

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Department of Basic Sciences and Aquatic
Medicine, Faculty of Veterinary Medicine,
Norwegian University of Life Sciences,
Oslo, Norway

Prosjektoppgave 2019, 40 stp.
Veterinærhøgskolen

Metode for kartlegging av den fototaktiske svømmeresponsen til *Lepeophtheirus salmonis*

Method for investigating the phototactic
swimming behavior of the marine copepod
Lepeophtheirus salmonis

Jørgen Andreas Åm Vatn – Kull 2013

Veiledere: Øystein Evensen (NMBU) og Anna Solvang Båtnes (NTNU)

Forord

Denne prosjektoppgaven har vært en spennende, utfordrende og ikke minst lærerik avslutning på en givende studietilværelse her på Adamstuen. Prosjektet som sådan startet for to år siden, hvor en naiv veterinærstudent på ekskursjon til Frøya fikk en enkel idé, som så skulle spire til et fullskala forskningsprosjekt. Å drive dette prosjektet har vært et stort privilegium, og hadde naturligvis ikke gått uten det solide teamet jeg har vært så heldig å ha rundt meg. Først vil jeg gjerne takke min veileder professor Øystein Evensen (NMBU) og professor Asgeir Sørensen (NTNU), som ga dette prosjektet ben å stå på da idéen ble presentert for snaue to år siden. Engasjementet fra disse to dannet grunnlaget som har gjort det mulig å gjennomføre et så tverrfaglig og innovativt prosjekt. I innledende fase av prosjektet var jeg også så heldig og få kontakt med Arne Ruud og Bjørn Skjævestad fra VESO. Dette sikret eksternt finansiering til prosjektet, men kanskje enda viktigere har dette samarbeidet bragt med seg nyttige idéutvekslinger og gode råd underveis. Jeg håper dette samarbeidet vil kunne fortsette, også i fremtiden.

Etterhvert som prosjektet tok form fikk det flere og flere deltagere og det er mange jeg ønsker å takk. Først av alle disse vil jeg nevne min biveileder Anna Båtnes. Hennes faglige engasjement, rådgivning og dedikerte veiledning gjennom dette prosjektet har vært beundringsverdig! En stor takk også til Cecilie Miljeteig og Dag Altin - deres biologiske kompetanse og store engasjement har vært essensielt for gjennomføringen av denne studien. Jeg vil også rette en takk til de fire studentene som har vært med å gjøre dette prosjektet mulig: Maria Solstad, Live Bjørnstad og Mads Kjeldsberg fra marin teknikk ved NTNU, samt Elisabeth Børset fra matematiske fag, også ved NTNU. Deres iherdige innsats og faglige kompetanse har vært både inspirerende og lærerik, og jeg ønsker dere masse lykke til med innspurten på masteroppgavene og i jobbene som venter. Takk også til Task force lakselus ved NTNU og Aqua Research Group ved NMBU-Veterinærhøgskolen for det gode samarbeidet.

Avslutningsvis vil jeg gi en varm takk til mine foreldre Gunhild Åm Vatn og Jørn Vatn, som i denne prosessen har bistått med hjelpsomme og oppmuntrende råd, både av faglig og personlig karakter. Takk også til Astrid Lien (Horsegraphics) og Jan Egil Lütcherath for hjelp med alt fra logoer til presentasjoner. Og helt til slutt, den største takken av alle vil jeg gi til min kone og beste venn Christine. Ingen inspirerer og motiverer meg mer enn du. Tusen takk for en fantastisk studietid, nå venter et nytt og spennende kapittel!

Sammendrag

Denne oppgaven inngår i et større studium for å designe og utforme en metode, med et tilhørende forsøksoppsett, for å kartlegge den fototaktiske svømmeresponsen til kopepodittstadiet til *Lepeophtheirus salmonis*. Vi har spesifikt sett på effekten av ulike bølgebånd, intensiteter og pulseringsintervaller av lys, og kartlagt dette ved hjelp av maskinsynsalgoritmer og avanserte statistiske metoder. Oppgaven diskuterer grundig utviklingen av metoden brukt i forsøkene og presenterer deler av de preliminare resultatene for å validere metoden. De kybernetiske og statistiske metodene blir presentert i separate masteroppgaver.

Under forsøkene ble kopepoditter overført til et glassakvarium, hvor infrarøde lyskastere synliggjorde kopepodittene som så ble avbildet. Forsøkene ble utført i absolutt mørke, hvor en lyskilde ble plassert i ene enden av akvariet og denne sendte ulike lysstimuli inn mot kopepodittene. Bildene fra forsøkene ble tolket ved hjelp av deteksjons- og sporingsalgoritmer, før de ble analysert ved hjelp av ulike statistiske modeller.

Denne metoden lar oss nå studere fototaktisk respons hos kopepoditter, på en mye mer nyansert måte enn gjort tidligere. I tillegg til at vi nå kan studere hvor stor andel av en populasjon med kopepoditter som forflytter seg mot en lyskilde, kan denne metoden brukes for å studere individuelle fototaktiske responser ved hjelp av maskinsynsalgoritmer.

Summary

As part of a larger study, the objective of this thesis was to develop and make use of a method, with an associated experimental set-up, to quantify the phototactic swimming behavior of the copepod stage of *Lepeophtheirus salmonis*. In this study we specifically looked at the effect of various wave bands, intensities and pulsation ranges of light, and mapped it using machine vision algorithms and advanced statistical methods. This thesis thoroughly discusses the development of the method used in the experiments and presents part of the preliminary results of the trials, as to validate the method. The cybernetic and statistical methods are presented in separate master's theses.

During the preliminary tests, copepods were transferred to a glass aquarium, where infrared lamps were used to visualize the copepods on the images taken during the experiments. The experiments were carried out in absolute darkness, where a light source was placed at one end of the aquarium and sent various light stimuli towards the copepods. The images from the experiments were interpreted using detection and tracking algorithms before they were analyzed using various statistical models.

The method developed in this thesis now allows us to study the phototactic response of copepods in a much more nuanced manner than previously done. In addition to study the migration of copepods towards a light source, this method enables us to study the individual phototactic responses using machine vision algorithms.

Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i>	3
<i>Sammendrag</i>	4
1. Introduksjon	7
1.1 <i>Bakgrunn</i>	7
1.2 <i>Tidligere forskning</i>	8
1.2.1 <i>Lepeophtheirus salmonis</i>	9
1.2.2 <i>Parasitt/vertsforhold</i>	11
1.3 <i>Problemstilling og forskningsspørsmål</i>	14
2. Materiale og metode	16
2.1 <i>Materiale</i>	16
2.1.1 <i>Populasjon</i>	16
2.1.2 <i>Forsøksoppsettet</i>	17
2.2 <i>Metode</i>	21
2.2.1 <i>Pilotstudiene</i>	21
2.2.2 <i>Deteksjonsforsøk</i>	23
2.2.3 <i>Sporingsforsøk</i>	25
3. Resultater	27
3.1 <i>Pilotforsøk</i>	27
3.2 <i>Deteksjonsforsøk</i>	29
3.3 <i>Sporingsforsøk</i>	32
4. Diskusjon	34
4.1 <i>Justering av forsøksoppsett</i>	34
4.2 <i>Tolkning av resultater</i>	36
4.3 <i>Pålitelighet og gyldighet</i>	38
4.4 <i>Oppsummering og konklusjon</i>	42
5. Referanser:	44
Vedlegg A - Begreper og metodisk grunnlag	47
A.1 <i>Begrepsavklaring</i>	47
A.2 <i>Statistisk forsøksplanlegging</i>	48
A.3 <i>Bildegjenkjenning</i>	49
A.4 <i>Statistiske metoder</i>	51
Vedlegg B - Prosjektbeskrivelse Profylax	54
Vedlegg C - FOTS-godkjenning	55

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn

I dag utgjør oppdrettsnæringen en av de viktigste eksportnæringene i Norge, sammen med olje/gass og maritim industri. I 2017 ble det omsatt 1 303 695 tonn laksefisk i Norge (Statistisk sentralbyrå, 2018), og etter regjeringens handlingsplan er det fremmet ønske om å femdoble denne produksjonen innen 2050 (Stortinget, 2015). Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er det største hinderet for at en slik økning skal kunne finne sted. Ifølge Veterinærinstituttet utgjør lakselus i dag den største helse- og velferdsmessige utfordringen i norsk oppdrettssammenheng (Helgesen & Qviller, 2019) og tall fra Norges Handelshøyskole antyder at oppdrettere i Norge taper omlag 4.40 kr/kg fisk i tapt eller redusert biomasse (Berle & RIm, 2018). I tillegg til de omfattende kostnadene for næringen og den reduserte dyrevelferden for oppdrettsfisken, utgjør lakselus også en trussel mot vill laksefisk i Norge (Torrissen et al., 2013).

