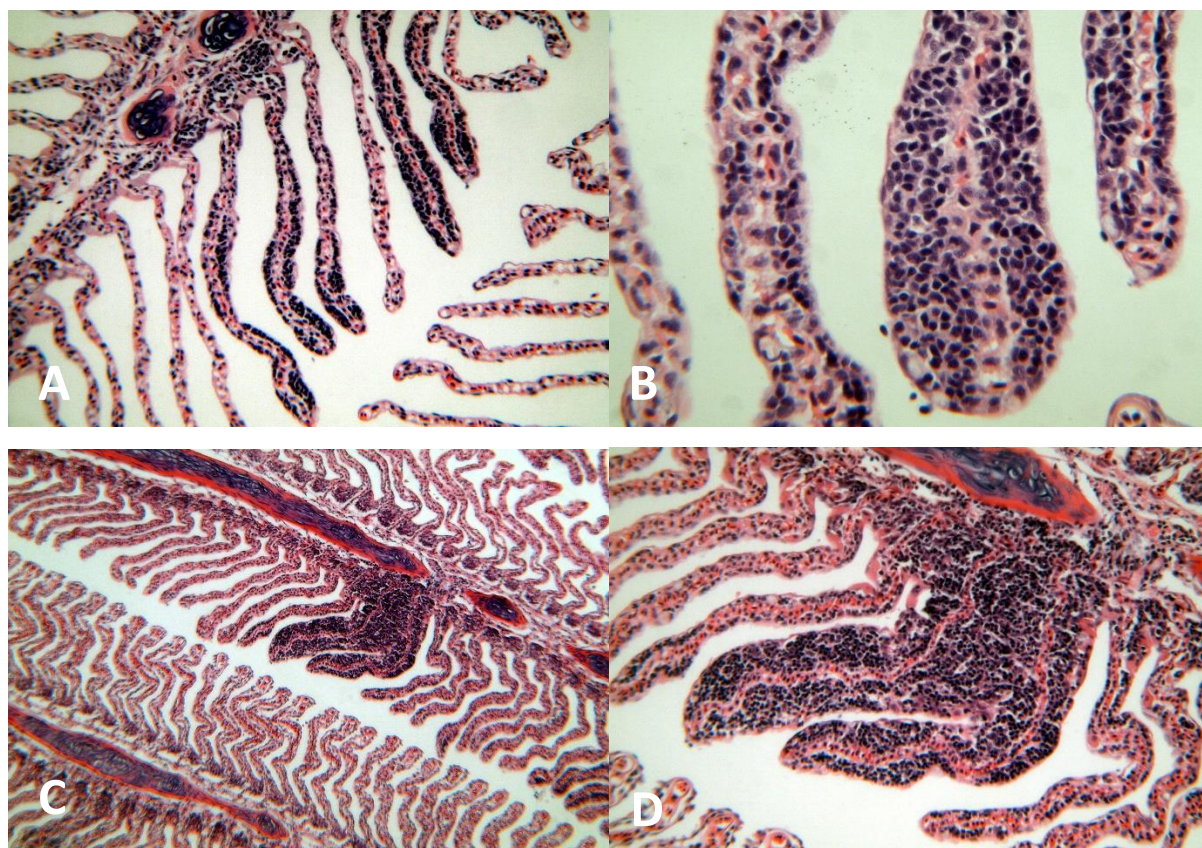
Materiale fra dette anlegget ble samlet inn i august/september 2020, men så langt er det kun undersøkt for tilstedeværelse av gjellepatogener (real time RT PCR) og gjellepatologi før og etter spyling av nøter. Det ble gjennomført tre uttak av regnbueørret fra anlegget: 1) før spyling av nøter 26.08.2020, 2) Uttak av fisk under spyling 27.08.2020, 3) uttak av fisk etter spyling av nøter 07.09.2020.

Fisken fra uttaket før spyling (gj.sn. vekt = 2908 gram, gj.sn. lengde = 52,4 cm, gj.sn. antall bevegelige lakselus = 3,1) av nøter viste ingen klare tegn til sykdom (**Figur 71**). Fisken var negativ for tilstedeværelse av SAV, ISAV, PRV3, PMCV, SGPV og IPNV, men en fisk var positive for PRV1. Prevalens

av *P. theridion* og *Ca. B. cysticola* var tilnærmet 100 %, mens prevalens av *P. peruans*, *Costia* og *Ca. S. salmonis* var henholdsvis 43,3, 20,0 og 73,3 %. Fisken var negativ for *P. pseudobranchicola* og *T. maritimum*. Et tilsvarende bilde ble påvist hos regnbueørret tatt ut under spyling av nøtene.



Figur 71. Regnbueørret uten ytre tegn på sykdom.



Figur 72. Gjelle hyperplasi (øking i antall inflammasjons celler) før (A & B) og etter (C & D) spyling av nøter.

Spyling av nøtene førte ikke til endringer i påvisning av virus, *P. theridion*, *P. perurans* og *Ca. S. salmonis* hos fisken ved uttaket 12 dager etter spyling. Prevalens av *Costia* økte imidlertid til 96,7 %. Det ble ikke observert noen signifikant endring av tetthet av det forskjellige patogener. Gjelle hyperplasi ble observert både før og etter spyling av nøtene (**Figur 72**). Spyling av nøter synes ikke å ha hatt en negativ innvirkning på gjellehelsen til regnbueørret i anlegget.

Konklusjon etter spyling av nøter

Det er vist at partikkeltetthet og turbiditet i merdmiljøet øker under notspyling, og at det kan påvises ulike typer smittestoffer i slike avspylte partikler. Smittestoffene påvist i avspylte partikler og groefragmenter på de ulike lokalitetene samsvarer med påvist smittestoff i håndplukket groeorganismer fra øvre vannlag. Unntaket er påvisning av gjelleamøben *P. perurans* som kun ble påvist i avspylte partikler. Dette kan indikere at det er større tetthet av denne amøben på notveggen i dypere vannlag sammenlignet med den øvre del av noten. En forklaring på dette kan være at *P. perurans* er strengt marin og dermed følsom for ferskvannspåvirkning. I så tilfelle bør det forventes større mengder av denne amøben på dyp med tilstrekkelig høy salinitet. En annen forklaring kan være at smittestoffer som *P. perurans* forekommer i større grad i organisk materiale, og det er mer organisk materiale på notveggen i dypere vannlag sammen lignet med overflatelaget. Det ble imidlertid ikke påvist *P. perurans* på lokalitet C hvor det var relativt mye organisk materiale i håvtrekkprøvene og høy prevalens med fisk smittet med *P. perurans*. Det ble også observert at spyling kan påvirke oksygenprofilen i merden som blir behandlet. Redusert oksygen under spyling kan indikere trenging og / eller stress hos fisk i den behandlede merden.

Spyling av nøter kan medføre økt dødelighet, men i dette studiet ble økning i dødelighet kun observert på en lokalitet. Spylingen gav ikke vevsendringer i gjellevevet og hadde kun en mindre påvirkning på prevalens og densitet av patogener.

Immunresponser (AP V) og Kvantitative og kvalitative endringer i mikrobiota (APVII)

Major findings are set out below under manuscript titles:

Paper 1: This manuscript describes the novel methodology that was developed within this project for the microbiome analyses. The manuscript is under consideration in mSphere (Benjamin G. J. Clokie; Ahmed Elsheshtawy; Amaya Albalat; Allan Beveridge; Are Nylund; Simon MacKenzie (in press). *Optimisation of a non-invasive sampling method provides robust, reproducible characterisation for low biomass samples collected from the fish gill for microbiome analysis.*)

Major findings:

1. We demonstrate the impact that titration of the 16S gene prior to library construction has for deriving robust and reproducible data for low biomass samples.
2. We demonstrate the importance of minimising host genomic material in samples that are prone to blood contamination such as fish gills.
3. We present evidence that screening samples prior to library construction ensures that expensive library construction and sequencing procedures are appropriately applied and offer clear benefits.
4. We propose that the adoption of quantification can provide a considerable step change towards deriving robust datasets from complex, low biomass environments.

Paper 2: This paper brings together the data across the project for the net cleaning sampling (APIII) and analyses (APIV – APVII). The manuscript is under consideration in Aquaculture. (Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie, Amaya Albalat, Are Nylund, Trond Einar Isaksen, Linda Andersen, Allan Beveridge, Simon MacKenzie (Submitted). *Understanding the impact of net cleaning upon Atlantic salmon and rainbow trout gill health.*)

Major findings for immunology and microbiome analyses:

1. We demonstrate that the salmon gill microbiome is significantly impacted after net cleaning with a major change observed in this community. Alpha diversity analysis revealed that gill microbial community richness decreased after net cleaning.
2. Abundance of several genera comprising beneficial, opportunistic, and potential pathogenic bacteria was significantly changed after net cleaning. In agreement with previous reports of dysbiosis in farmed fish gill, skin, and gut microbiome opportunistic bacteria such as *Aliivibrio*, *Pseudomonas* and *Clostridium* significantly increased in the gill after net cleaning.

3. *In situ* net cleaning significantly changed the Atlantic salmon gill inflammatory response with all measured mRNA transcripts, MHC II, IL-1 β , TNF- α , TGF- β and IL-10, significantly upregulated after net cleaning. This reflects the microbiome data and environmental data collected highlighting gill damage as a result of net cleaning.