Lakselus er en naturlig forekommende ektoparasitt i norske farvann, men som Torrissen og hans kolleger (2013) påpeker, medfører den intensive driften gode vekstvilkår for lakselusbestanden, året rundt. Den økende trusselen mot villfiskstammene har lagt grunnlaget for det mye omdiskuterte «Trafikklyssystemet» (Nicholl, 2017), hvor dødelighet hos ville salmonider i norske farvann monitoreres og legger et grunnlag for vurderingen av videre vekstutvikling i de ulike produksjonsområdene (Produksjonsområdeforskriften, 2017). Denne reguleringsmodellen har lagt et stort press på den norske oppdrettsnæringen og har ført til mange nye tentative løsninger på «lakselusproblemet». Disse løsningene utgjør en del av næringens «Integrated Pest Management» og kan deles inn i forebyggende og behandlende tiltak. Forebyggende tiltak mot lakselus belager seg på å hindre påslag av lus, ved bruk av for eksempel luseskjørt, snorkelmerder, påslagsreducerende fôr, vaksiner, rensefisk og lukkede anlegg. Med unntak av vaksiner er dette ikke-invasive metoder, men det er foreløpig ikke blitt dokumentert fulldekkende effekt for noen av disse metodene. Dessuten bringer flere av metodene med seg ulike problemer, som redusert vanngjennomstrømning i merder med skjørt (Stien et al., 2012), høye fôrkostnader, etiske dilemmaer ved høyt forbruk av rensefisk og potensielt sårbart vannmiljø i lukkede anlegg (Kristensen, Åtland, Rosten, Urke & Rosseland, 2009). Behandlende tiltak kan deles inn i ikke-medikamentell (IMM) og medikamentell behandling. IMM kan igjen deles inn i mekanisk og ikke-mekanisk avlusning. Eksempler på

mekanisk avlusning er varmtvannsbehandling, spyling og børsting, hvor man for noen av metodene ser økt risiko for skader og svekket dyrevelferd (Poppe, Dalum, Røislien, Nordgreen & Helgesen, 2018). En av de vanligste ikke-mekaniske avlusningene er bruk av ferskvann, hvor laksens toleranse for ferskvann overgår lusas. Men også her må gevinst veies opp mot kostnad og velferd, ettersom ferskvann også kan ha negative konsekvenser for fysiologien til den smoltifiserte laksen (Powell, Reynolds & Kristensen, 2015). Medikamentelle metoder har de siste årene vært mye omdiskutert, ettersom lus har utviklet økt toleranse og resistens mot flere av de tidligere brukte substansene (Aaen, Helgesen, Bakke, Kaur & Horsberg, 2015), og noen av substansene dessuten kan gi negative effekter på omkringliggende naturressurser (Urbina, Cumillaf, Paschke & Gebauer, 2018).

Den store etterspørselen etter et effektivt behandlingsregime mot lakselus som også ivaretar helse og god dyrevelferd, har lagt et solid innovasjonsgrunnlag, med mange ulike aktører. Mange av disse aktørene kommer fra ulike «tekniske» fagfelt og har viktig industriell kompetanse, men ofte ser man at kunnskap om helse, velferd og bærekraft ikke er tilstrekkelig. Lakselus utgjør i dag et komplekst problem og krever derfor en sammensatt fagkompetanse, som ivaretar flere aspekter og hensyn. Derfor har jeg, som veterinærstudent, gjennom Profylax-prosjektet (se *vedlegg B*) lagt stor vekt på et tverrfaglig samarbeid hvor vi har hentet inn fagkompetanse fra ulike fagfelt som ivaretar de tekniske, men også de velferdsmessige hensyn. Vår tilnærming til en supplerende forebyggende metode var opprinnelig å bruke avansert robotteknologi for å tiltrekke, villede og fange lakselus, ved hjelp av ulike attraktanter. Å utvikle den type robotteknologi krever mer tid og ressurser enn det vi hadde tilgjengelig for dette prosjektet, og fokuset har derfor spisset seg mot å finne en passende attraktant, som senere kan implementeres i et forebyggende behandlingsregime. Dette arbeidet er gjort via systematisk litteratursøk, metodeutvikling og ulike laboratorieforsøk.

1.2 Tidligere forskning

Ettersom dette prosjektet har fokusert på å finne en signifikant effektiv attraktant, har en viktig del av arbeidet vært å sette seg inn i «state of the art»-kunnskap om lakselusas infektive stadium og dets biologi. Dette kapittelet vil derfor innledningsvis belyse de viktigste hovedtrekkene fra litteraturen om de ulike utviklingsstadiene og livssyklusen til lakselus. For å kunne forstå og etterhvert kontrollere lakselus i oppdrettsnæringen er det også nødvendig å ha kjennskap til hvordan parasitten finner en passende vert, utvikler seg, formerer seg og starter syklusen på nytt ved å finne en ny vert. Overordnet og enkelt forklart kan man dele opp parasitters vertslokalisasjon i to grupper: Ektoparasitter som må finne en passende vert og endoparasitter

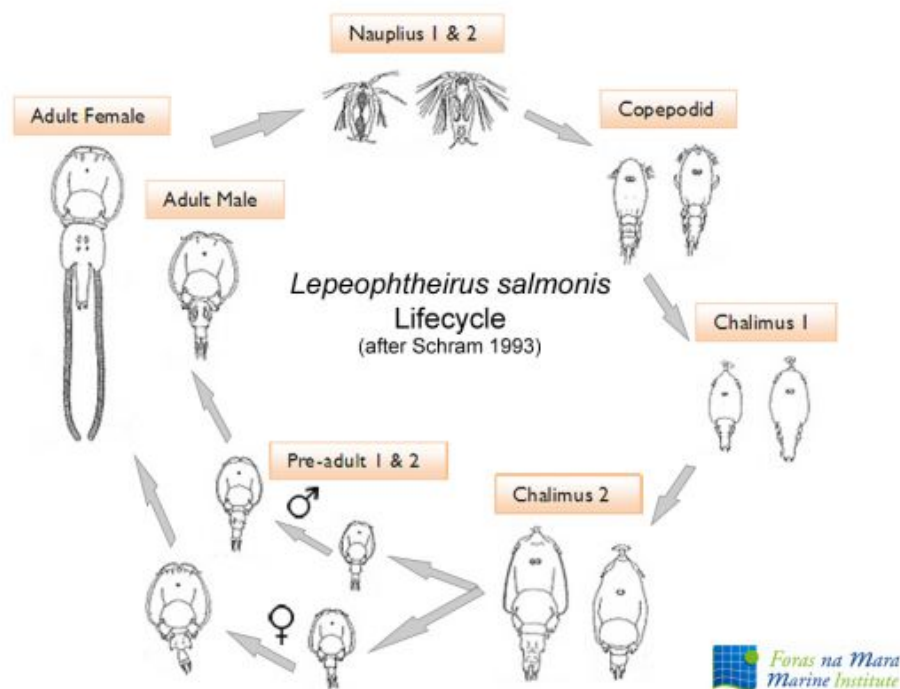
som må bli funnet av en passende vert. Ettersom lakselus er en marin ektoparasitt i et miljø med lav vert/miljø-ratio er det veldig lav sannsynlighet for å tilfeldig støte på salmonider i de store vannmassene. De er derfor avhengige av et velutviklet sanseapparat og sikre tegn fra den verten de ønsker å infisere. Derfor vil det også bli gitt et sammendrag av relevant litteratur om morfologi og parasitt-/vertforhold mellom lakselus og atlantehavslaks (*Salmo salar* L.) i dette kapittelet.