Paper 3: This paper brings together the data across the project for the laboratory sea lice experimentation and field sampling under the context of thermal treatments both bespoke (iLab) and industry (Optilicer). The manuscript is under consideration in *Aquaculture*. (Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie, Amaya Albalat, Birgit Kvåle, Are Nylund, Trond Einar Isaksen, Linda Andersen, Allan Beveridge, Simon MacKenzie (in prep.). *Understanding the impact of thermal delousing on the Atlantic salmon, *Salmo salar*, gill health.*)

Major findings for immunology and microbiome analyses:

1. We performed absolute qPCR gene expression analysis for cellular markers of immune cells, most notably antigen presenting cells (MHC II), proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and inhibitory cytokines (TGF- β and IL-10). The abundance of mRNA transcripts of all tested targets was downregulated after thermal treatment in both trials (t-test, $p < 0.05$), indicating that thermal treatment caused a **suppression** of the measured mRNAs.
2. In field trials different results were observed for microbiome analyses. In Trial 1 all measured alpha indices were significantly different upon thermal treatment. Gill microbial richness, diversity and evenness were **remarkably higher** after thermal treatment trial 1. Moreover, beta diversity among groups also showed that samples clustered according to the timepoint, indicating that in this field trial the salmon gill microbiome had a distinct compositional profile pre and post thermal treatment.
3. In field trial 2 **no significant differences** were observed pre and post treatment on the salmon gill microbiome.
4. In the laboratory sea lice challenge trial we demonstrated the destabilising effect of lice infestation on salmon gill microbial communities. Differences of gill microbial richness were found between the control and lice infested fish, with the challenged fish showing lower richness. This corresponds to the decreased abundance and/or absence of several essential bacterial genera after infection.
5. We propose that variations in the gill microbiome in response to treatment between the two sites could be due to the notable differences in the husbandry history and health status of the fish at the two sites. Besides sea lice infestation at the two sites, fish at site 1 had received four treatments for AGD and sea lice and were diagnosed with cardiomyopathy syndrome (CMS)

and gill inflammation before this trial. Whereas fish at site 2 had not received any treatment and were not diagnosed with any pathologies prior the trial. Thus, the gills of the fish at site 1 had been adversely impacted before the trial which had potentially led to gill microbial dysbiosis before the treatment.

Paper 4: This paper brings together the data across the project for the laboratory AGD trials and field treatments. The manuscript is under construction, all data in place, with a target of Frontiers in Aquaculture for publication in the 2nd half of 2022. (Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie, Amaya Albalat, Søgne Wiik, Are Nylund, Trond Einar Isaksen, Linda Andersen, Allan Beveridge, Simon MacKenzie (in prep.) *Understanding the impact of AGD and its treatment on Atlantic salmon, *Salmo salar*, gill health.*)

Major findings for immunology and microbiome analyses:

1. In laboratory trials the abundance of mRNA transcripts of all inflammatory mRNA targets (IL-1 β and TNF- α) and MHC class II mRNA (MHCII) were significantly up-regulated (t-test, $p < 0.05$) after freshwater treatment with no observable response for anti-inflammatory cytokines (TGF- β and IL-10).
2. In the same trials absQPCR studies for tissue remodelling related mRNAs (MMP 13, MMP 2, MMP9, TIMP 2, TIMP 3) showed significant regulatory shifts that were time-related post-treatment in both AGD-challenged and control groups with similar dynamics demonstrating the impact of treatment and infection upon gill structure and function. Furthermore, haematopoietic transcription factors, key regulators of immune system-related cellular population also responded to both treatment and infection. 17 days post-treatment/infection appears as a key regulatory event for these functions.
3. Microbiome diversity and evenness is significantly impacted post-treatment in laboratory trials highlighting a decrease at 23 days post-treatment in microbiome diversity this effect is exacerbated in the presence of low level AGD infection.
4. In field trials a post-treatment effect is identified composing of a significant decrease in the evenness of the gill microbiome. This is paralleled with a significant downregulation (suppression) of the pro-inflammatory gill response demonstrated by a decrease in IL-1 β , TNF- α and MHC class II mRNA abundance.

Paper 5: This review paper addresses the current state of the art in our understanding of AGD from an academic and industry viewpoint. This review is currently under consideration at Reviews in Aquaculture. (Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie, Amaya Albalat, Are Nylund, Linda

Andersen, and Simon MacKenzie. (in prep.) *Amoebic gill disease: overview of the current knowledge in academia and state of the art in the industry*).

Vurdering av funnene

Antall observasjoner av behandlinger i felt; termisk avlusing (tre med Thermolicer og Optilicer, og tre termiske behandlinger av laks etter fire timer opphold i kjølt ferskvann, ferskvannsbehandling mot *P. perurans* (to ferskvannebehandling og en behandling med kjølt ferskvann fulgt av termisk avlusing), samt spyling av nøter (fire behandlinger gjennomført og en behandling stoppet på grunn av høy dødelighet relatert til algeoppblomstring og infeksjon med *Pasteurella* sp), utgjør selvfølgelig et begrenset antall. I tillegg kommer at vi har kun fokusert på termiske behandlinger mot lakselus (som synes å dominere på Vestlandet).

Det betydelige datagrunnlaget fra hver behandling gir imidlertid en trygghet med henblikk på gyldigheten av konklusjonene som vi presenterer i denne rapporten. Alle behandlinger i felt vil påvirke gjellemikrobiotaen og immunforsvaret hos laksen, men gjellepatologi og eventuell dødelighet synes ikke primært å være relatert til behandlingsmetodene. Det som synes å være sentralt for gjennomføring av en vellykket behandling uten påfølgende alvorlig dødelighet, er fiskens generelle helsetilstand før behandling. Ved ukjent helsestatus i anlegget bør alle behandlinger kun gjennomføres etter at sykdomsstatus er kartlagt. Viktige patogener som det bør fokuseres på er knyttet til virusinfeksjoner, dårlig gjellehelse (alvorlig AGD, paranukleosporose, epitheliocystis etc), pasteurellose, og alvorlige sår-sykdommer (flere bakterier).

Eksperimentell behandling i lab tyder også på at termisk behandling og behandling med ferskvann ikke vil resultere i dårligere gjellehelse og eventuell dødelighet.

• Vurdering/drøfting av mulighetene for videre anvendelse av resultater fra prosjektet (implementering)

- Termisk avlusning fremstår som en effektiv måte å redusere antallet bevegelige stadier hos laksefisk i oppdrett. Ved korrekt gjennomføring av termisk avlusning ved lave sjøtemperaturer (vår og vinter) og i anlegg med god fiskehelse vil en ikke få økt dødelighet/patologi knyttet til behandlingen. I perioder med høyere temperatur vil det være nødvendig med kartlegging av patogener i fisken før behandling, og ved høye tettheter av patogener som *P. theridion*, *P. perurans*, PMCV, PRV1, SAV, IPNV, SGPV og *Cand. B. cysticola* må det vurderes om en annen type avlusing vil være mer tjenlig med henblikk på fiskevelferd. Et alternativ er å overføre laksen til ferskvann med lav temperatur i noen timer før behandling eks. termisk avlusing.

Dette gjør at en kan benytte en lavere behandling temperatur (<30 °C) og samtidig oppnå en meget effektiv avlusing. Denne behandlingen synes å være mer skånsom for fisken noe som også støttes av det faktum den begynner å spise umiddelbart etter tilbakeføring til noten.

- This project highlights the need to understand through ***longitudinal studies across the entire commercial cycle*** the potential of gill microbiomes to serve as a non-lethal critical health management tool that informs the deployment of husbandry interventions across sites that exhibit different health and welfare challenges.
- The relationship between fish health and welfare and husbandry intervention is reflected in changes in the gill microbiome. This is highlighted in the field samples analyzed for sea lice treatment where farm GB, with a history of multiple regular interventions, displayed significant microbiome dysbiosis in contrast to farm OB, with few interventions, displayed no significant change. It can be suggested there is a direct effect of diverse husbandry interventions and their timing that leads to a cumulative gill microbiome dysbiosis that reflects the poor gill health and impacts upon the welfare status of the fish population.
- The use of simple easily accessible and economic sequencing technologies has the potential to address the limitations of single point-single target assays therefore increasing robustness of data providing a predictive tool for site-specific health management.

6. Hovedfunn

- Termisk behandling av laks ved lave sjø temperaturer eller bruk av kjølt ferskvann fulgt av termisk avlusing er effektiv til fjerning av lakselus, synes å sikre en god fiskevelferd, og vil ikke føre til en signifikant øking i dødelighet hvis fisken i utgangspunktet er frisk.
- Behandling med ferskvann mot *P. perurans* (ved utbrudd av AGD) er effektiv metode til å redusere tettheten av amøben uten å gi redusert gjellehelse og økt dødelighet som følge av behandlingen. Forutsetningen er at fisken behandles før den utvikler alvorlig AGD og at fisken ikke har andre alvorlige sykdommer.
- All husbandry practices investigated have significant impacts upon the gill microbiome. The salmon gill microbiome is highly sensitive to husbandry management procedures and likely reflects fish health and welfare as we have demonstrated from field sampling across different commercial sites. The gill microbiome responds both negatively and positively to different husbandry interventions and this is tightly correlated to fish health and mortality. Although the study has limited capacity to predict responses in commercial populations due to the constricted temporal scales applied from the data generated it can be proposed that gill

microbiome communities reflect the intensity of husbandry interventions and reflect welfare status.

- The development of an optimized sampling protocol for low biomass input to 16S microbiome sequencing has generated a high-quality platform that delivers consistent and robust information addressing the salmon gill. This development provides the opportunity to develop consistent non-lethal sampling for the gill microbiome.
- The relationship between microbial dysbiosis and immunological response, with emphasis upon inflammatory responses and tissue remodeling and recovery, has been demonstrated in this project where measured immunological indicators display a tight corollary with microbiome status under different husbandry interventions.