1.2.1 *Lepeophtheirus salmonis*

Livssyklus

Lakselus er et krepsdyr, en marin ektoparasitt innunder klassen hoppekreps, som tilhører familien *Caligidae* (Gjerde, 2011). Livssyklusen til lakselusa (se Figur 1), består i likhet med flere andre kopepoder av åtte stadier: to planktoniske naupliestadier og seks post-naupliske stadier, med ett skallskifte mellom hvert utviklingsstadium (Hamre et al., 2013). Det første naupliestadiet klekker fra befruktede eggstrenger, og sjøtemperaturen vil være avgjørende for hvor lang tid de befruktede eggstrengene bruker på å klekke (Heuch, Nordgreen & Schram, 2000). Boxaspen og Næss fant i sin studie at befruktede egg bruker $8,7 \pm 0,1$ dager på å klekke ved konstant temperatur på 10°C (Boxaspen & Næss, 2000). De planktoniske stadiene, Nauplius 1 og 2, er fritt svømmende og livnærer seg av de medfødte plommesekkreservene (Tucker, Sommerville & Wootten, 2000), før de utvikler seg til infektive kopepoditter (Hamre et al., 2013). Kopepodittene livnærer seg også av energireservene fram til påslag, og det er essensielt for kopepodittene at de finner seg en passende vert så fort som mulig. Det er vist at overlevelsesraten hos eldre kopepoditter (7 days post moulting (dpm)) forblir den som hos nylig utviklede kopepoditter (3 dpm), men ifølge Tucker et al. (2000) ser man en signifikant nedgang (36%) i påslagsprosenten hos de eldre kopepodittene.

Når kopepodittene finner en passende vert starter påslagsprosessen, som er delt inn i tre faser: Søkefasen, den primære påslagsfasen og den sekundære filament-påslagsfasen (Bron, Sommerville, Jones & Rae, 1991). I smitteforsøkene utført av Bron et al. (1991) så de at kopepodittene i søkefasen lager en reversibel tilhefting til verten, og om verten er tilfredsstillende, kan kopepodittene forankre tilheftingen ytterligere ved å penetrere fiskens epidermis med en av sine to antenner. I den siste fasen lager kopepodittene en permanent tilheftning til verten ved å produsere et frontalfilament, festet til fiskens dypere epitelstrukturer, mellom basalmembranen og epitelcellene. Like etter påslaget gjennomgår kopepodittene et nytt skallskifte, og går over til chalimus I (Bron et al., 1991).



Figur 1: Livssyklusen til *L. salmonis*. Figuren er utarbeidet av Schram 1993 og adaptert fra The Marine Institute of Galtway. (Marine Institute Foras na Mara, 2019)

Det var tidligere anerkjent at lakselusa hadde fire chalimusstadier (Ch. I-IV) på grunn av de signifikante størrelsesforskjellene mellom chalimus I og II, og mellom chalimus III og IV, men i 2013 fant Hamre et al. i sine studier evidens for at det kun forekom ett skallskifte mellom chalimus I og antatte chalimus IV, og at man derfor kunne konkludere med at lakselusa kun har to chalimusstadier (Hamre et al., 2013). Før lusa blir en ferdig utviklet adult, har begge kjønn to pre-adult-stadier. Disse stadiene er bevegelige, og er ofte lokalisert på områder med lite skjell, som på hode, nakke og bakover på ryggpartiet. I de kjønnsmodne stadiene lever de av både epitelceller, blod og vevsvæsker (slim og ekstracellulærvæske), noe som fører til økt slimproduksjon hos verten, slik at sterkt affiserte områder blir grålige. Ved kraftige infeksjoner kan lusa spise seg gjennom epitellaget og lage store erosjonsområder på laksens nakkeparti. Om disse erosjonsområdene blir av betydelig størrelse, kan dette føre til at laksen får problemer med den osmotiske reguleringen, taper protein og magrer av (Gjerde, 2011).

Morfologi

Kopepodittstadiet er det infektive stadiet av lakselusa, og det er derfor viktig for parasitten at den innen kort tid kan lokalisere en passende vert. De ulike morfologiske strukturene kopepodittene bruker for å lokalisere og bestemme seg for en vert er nøye studert, ved hjelp av både lys- og elektronmikroskopi. I tidligere studier (Bron, Sommerville & Rae, 1993) tar forfatterne for seg strukturer som antennen, øynene og hudorganet til kopepodittene. Det primære sanseorganet til kopepodittene er antennen. Det er en stor og godt innervert struktur, bestående av et basalsegment med flere forgreinede børstestrukturer. Disse strukturene er ifølge Bron et al. (1993) både mekanosensoriske og kjemosensoriske, og spiller en viktig rolle i deteksjon av vannstrøm, vibrasjon og kjemiske stimuli fra omgivelsene.

«Øynene» til kopepodittene består av et par ocelli dorsalt på dyret, og et enkelt ocellus ventralt. De dorsale øyestrukturer består av en stor linse omgitt av retinalceller, mens den ventrale strukturen mangler linse, men har til gjengjeld flere retinalceller. Både den dorsale og den ventrale strukturen har et utviklet lag av tapetalceller. Bron et al. (1993) forklarer videre at kombinasjonen av linsene i de dorsale strukturene, retinalcellene og tapetallaget tyder på at kopepodittene evner å fange opp lys, og muligens også skygger. De dorsale ocelliene dekker det anterodorsale synsfeltet, mens det ventrale ocelluset fanger opp lysstimuli fra bak og under dyret (Bron et al., 1993). Hudstrukturene er de siste strukturene beskrevet i dette kapittelet, og de består hovedsakelig av flere mekanoreseptorer, lokalisert bilateralt og dorsalt på cephalothorax og den kaudale delen av kopepoditten. Disse hårlignende strukturene, kalt «sensilla», er trolig avgjørende for å fange opp ulike vibrasjoner og strømminger i vannet. I tillegg til sensilla er den dorsale overflaten dekket med ulike porer som trolig kan spille en videre rolle i å determinere hvorvidt verten er passende (Bron et al., 1993).

1.2.2 Parasitt/vertsforhold

Det er gjort flere studier av hvilke attraktanter lakselus bruker for å lokalisere sin vert (Mordue Luntz & Birkett, 2009). Her vil noen av de ulike «indikatorattraktantene» kopepodittene bruker for å lokalisere sin vert bli presentert, men med bakgrunn i Profylax-prosjektet og for relevansen i denne oppgaven vil det bli lagt mest vekt på lys som attraktant.