7. Referanser

- Apablaza P, Frisch K, Brevik ØJ, Småge SB, Vallestad C, Duesund H, Mendoza J, Nylund A. (2017). Primary Isolation and Characterization of *Tenacibaculum maritimum* from Chilean Atlantic Salmon Mortalities Associated with a *Pseudochattonella* spp. Algal Bloom. J Aquat Anim Health. 2017 Sep;29(3):143-149. doi: 10.1080/08997659.2017.1339643.
- Austin B (2002) The Bacterial microflora of fish *ScientificWorldJournal* 2: 558-72
- Austin B (2006) The Bacterial microflora of fish, revised *ScientificWorldJournal* 6: 931-45
- Cahill MM (1990) Bacterial Flora of Fishes: A review *Microb Ecol* 19: 21-41
- Dahle OM (2015). Experimental infections with *Paramoeba perurans* and AGD development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*). Are there host and *P. perurans* strain-related differences in infectivity and virulence? Master thesis, University of Bergen. Pp 71.
- Dahle OM, Blindheim SH, Nylund A, Karlsbakk E, Breck O, Glosvik H, Andersen L (2020). Atlantic salmon *Salmo salar* and ballan wrasse *Labrus bergylta* display different susceptibility to clonal strains of *Paramoeba perurans*. Vol. 140: 55–72. <https://doi.org/10.3354/dao03483>
- Draghi A II, Bebak J, Daniels S, Tulman ER and others (2010) Identification of 'Candidatus Piscichlamydia salmonis' in Arctic charr *Salvelinus alpinus* during a survey of charr production facilities in North America. Dis Aquat Org 89:39-49.
- Dykova I, Lom J (2004): Advances in the knowledge of amphizoic amoebae infecting fish *Folia Parasitol* 51 (2-3):81-97
- Embar-Gopinath S, Butler R, Nowak B (2005): Influence of salmonid gill bacteria on development and severity of amoebic gill disease *Dis Aquat Organ* 67 (1-2):55-60
- Frisch K, Småge SB, Brevik ØJ, Duesund H, Nylund A (2017) Genotyping of *Tenacibaculum maritimum* isolates from farmed Atlantic salmon in Western Canada. J Fish Dis. Jul 26. doi: 10.1111/jfd.12687.
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J. and de Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28(7), 649-669. doi: 10.1080/08927014.2012.700478.
- Floerl, O., Sunde, L. M. and Bloecher, N. (2016). Potential environmental risks associated with biofouling management in salmon aquaculture. *Aquac Environ Interact.*, 8, 407-417.
- Gimmersvik K Nielsen KVLind MB, Viljugren H (2017). Mekanisk avlusning med FLS-avlusersystem-dokumentasjon av fiskevelferd og effekt mot lus. Rapport 6 VI: ISSN 1890-3290.
- Gjessing MC, Thoen E, Tengs T, Skotheim SA, Dale OB (2017). Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater and seawater-reared Atlantic salmon. J Fish Dis. Doi: 10.1111/jfd.12608.
- Gunnarsson GS, Blindheim S, Karlsbakk E, Plarre H, Imsland AK, Handeland S, Sveier H, Nylund A (2017a) *Desmozoön lepeophtheirii* (microsporidian) infections and pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 468: 141–148 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.035>). (Epub Sep 2016).
- Gunnarsson GS, Karlsbakk E, Blindheim S, Plarre H, Imsland AK, Handeland S, Sveier H, Nylund A (2017b). Temporal changes in infections with some pathogens associated with gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 468 (2017) 126–134 (Epub- Oct 2016).
- Hellebo, A., Stene, A. and Aspehaug, V. (2016). PCR survey for *Paramoeba perurans* in fauna, environmental samples and fish associated with marine farming sites for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Fish Dis. 40, 661-670.
- Hjeltnes B, Bang-Jensen B, Bornø G, Haukaas A, Walde C S (red), Fiskehelserapporten 2017 Veterinærinstituttet 2018, 107 p
- Isaksen TE, Karlsbakk E, Sundnes GA, Nylund A (2010). Patterns of *Ichthyobodo necator* sensu stricto infections on hatchery-reared Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway. Dis Aquat Org 17;88(3):207-14.

- Isaksen T, Karlsbakk E, Watanabe K, Nylund A (2011). *Ichthyobodo salmonis* sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida) an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Parasitology* Aug;138(9):1164-75. Epub 2011 Jul 15.
- Isaksen TE, Karlsbakk E, Repstad O, Nylund A (2012). Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (Kinetoplastida), important fish parasites. *Parasitology International* 61 (4): 675 – 683.
- Jørgensen A, Nylund A, Nikolaisen V, Alexandersen S, Karlsbakk E. (2011). Real-time PCR detection of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporidia) in wild salmonids in Norway. *J Fish Dis.* May;34(5):365-71. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01248.x. Epub 2011 Mar 15.
- Karlsbakk E, Sæther PA, Høstlund C, Fjellsøy KR, Nylund A (2002). *Parvicapsula pseudobranchicola* n.sp. (Myxozoa), a myxosporidian infecting the pseudobranch of cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 22(6): 381 – 392.
- Karlsbakk E., Omdal, L. M., Wangen, I. H., Fiksdal, I. U., Mortensen, S., Ottem, K. F. and Nylund, A. (2010). Smittespredning ved francisellose hos torsk. *Fisken og Havet 2010 (Særnr. 1 Havforskningsrapporten 2010)*, 101-102.
- Karlsen M, Nylund A, Watanabe K, Helvik JV, Nylund S, Plarre H (2007). Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environ Microbiol.* 2008 Jan;10(1):208-18. Epub 2007 Sep 24.
- Kindt M (2017). Eksperimentell smitte med *Paramoeba perurans* og utvikling av amøbisk gjellesykdom hos Atlantisk laks (*Salmo salar*, L). Påvirker vanntemperaturen virulensen hos klonale isolater av amøben? Masteroppgave i fiskehelse, Universitetet i Bergen.
- McConnachie, S. H., Guselle, N. J. and Speare, D. J. (2013). Retention of viable microsporidian (*Loma salmonae*) spores within the blue mussel (*Mytilus edulis*): Use of an experimental laboratory model probing pathogen transfer within a multi-trophic aquaculture setting. *Aquaculture*, 376, 1-5.
- Meyers, T. R. (1984). Marine bivalve mollusks as reservoirs of viral finfish pathogens - Significance to marine and anadromous finfish aquaculture. *Mar Fish Rev*, 46 (3), 14-17.
- Mitchell SO, Rodger (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *J Fish Dis* 34(6): 411 – 432.
- Mitchell SO, Steinum TM, Toenshoff ER, Kvellestad A, Falk K, Horn M, Colquhoun DJ (2013). *Candidatus Branchiomonas cysticola* is a common agent of epitheliocystis in seawater-farmed Atlantic salmon in Norway and Ireland. *Dis Aquat Org* 103: 35 – 43.
- Mitchell, S.O., Steinum, T., Toenshoff, E.R., Kvellestad, A., Falk, K., Horn, M., Colquhoun, D.J., 2013. *Candidatus Branchiomonas cysticola* is a common agent of epitheliocystis in seawater-farmed Atlantic salmon in Norway and Ireland. *Dis. Aquat. Org.* 103, 35 – 43.
- Mjølnørød EB, Srivastava A, Moore LJ, Plarre H, Nylund A (2022). Identification of housekeeping genes of *Candidatus Branchiomonas cysticola* associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives of Microbiology* 204:365. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02966-y>
- Molloy, S. D., Pietrak, M. R., Bricknell, I. and Bouchard, D. A. (2013). Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus from the blue mussel, *Mytilus edulis*, to cohabitating Atlantic Salmon (*Salmo salar*) smolts. *Appl Environ Microbiol*, 79 (19), 5882-5890.
- Nylund, A., Kvenseth, A.M. & Isdal, E. (1998). A morphological study of the epitheliocystis agent in farmed Atlantic. *J. Aqu. Animal Health*. Vol. 10: 43 - 55.
- Nylund A, Devold M, Plarre H, Isdal E, Aarseth M (2003) Emergence and maintenance of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Europe: A new hypothesis. *Dis Aquat org* 56: 11 – 24.
- Nylund A, Karlsbakk E, Koren C, Sæther PA, Larsen T, Nielsen BD, Brøderud AE, Høstlund C, Fjellsøy KR, Lervik K, Rosnes L. (2005). *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxosporidia) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Dis. Aquat. Org.* 63: 197 – 204.
- Nylund A, Watanabe K, Karlsen M, Nylund S, Karlsbakk E, Sæther PA (2006). New gill disease in Atlantic salmon – Poxvirus (In Norwegian). *Norsk Fiskeoppdrett* 7.