Semiokjemiske signaler

Vertslokalisering hos kopepodittene er trolig en kompleks prosess, hvor flere signaler og stimuli spiller en viktig rolle (Mordue Luntz & Birkett, 2009). I Mordue Luntz og Birketts review-artikkel blir semiokjemiske signaler («semiochemical cues») nevnt som en av de viktige attraktantene for kopepoditter, og Bailey et al. har presentert bevis for dette (Bailey et al., 2006). Her ble det undersøkt hvordan kopepoditter responderte på laksekondisjonert vann ved hjelp av en Y-tube. Vannet ble fremstilt ved å la laks svømme i et mindre kar i 24 timer med 100 liter sirkulerende kunstig fremstilt sjøvann, med ekstern tilførsel av oksygen til karet. I Y-tuben fikk kopepodittene fem minutter til å svømme opp i en av armene, og dermed bli registrert som aktive eller ikke-aktive. Ved testing med det laksekondisjonerte vannet fikk de en aktiv respons på 90%.

Oscillering

I artikkelen til Mordue Luntz og Birkett blir også strømminger, eller oscillering, i vannet nevnt som en påvirkende faktor på kopepodittenes svømmemønster (Mordue Luntz & Birkett, 2009). Dette fenomenet er beskrevet mer utdypende i Heuch og Karlsens studier (Heuch & Karlsen, 1997). Her klarte forfatterne for første gang å bevise at kopepodittene reagerer med en konstruktiv svømmebevegelse mot strømningsbevegelser som de målte foran en svømmende fisk (Heuch & Karlsen, 1997). Nesten ti år senere publiserte (Heuch, Doall & Yen, 2006) en studie, hvor de dessuten hadde målt påslag av kopepoditter på en «gummilaks» som ble dratt gjennom vannmassene.

Temperatur og salinitet

I en studie gjort av Tucker og kollegaer fant forfatterne at temperatur og salinitet kan spille en viktig rolle i både påslag og overlevelse hos kopepoditter (Tucker, Sommerville & Wootten, 2001). I studien ble det vist at temperaturer på 11.7°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) ga høyere påslag og overlevelse enn temperaturer på 7.2°C ($\pm 0.6^{\circ}\text{C}$), samt at salinitet på 34‰ ga høyere påslag og overlevelse enn vann med 24‰ salinitet (Tucker et al., 2001).

Fototaktisk respons

Det er gjort mange studier for å undersøke den fototaktiske responsen hos kopepoditter, og Bron og medarbeidere (Bron et al., 1993) viste at kopepoditter responderer forskjellig på ulike bølgelengder av synlig lys. I sine studier registrerte forfatterne en signifikant økning i respons fra 400 nm til 550 nm, og de så at denne responsen vedvarte ved bølgelengder opp til 700 nm. Bron et al. (1993) registrerte den høyeste responsen ved 550 nm og den laveste ved 400 nm.

Disse bølgelengdene ligger innenfor det spektrale refleksjonsspennet som er målt fra ulike deler av laksen. I 2004 publiserte (Browman, Boxaspen & Kuhn, 2004) en ny studie hvor de målte den spektrale refleksjonen fra laksen, både ventralt, dorsalt og kaudalt på fisken, og fant refleksjon med bølgelengde på 280-800 nm.

I 1999 gjennomførte Aarseth og Schram en studie hvor de vurderte hvilken effekt ulike bølgelengder av ultrafiolett og synlig lys hadde på kopepoditter (Aarseth & Schram, 1999). I studien ble kopepoditter plassert i en 1 meter høy beholder, med to fastmonterte lyskilder (hhv. UV-B og hvitt lys) montert 50 cm over containeren (for videre beskrivelse av forsøksoppsettet se (Heuch, 1995). Videre fant Aarseth og Schram i sin studie evidens for at kopepoditter svømmer dypere når de blir utsatt for både UV- og synlig lys, i motsetning til når de blir utsatt for utelukkende synlig lys (Aarseth & Schram, 1999). Etter en time med synlig lys hadde 91% av kopepodittene samlet seg i overflaten, like under haloklinen på 2 cm dybde. Når UV-lyset ble skrudd på, så man en reduksjon av kopepoditter i overflaten og etter en time var det bare 58% kopepoditter igjen i den øverste kvadranten (Aarseth & Schram, 1999). Disse funnene indikerer at de kan differensiere mellom synlig lys og UV-lys.

For å studere den fototaktiske responsen hos kopepoditter nærmere, gjennomførte Fields og medarbeidere (Fields, Skiftesvik & Browman, 2017) en studie hvor de blant annet ønsket å studere innvirkningen av pulsering med lys, for å simulere lysrefleksjonen fra skjellene til verten. Her konstruerte forfatterne en tårntank på 10 x 10 x 165 cm, hvor rundt 300 kopepoditter ble overført til et kammer i bunnen av tanken, og ble tilsatt via en luke ved starten av forsøket. For å detektere kopepodittene, ble tre silhuettkameraer montert over hverandre, slik at de sammen dekket hele tanken. Kopepodittene ble utsatt for fem ulike «av/på-pulseringer». Resultatene fra denne studien viser at den korteste på/av-pulseringen (1,8:0,9 s) gir den laveste responsen, med bare 24% av kopepodittene i det øverste av de tre kamerafeltene, etter en 600 sekund lang periode. Ved å doble lyslengden, men beholde mørkeperioden (3,7:0,9 s) økte prosentandelen av kopepoditter til 37% i det øverste vannlaget. Ved lengre mørkeperiode (3,7:5,5 s) økte ansamlingen ytterligere til rundt 80%, men dette ser ut til å være et tak, da lengre mørkeperiode (3,7:16,5 s) ikke ga en videre signifikant økning (Fields et al., 2017).

Det er altså funnet evidens for fototaktisk respons hos kopepoditter flere studier, men ingen av studiene har gått mer i dybden på de biologiske prosessene enn at de kun har sett på forflytning av individer, eller drift, innad i en populasjon. Flere av studiene nevnt i dette kapittelet har hentet ut et visst antall bilder i minuttet fra forsøket, hvor de manuelt eller ved hjelp av tellealgoritmer har talt opp kopepoditter og sett hvor stor andel av populasjonen som har

forflyttet seg. Denne metoden gir et godt bilde på medianforflytning mot en lyskilde, men ikke på hvordan hver enkelt lus forflytter seg i forhold til lyskilden. Aspekter som individuell svømmehastighet og målrettet fototaktisk svømmerespons mot ulike lyskilder uteblir. Vi har derfor for lite biologisk forståelse av hvordan lakselus-koepoditter finner en passende vert, og hvordan man videre kan bruke denne kunnskapen for å forebygge, redusere og kontrollere lakselus i oppdrettsnæringen.

1.3 Problemstilling og forskningsspørsmål

Målsettingen med Profylax-prosjektet var å finne en anvendbar attraktant, som kunne tiltrekke seg et signifikant antall infektive lakselus. Basert på tilgjengelig og relevant litteratur ble det innledningsvis i prosjektet gjennomført et lukt-eksperiment for å teste koepoditters tiltrekning mot ulike organbaserte preparater fra atlantisk laks. Her ble slim, hodenyre, lever og milt homogenisert og tilsatt like deler sjøvann, før de ble tilsatt i et seksjonskar sammen med lakseluskoepoditter (heretter kalt koepoditter). Dette forsøket virket først å gi tvetydige resultater, før det ble klart at koepodittene ikke gikk mot én spesifikk lukt, men fulgte lyskilden over karet. Resultatene fra dette forsøket la grunnlaget for problemstillingen til denne oppgaven: *Hvordan kan man utvikle og benytte en metode for å kvantifisere den fototaktiske svømmeresponsen hos Lepeophtheirus salmonis?* Innunder denne problemstillingen kom det fram flere konkrete aspekter ved lysrespons vi ønsket å undersøke. I denne oppgaven ønsker jeg å finne svar på hvorvidt metoden kan brukes til å besvare følgende spørsmål:

1. Hvor stor andel av studiepopulasjonen har en signifikant fototaktisk respons?
2. Hvilke terskelverdier er det for respons innad i en populasjon, for ulike bølgebånd og pulseringer?
3. Med hvor høy hastighet foregår bevegelser mot lyskilden, og hvor store individuelle forskjeller er det (heterogenitet)?
4. Hvor målrettet er studiepopulasjonens fototaktiske svømmerespons (forventning og varians i diffusjonsligningen)?

Disse forskningsspørsmålene krever en bred tverrfaglig tilnærming. Den biologiske kompetansen dekket blant deltakerne i Profylax-prosjektet sikrer god kjennskap til relevant litteratur omkring fototaktisk respons hos lakselus, og hvordan man i forsøkssammenheng skal klekke, sortere, undersøke og håndtere lakselus. I tidlig fase av prosjektet ble det klart at antall forklaringsvariabler og replikater ville generere et uoverkommelig antall forsøk. Det ble derfor

hentet inn kompetanse fra statistisk forsøksplanlegging og modellering (se vedlegg A2), for å sikre et effektivt forsøksoppsett som kunne gi svar på det vi ønsket å undersøke, samtidig som vi ivaretok validiteten til forsøkene. Forsøkene genererte store mengder data, i form av bildefiler som måtte tolkes og analyseres. For å ekstrahere informasjon fra disse dataene var vi også avhengige av ekspertise innen bildegjenkjenning og maskinsyn (vedlegg A3). Dette tillot oss i større grad å studere den individuelle fototaktiske responsen til hver enkelt lus. Når informasjonen vi var ute etter var hentet ut, måtte denne analyseres og modelleres, og vi trengte derfor også kompetanse innenfor avansert statistikk og sannsynlighetsregning (vedlegg A4).

I denne studien ble det gjennomført tre runder med forsøk: Pilotforsøk, deteksjonsforsøk og sporingsforsøk. Pilotforsøkene skulle kartlegge hvilke forklaringsvariabler det ville være interessant å undersøke. De ble analysert før deteksjons- og sporingsforsøkene startet. I pilotforsøket ble det også kjørt en sensitivitetstest av infrarødt (IR) lys for å se om kopepodittene hadde noen fototaktisk respons på det infrarøde lyset fra IR-lyskasterne. Deteksjonsforsøkene skulle se på hvor stor drift det var innad i populasjonen mot de ulike lysinnstillingene, mens sporingsforsøkene skulle se nærmere på svømmehastighet, målrettet svømmemønster og individuelle forskjeller blant kopepodittene. I både deteksjons- og sporingsforsøkene ble det testet for tre forklaringsvariabler: bølgelengde, lysstyrke (heretter: irradians) og pulsering.

I kapittel 2 blir materiale og metode for forsøkene presentert. Kapittel 2.1 vil i korte trekk ta for seg studiepopulasjonen og forsøksoppsettet, mens kapittel 2.2 vil systematisk gå gjennom metoden for pilotforsøkene, deteksjonsforsøkene og sporingsforsøkene. I kapittel 3 vil deler av resultatene fra de prelimære dataene fra disse forsøksrundene bli presentert og forklart. Avslutningsvis vil jeg i kapittel 4 diskutere justeringene knyttet til metoden, hvordan denne metoden kan besvare oppgavens forskningsspørsmål, gyldighet og pålitelighet, samt generaliserbarheten til denne metoden. Til slutt vil det bli presentert en kort oppsummering og konklusjon av denne oppgaven og prosjektet i sin helhet.

I vedlegg A ligger en oversikt over begrepsavklaringer og de statistiske og kybernetiske metodiske grunnlagene for denne studien. Vedlegg B utgjør en prosjektbeskrivelse av Profylax-prosjektet, mens vedlegg C er en godkjenning for bruk av forsøksdyr tilknyttet dette prosjektet, utstedt fra FOTS.

2. Materiale og metode

Denne studien er gjennomført med et eksperimentelt laboratoriedesign. Forsøkene ble gjennomført på et av laboratoriene til NTNU Sealab, lokalisert på Brattørkaia i Trondheim, i samarbeid med Taskforce lakselus. Laben som ble brukt er et isolert klimarom og brukes som klekkeri for lakseluslarver. Rommet er utstyrt med termostat, ferskvannsinntak, filtrert sjøvannsinntak, kjølevifte og strømuttak. Det er ingen vinduer eller noen annen lysforurensning i laben og det ble montert en lyssluse på utsiden av døren. Alle lyskilder i rommet, stikkontakter, termostater ol., ble dekket med aluminiumstape før forsøkene begynte.

2.1 Materiale

2.1.1 Populasjon

Studiepopulasjonen (forkortet: Sp) for denne studien var kopepoditter, klekket i laboratorium fra linjen *Ls Gulen* (Hamre, Glover & Nilsen, 2009). Utvalget av studiepopulasjonen ble gjort på grunnlag av ulike kriterier, hvor kun svømmedyktige kopepoditter ble selektert/brukt i forsøk. Nauplier, døde og deformerte kopepoditter, samt inaktive kopepoditter (ikke-responderende mot fysisk påvirkning) ble ekskludert fra studien. Det ble i løpet av studien brukt tre ulike undergrupper av studiepopulasjonen: Kopepoditter klekket fra NTNU - Taskforce lakselus sin lakseluskultur (Sp1), ferdigklekte kopepoditter fra ILAB (Stiftelsen Industrielaboratoriet, Bergen; Sp2) og kopepoditter klekket på NTNU sitt klekkeri (Figur 2), hvor eggstrengene kom fra ILAB (Sp3). Populasjonsutvalget brukt i de faktiske forsøkene ble sortert og selektert for hånd, ved hjelp av stereolupe og buttonert glasspipette.

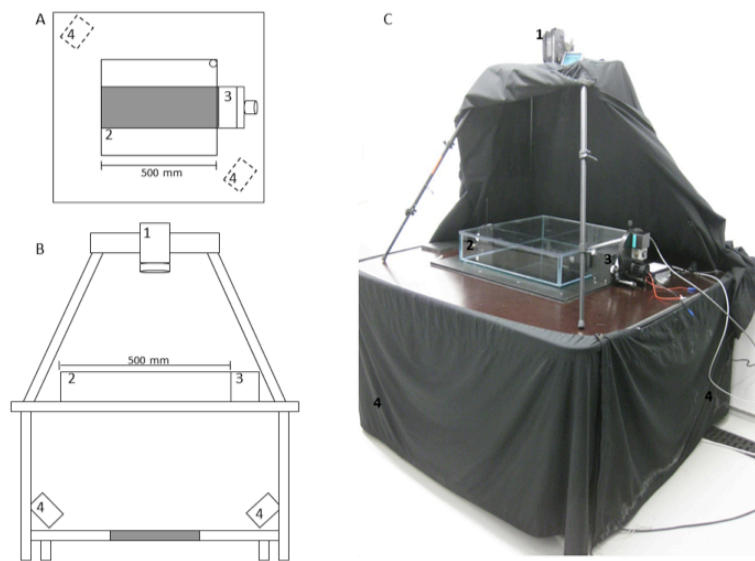


Figur 2: Lakselusklekkeri på NTNU Sealab – fire klekkestasjoner med 4x4 klekkeinkubatorer med tilførsel av filtrert sjøvann

2.1.2 Forsøksoppsettet

Utgangspunktet for forsøksoppsettet brukt i denne studien var et tidligere utviklet forsøksoppsett først brukt i en tidligere studie (Miljeteig et al., 2014) og deretter videreutviklet av Båtnes og medarbeidere (Båtnes, Miljeteig, Berge, Greenacre & Johnsen, 2015), hvor fototaktisk respons for *Calanus finmarchicus* ble undersøkt. Det vil videre bli gitt en kort beskrivelse av dette forsøksoppsettet, for mer detaljerte beskrivelser se Miljeteig et al. (2014) og Båtnes et al. (2015).