- Nylund A, Karlsen M, Watanabe K, Karlsbakk E, Nylund S, Isaksen T, Arnesen CE (2007). Gjennombrudd i kampen mot PGI (proliferative gjellebetennelse). Norsk Fiskeoppdrett 32 (3): 50 - 53.
- Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Karlsen M, Sæther PA, Arnesen, CE, Karlsbakk E (2008). Morphogenesis of Salmonid Gill poxvirus (SGPV) associated with proliferative gill disease (PGD) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway . Arch Virol 153 (7): 1299 – 309.
- Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Arnesen CE, Karlsbakk E (2009a). Nytt patogen – gammel sykdom. Norsk Fiskeoppdrett 2:
- Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Sævareid I, Arnesen CE, Karlsbakk E (2009b) Lakselus. Biologisk vektor for lakseparasitt.. Naturen 133 (4): 217 – 222.
- Nylund A, Watanabe K, Nylund S, Sævareid I, Arnesen CE, Karlsbakk E (2009c). Lakselus er vektor for en ny art mikroporidie. Norsk Fiskeoppdrett 34(6a):20 – 33.
- Nylund S, Nylund A, Watanabe K, Arnesen CE, Karlsbakk E (2010). *Paranucleospora theridion* n.gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a life cycle in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Eukaryot. Microbiol. 57 (2): 95 – 114.
- Nylund S, Steigen S, Karlsbakk E, Plarre H, Andersen L, Karlsen M, Watanabe K, Nylund A (2014). Characterization of ‘*Candidatus* Syngnamydia salmonis’ (*Chlamydiales*, *Simkaniaceae*), a bacterium causing epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Arch. Bacteriol. DOI 10.1007/s00203-014-1038-3.
- Nylund, S., Andersen, L., Sævareid, I., Plarre, H., Watanabe, K., Arnesen, C. E., Karlsbakk, E. and Nylund, A. (2011). Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(1), 41-57.
- Nylund A, Røed M, Blindheim S, Trösse C, Andersen L (2021) Experimental challenge of Atlantic salmon *Salmo salar* using clones of *Paramoeba perurans*, *P. pemaquidensis* and *Tetramitus* sp.. Dis Aquat Org 145:1-13. <https://doi.org/10.3354/dao03597>.
- Pietrak, M. R., Molloy, S. D., Bouchard, D. A., Singer, J. T. and Bricknell, I. (2012). Potential role of *Mytilus edulis* in modulating the infectious pressure of *Vibrio anguillarum* 02 beta on an integrated multi-trophic aquaculture farm. *Aquaculture*, 326, 36-39
- Plarre H, Nylund A, Karlsen M, Brevik Ø, Sæther PA, Vike S. (2012). Evolution of Infectious Salmon Anaemia virus (ISAV). Arch Virol 157: 2309-2326.
- Røed M (2016). Eksperimentell smitte med *Paramoeba perurans* og AGD utvikling hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L). En komparativ studie av virulens hos klonede isolater av *P. perurans*. Master Thesis, Department of Biology, Univeristy of Bergen.
- Sakai & Tager. Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. Biochim Biophys Acta. 2013 Jul;1832(7):911-21. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.03.001. Epub 2013 Mar 14.
- Småge SB, Frisch K, Brevik ØJ, Watanabe K, Nylund A (2016). First isolation, identification and characterization of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture* 464: 178 – 184.
- Steinum T, Kvellestad A, Colquhoun DJ, Heum M, Mohammad S, Nygaard Grøntvedt R, Falk K (2010). Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. Dis Aquat Org 91: 201 – 211.
- Steinum T, Kvellestad A, Rønneberg LB, Nilsen H, Asheim A, Fjell K, Nygård SMR, Olsen AB, Dale OB (2008). First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. J Fis Dis 31: 205 – 214.
- Sveen S, Øverland H, Karlsbakk E, Nylund A (2012). *Paranucleospora theridion* (Microsporidia) infection dynamics in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* put to sea in spring and autumn. Dis Aquat Org 101: 43 – 49.
- Tan, C. K. F., Nowak, B. F. and Hodson, S. L. (2002). Biofouling as a reservoir of *Neoparamoeba pemaquidensis* (Page, 1970), the causative agent of amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 210 (1-4), 49-58.
- Toenshoff ERN Kvellestad A, Mitchell SO, Steinum T, Falk K. Colquhoun DJ, Horn M (2012). A novel betaproteobacterial agent of gill epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Plos ONE 7(3): e32696, doi:10.1371/journal.pone.0032696.

Todal, J. A., Karlsbakk, E., Isaksen, T. E., Plarre, H., Urawa, S., Mouton, A., Hoel, E., Koren, C. and Nylund, A. (2004). *Ichthyobodo necator* (Kinetoplastida) - a complex of sibling species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 9-16.

Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):524-9.

8. Leveranser

Resultatene fra prosjektet vil bli formidlet til det internasjonale/nasjonale vitenskapelig miljø, forvaltning og industri via deltakelse og presentasjoner på nasjonale og internasjonale konferanser, personlige kontakter, vitenskapelige og populærvitenskapelige publikasjoner. Utbruddet av Covid19 har imidlertid hatt en negativ innvirkning på formidling via møter, seminarer og konferanser.

Manuskripter til vitenskapelige publikasjoner

Benjamin G. J. Clokie; Ahmed Elsheshtawy; Amaya Albalat; Allan Beveridge; Are Nylund; Simon MacKenzie (in press). *Optimisation of a non-invasive sampling method provides robust, reproducible characterisation for low biomass samples collected from the fish gill for microbiome analysis*. American Society for Microbiology

Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie , Amaya Albalat , Elisabeth Napsøy, Are Nylund , Trond Einar Isaksen, Linda Andersen, Allan Beveridge, Simon MacKenzie (Submitted). *Understanding the impact of net cleaning upon Atlantic salmon and rainbow trout gill health*.

Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie , Amaya Albalat , Birgit Kvåle, Are Nylund , Trond Einar Isaksen, Linda Andersen, Allan Beveridge, Simon MacKenzie (in prep.) *Understanding the impact of thermal delousing on the Atlantic salmon, *Salmo salar*, gill health*.

Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie , Amaya Albalat , Søgne Wiik, Are Nylund , Trond Einar Isaksen, Linda Andersen, Allan Beveridge, Simon MacKenzie (in prep.). *Understanding the impact of AGD and its treatment on Atlantic salmon, *Salmo salar*, gill health*.

Ahmed Elsheshtawy, Benjamin Gregory James Clokie , Amaya Albalat , Are Nylund , Linda Andersen, and Simon MacKenzie. (in prep.) *Amoebic gill disease: overview of the current knowledge in academia and state of the art in the industry*.

Dr.grader

Ahmed Elsheshtawy (PhD-student ved University of Stirling).

Masteroppgaver

Kvåle BL (2020). Effekt av termisk avlusing på gjellehelse hos laks: Hos patogenfri laks og i kommersiell produksjon på Vestlandet. Masteroppgave, Universitetet i Bergen, BIO. Pp: 115. <https://hdl.handle.net/1956/22549>.

Napsøy E (2020). Effekt av ulike notbehandlingsmetodar på fiskens gjellehelse. Masteroppgave, Universitetet i Bergen, BIO. Pp: 116.

Wiik S (2020). Effekt av ferskvannsbehandling på gjeller hjå laks (*Salmo salar* L.) med amøbegjellesjukdom (AGD): gjellepatologi, prevalens og tettleik av *Paramoeba perurans*. Masteroppgave, Universitetet i Bergen, BIO. Pp: 107. <https://hdl.handle.net/1956/22929>.

Lyng PL (2021). *Paramoeba perurans* and AGD in Norwegian aquaculture: effect of freshwater treatment against AGD on gill health in commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and experimental testing of virulence of *Paramoeba perurans*. Master thesis, University of Bergen. <https://hdl.handle.net/11250/2761223>.

Gjerde O (2022). Mechanical delousing using cooled freshwater and Thermolicer and AGD treatment using freshwater. Effect on gill health. Master thesis, University of Bergen (leveres: November 2022. Materiale innsamlet i 2021).

Johansen AN (2023). Mekanisk avlusing ved bruk av ferskvann og Thermolicer. Behandlingens effekt på gjellehelse. Masteroppgave, Universitetet i Bergen (leveres: 1 juni 2023. Materiale innsamlet i 2022).

Populærvitenskapelige publikasjoner

Kvåle BL, Nylund A, Andersen L (2021) Effekt av termisk avlusing på gjellehelse hos laks. Norsk Fiskeoppdrett: - hos patogenfri laks og laks i kommersiell produksjon på Vestlandet. Norsk Fiskeoppdrett Nr 5, 32 – 38.

Formidling

Foredrag (presentasjon av arbeidspakkene) gitt på møtene med næringsaktører, referansegruppe, observatør fra FHF, og prosjektgruppe (sendt aktørene 30.10.2018).

Møte med prosjektgruppen 2019.06.12 for gjennomgang av framdriftsrapporten. Bergen.

Møte med prosjekt- og referansegruppe 24. september 2019, Bergen. Gjennomgang av foreløpige data fra prosjektet.

Møte med prosjekt- og referansegruppe 09. september 2020, Bergen (Zoom). Gjennomgang av foreløpige data fra prosjektet.

Møte i prosjektgruppe 27. november 2020 (Zoom).

Isaksen T (2022). Notgroe og Fiskehelse. Foredrag for næringsaktører. Bergen (25.05.2022).

Rapporter

Framdriftsrapport til FHF 26.06.2018.

Rapport, datert 23.10.2018, fra møtene med næringsaktører, referansegruppe og prosjektgruppe (sendt 30.10.2018 til FHF og medlemmene av referanse- og prosjektgruppe).

Fremdriftsrapport til FHF 20.12.2018.

Fremdriftsrapport til FHF 26.06.2019.

Fremdriftsrapport til FHF 20.12.2019.

Fremdriftsrapport til FHF 30.06.2020.

Framdriftsrapport til FHF 22.12.2020.

Framdriftsrapport til FHF 25.06.2021

Framdriftsrapport til FHF 17.12.2021

Faglig sluttrapport til FHF 20.06.2022