Forsøksoppsett designet og bygget av Miljeteig et al. (2014) besto av et 50 x 50 x 12 cm (BLH) stort akvarium, laget av 10 mm tykt optisk nøytralt glass. Det ble konstruert en 13 cm bred «raceway» i midten av akvariet, ved å bruke 8 mm tykke glassplater som vegger. Veggene passet ned i akvariet i så stor grad at dyr ikke kunne komme ut av racewayen, men vannet kunne likevel passere, slik at vanddybden ble lik i de tre kamrene. Lik vannhøyde på begge sidene av glasset var et reduserende tiltak mot reflekser fra de infrarøde lyskasterne som ble benyttet for å synliggjøre forsøksdyrene. I det ene hjørnet, øverst til høyre i Figur 3A, ble det boret et hull, hvor et 8 cm langt rør ble plassert for å justere vanddybden. Akvariet var plassert på et bord, med en 48 x 48 cm åpning, hvor lys fra to infrarøde lyskaster kunne lyse opp akvariet fra undersiden (Miljeteig et al., 2014).



Figur 3: Forsøksoppsettet brukt i studiene til Miljeteig et al. (2014), figur gjengitt med tillatelse. Skjematisk oversikt over forsøksoppsettet fra fugleperspektiv (A) og fra siden (B), samt et foto av forsøksoppsettet. Oppsettet var bestående av et kamera (1), pekende ned mot akvariet (2), hvor racewayen her er markert i grått, en lyskilde (3) og to infrarøde lyskaster under forsøksoppsettet (4), pekende opp mot akvariet.

Lyskilden brukt i disse forsøkene var en hvit lysdiode, festet til et datastyrt filterhjul som var montert med ulike «neutral density filters» (ND-filter), også kalt «optical density filters» (OD-filter). Dette filterhjulet var plassert foran akvariet, (Miljeteig et al., 2014). Ifølge Båtnes et al. (2015) følger OD-filtrene en logaritmisk reduksjon i lystetthet, hvor man reduserer irradiansen med 90%, for hvert filter man legger på. Filterhjulet ble montert med ni ulike filterinnstillinger (OD 1-9), hvor OD 1 tilsvarer 10%, OD 2 tilsvarer 1% osv. (Båtnes et al., 2015). For å sørge for at lysstrålene ble jevnt fordelt i racewayen ble en Fresnellinse brukt som kollimator. Denne linsen ble festet i en spesialbygd lystett boks (lyskaster), slik at lyset fra dioden gikk via OD-filteret, inn i boksen og ut gjennom Fresnellinsen til akvariet (Miljeteig et al., 2014).

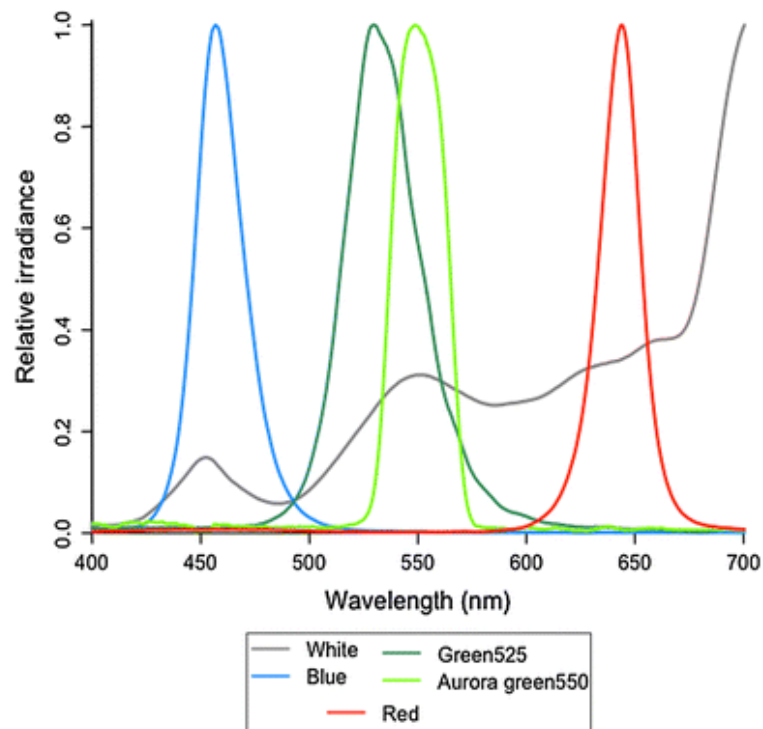
For å detektere kopepodene i akvariet og følge deres fototaktiske respons, ble det brukt et videokamera (Sony Handycam HDR-XR520-VE, Sony), som var plassert like over racewayen. Forsøket ble filmet med «high definition» (HD) i kameraets «night shot»-modus, hvor kameraet er IR-sensitivt. For å sikre en homogen bakgrunn og god kontrast til kopepodene, ble det montert en svart polyetylenplate på bakken under akvariet.

Det nye oppsettet

For pilot- og deteksjonsforsøkene ble det laget et nytt akvarium med innvendige mål på 40 x 30 x 10 cm, med to langsgående glassplater (skillevegger) 40 x 10 cm, med tykkelse på 8 mm. Skilleveggene ble montert i akvariet slik at racewayen målte 40 x 12.8 x 10 cm. Glasset i akvariet var Pilkington Optiwhite 8 mm, hvor alle plater var sveiset sammen med UV-lim og akvariesilikon. For å justere vannhøyden var det i det ene sidekammeret et 10 mm stort hull med et 40 mm høyt akrylrør, slik at vannstanden i hele karet kontinuerlig forble 40 mm. Vannet ble jevnt fordelt i de ulike kamrene ved bruk av heverter. Akvariet for sporing hadde innvendige mål på 20 x 12.8 cm x 10, uten siderom på sidene av racewayen. Også dette glasset var av Pilkington Optiwhite 8 mm, limt med UV-lim og akvariesilikon. I enden av begge racewayene ble det satt inn en matt, svart plastplate for å unngå refleksjoner fra lyskilden. Forsøksoppsettet ble kledd inn med kappe av sort stoff, som i forsøkene til Miljeteig et al. (2014).

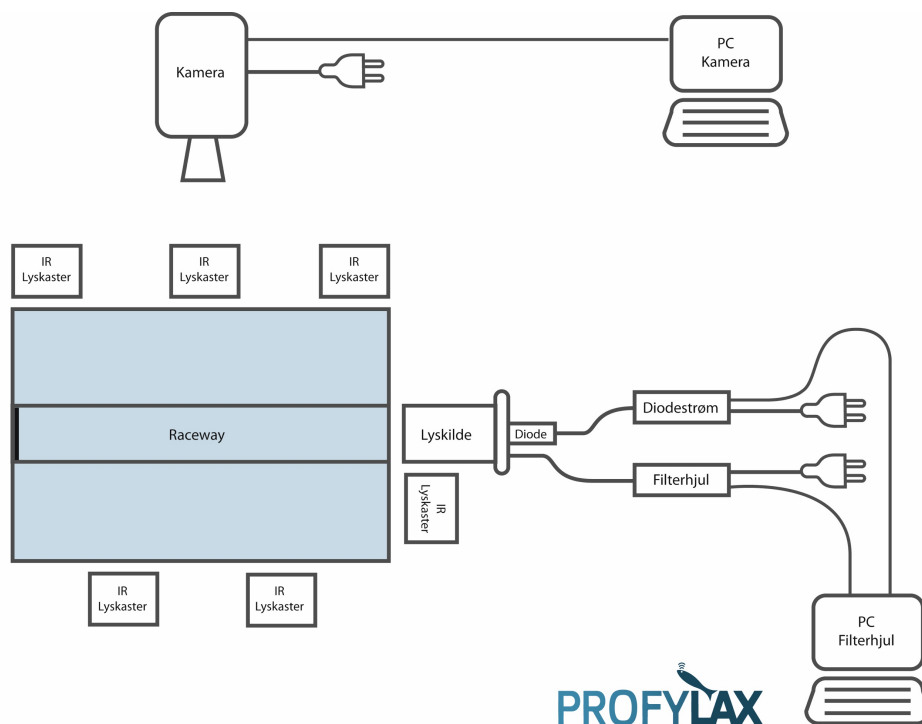
Det ble laget én bordplate til hvert akvarium, hvor akvariene ble løftet opp til samme høyde som lyskilden, og med åpning under hele akvariet slik at det infrarøde lyset fra IR-lyskasterne kunne komme opp gjennom bunnen av akvariet. Kantene på bordplaten ble skråskjært og malt med matt, svart maling, og det ble skåret ut plass til lyskilden, slik at den ene kortveggen hadde et spor på 14.6 cm. Under bordplatene ble det plassert seks infrarøde lyskastere for å lyse opp kopepodittene. Fire av disse er beskrevet i Båtnes et al. (2015) og de to siste (96 LEDS IR Illuminator Array; Tomtop) hadde peak på 850 nm. Lyskasterne ble dekket med filter som fjernet den synlige delen av spekteret (LEE Filters #87C Infrared Polyester Filter, 0 % transmisjon opp til 800 nm).

Lyskildene brukt i disse forsøkene er LED-ene brukt i Båtnes et al. (2015), hvor det i lysforsøkene ble brukt «White», «Red», «Blue» og «Green 525» (heretter Green). Relativ irradians for bølgelengde ble målt for alle diodene brukt i studien, se Figur 4.



Figur 4 Relativ spektral irradians for lyskildene brukt i Båtnes et al. (2015) sine studier. Basert på målinger fra OD 5 for alle LEDene. Hentet fra Båtnes et al. (2015), gjengitt med tillatelse.

Det ble brukt to kameraer i studien, et Sony Handycam HDR-XR520-VE (det samme kameraet som brukt i Miljeteig et al. (2014) for pilotforsøkene) og et høyhastighetskamera, Oryx 5.0 MP Mono 10GigE (Sony IMX250) for deteksjons- og sporingsforsøket. Programvaren brukt for Oryx-kameraet var Spinnaker[®] SDK (FLIR). For skjematisk oppstilling av forsøksoppsettet brukt under deteksjonsforsøkene, se Figur 5.



All rights reserved © horsegraphics 2017

Figur 5 Skjematisk oppstilling av forsøksoppsettet til deteksjonsforsøkene. «PC Filterhjul» styrer filterhjulet og diodestrømmen, mens «PC Kamera» operer kameraet som filmer deteksjonsforsøkene. «Lyskilden» består her av en diode, montert på filterhjulet som er koblet til en lystett boks med en Fresnellinse vendt inn mot akvariet. Lyskilden er her plassert på «venstre» side. I enden av racewayen er det plassert en matt, svart plastplate. Utarbeidet av © Horsegraphics 2019, gjengitt med tillatelse.

2.2 Metode

2.2.1 Pilotstudiene

Pilotforsøkene i denne studien besto av en IR-sensitivitetstest og en fargesensitivitetstest, hvor det ble kjørt tre replikat for begge forsøkene. Oppsettet brukt i både IR-sensitivitetstestene og fargesensitivitetstesten var som beskrevet i kapittel 2.1.2 (det nye oppsettet), hvor Sony Handycam HDR-XR520-kameraet fra Miljeteig et al. (2014) ble brukt. I pilotforsøkene ble det brukt fire IR-lyskastere (fra Båtnes et al. (2015)), hvor disse var plassert i hvert sitt hjørne under akvariet.

IR-sensitivitetstest

Her ble én av de fire IR-lyskasterne hentet opp fra under bordplaten og byttet ut med lyskilden. For å hindre lysforurensning under mørkeperioden/kontrollperioden ble det satt en papplate dekket med aluminiumstape mellom lyskasteren og akvariet. 210 kopepoditter (Sp1) ble sortert, talt opp og overført til en lystett isoporboks. Da forsøket skulle kjøres ble kopepodittene overført til det nye deteksjonskaret, uten lyspåvirkning. Etter overføringen ble dyrene akklimatisert i 15 minutter før filmen ble startet. Minst 15 minutter ble brukt som kontrollperiode, før platen foran IR-lyskasteren ble fjernet, og filmingen fortsatte i nye 15 minutter. Det ble kjørt tre replikat, hvor to av replikatene hadde lyskasteren vendt inn mot akvariet fra «høyre» side, og et replikat hvor lyskasteren sto på «venstre» side. Etter IR-testene ble det kjørt en positiv kontroll med White-LED (OD-innstilling 3-1).

Fargesensitivitetstest

Her ble alle fire fargene testet, Red, White, Blue og Green, med OD-innstillingene 2-7, altså 1×10^{-2} til 1×10^{-7} ufiltrert irradians for hver farge. Det ble kjørt tre replikat med lys, med lyskilden stilt fra både venstre og høyre side av racewayen. Rekkefølgen på fargene var randomisert (se Tabell 1). Protokollen for forsøket var omrøring i karet, 15 minutter akklimatisering før kameraet ble startet. Etter nye 15 minutter med kontrollperiode ble OD 7 startet. Hver OD-innstilling gikk i 8 minutter før den ble skiftet. Mellom hvert bytte av diode ble det rørt om i racewayen, for så nye 15 minutter med akklimatisering. For hver film/diode ga dette 15 minutter kontrollperiode + 8 minutter x 6 OD-innstillinger, totalt 63 minutter film/farge. Etter at alle fargene var testet ble karet tømt, vasket og fylt opp med nytt filtrert sjøvann. I replikat 1 ble kopepodittene fra IR-sensitivitetstesten brukt på nytt, mens for replikat 2 ble det plukket ut nye lus som også ble brukt i replikat 3.

Tabell 1 Liste over de ulike forsøkene gjort under fargesensitivitetstesten

Forsøk nr.	Replikat	Farge	OD	Lysplassering
1	1	White	7-2	Venstre
2	1	Red	7-2	Venstre
3	1	Blue	7-2	Venstre
4	1	Green	7-2	Venstre
5	2	Green	7-2	Høyre
6	2	Blue	7-2	Høyre
7	2	Red	7-2	Høyre
8	2	White	7-2	Høyre
9	3	Green	7-2	Høyre
10	3	Blue	7-2	Høyre
11	3	White	7-2	Høyre
12	3	Red	7-2	Høyre

2.2.2 Deteksjonsforsøk

Oppsettet for disse forsøkene (se Figur 6) var basert på oppsettet for pilotforsøkene, men med noen modifikasjoner. Lyskilden ble fastmontert med silikon, det ble brukt seks infrarøde lyskasterne, hvor alle seks ble tildekket med to lag hvit plast. Kameraet var byttet ut med Oryx-kameraet. For disse forsøkene ble det utviklet nye deteksjonsalgoritmer (se vedlegg A3)



Figur 6 Forsøksoppsettet til deteksjonsforsøkene, med lyskilde fra venstre

I forsøkene ble det bruke tre farger: White, Blue og Green, med OD 1, OD 3 og OD 5. Pulseringsintervallene brukt var P_0 (kontroll, uten pulsering), P_1 (0,1s på, 0,1s av), P_2 (2s på, 3s av) og P_3 (5s på, 5s av). For å oppnå fullstendig randomisering av alle tre forklaringsvariablene, ble alle forsøkene segmentert, slik at hvert forsøk kun testet én farge, én irradians og én pulsering. Hvert replikat, bestående av 36 forsøk, ble kjørt over to dager, med bytte av kopepoditter og vann i akvariet mellom hver forsøksdag. Det ble kjørt tre replikat. Det ble også kjørt tre replikat med IR-sensitivitetstester.

Før forsøkene begynte ble det gjennomført en *styrkeberegning* for å anslå hvor mange kopepoditter som var nødvendig i hvert forsøk. Det ble anslått at det måtte brukes minst 133 kopepoditter/forsøk for å oppnå en styrke på minst 0,95 (Børset, Pre-print). Det ble benyttet kopepoditter fra Sp2 de første tre dagene med forsøk, og kopepoditter fra Sp3 de resterende tre dagene.

Dagen før hvert forsøk ble akvariet vasket og fylt med filtrert sjøvann. Deretter ble mellom 150 og 200 kopepoditter talt opp og overført til racewayen, som så ble dekket med plastfolie. Morgen etter ble temperaturen i vannet og luften registrert, lyskilden gjort klar og IR-lyskasterne skrudd på. Når oppsettet var klart, ble det rørt om i racewayen med en ren rørepinne og kopepodittene akklimatiserte i minst x minutter. Det ble målt temperatur i akvariet både før og etter forsøkene.

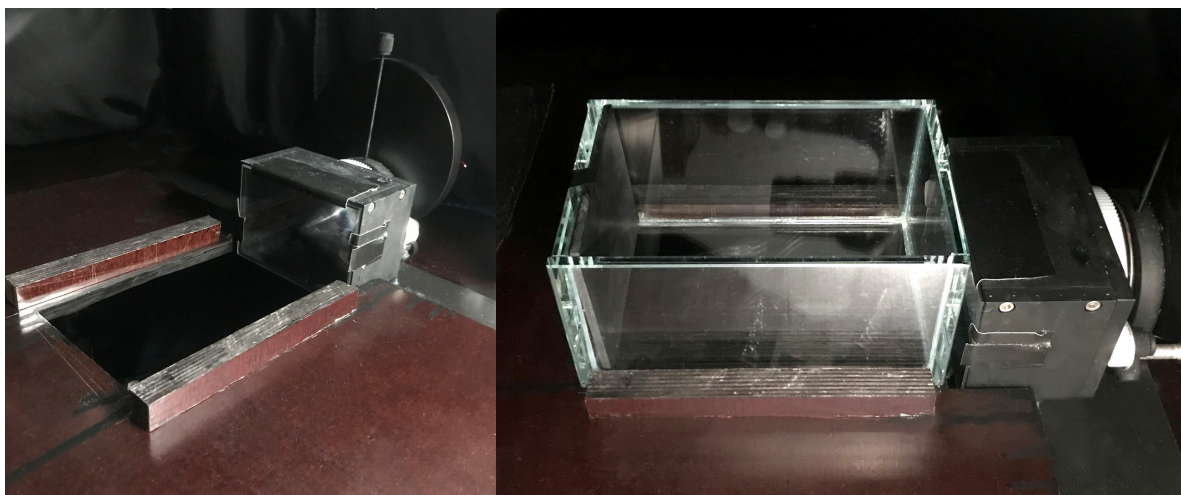
Prosedyre for hvert forsøk:

- 00:00 min – omrøring i raceway og skifte diode
- 05:00 min – starte akklimatisering
- 10:00 min – starte filmen
- 13:00 min – sette på lys
- 20:00 min – avslutte filming

Det ble filmet med 16 bilder/sekund og hvert forsøk ga ca. 9600 bilder. Etter alle forsøkene var avsluttet ble bildefilene sendt videre til bildebehandling, og senere til statistisk analyse.

2.2.3 Sporingsforsøk

For disse forsøkene ble samme forklaringsvariabler testet som ved deteksjonsforsøkene og alle variablene ble randomisert på nytt. Både akvariet og bordplaten ble byttet ut med oppsettet beskrevet for sporingsforsøkene, se også Figur 7. Kameraet ble senket ned mot akvariet slik at bare racewayen var i synsfeltet og det ble filmet med 128 bilder i sekundet. For disse forsøkene ble det i tillegg til deteksjonsalgoritmene, utviklet og brukt sporingsalgoritmer (se vedlegg A3)



Figur 7 Forsøksoppsettet til sporingsforsøkene, med lyskilde fra venstre

Dagen før hvert forsøk ble akvariet vasket og fylt med filtrert sjøvann til vannstanden målte 40 mm, før man tok ut 200 ml. Deretter ble to grupper à 12 kopepoditter (Sp3) sortert og plassert i hvert sitt begerglass med 200 ml filtrert sjøvann. Disse ble oppbevart i en lystett isoporboks over natten. På forsøksdagen ble første gruppe kopepoditter overført til karet. Etter 30 minutter ble det rørt om i karet og riktig diode ble satt inn i lyskasteren. Det ble kjørt maks 20 forsøk per gruppe, med minimum 10 min akklimering mellom hvert forsøk, og det ble byttet kopepoditter mellom hvert replikat, med minimum 30 minutter akklimering mellom replikatene. Det ble målt temperatur i akvariet både før og etter forsøkene.

Prosedyre for hvert forsøk:

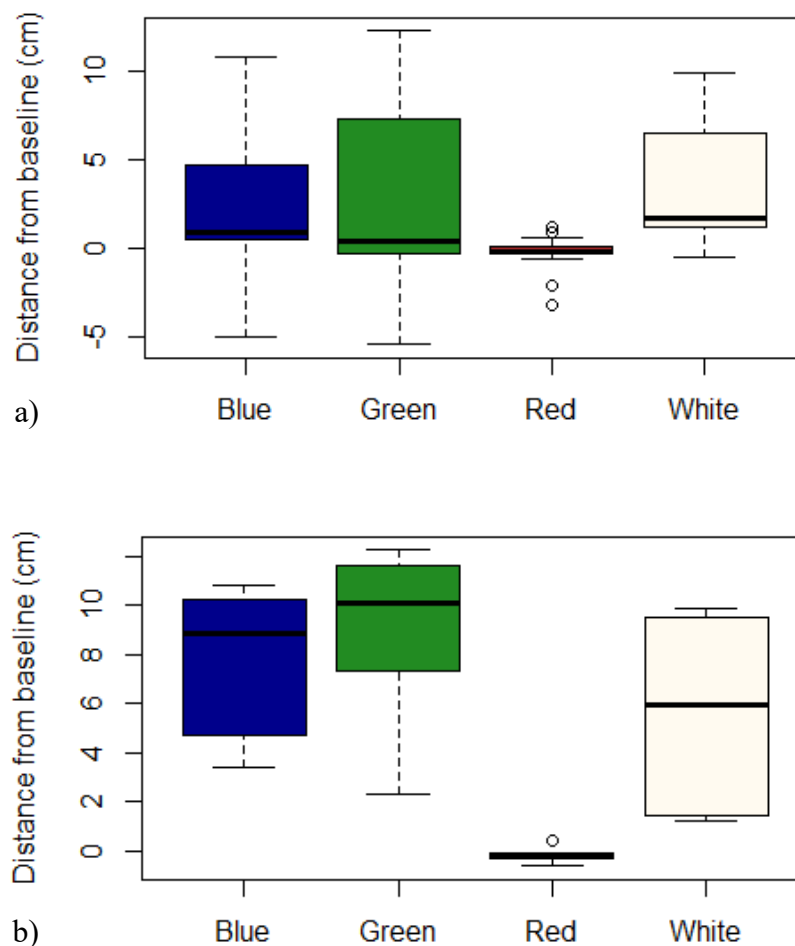
- 00:00 min – omrøring i raceway og skifte diode
- 05:00 min – starte akklimering
- 10:00 min – starte filmen
- 10:30 min – sette på lys
- 12:00 min – avslutte filming

Hvert forsøk ga ca. 15360 bilder. Etter alle forsøkene var avsluttet ble bildefilene sendt videre bildebehandling, og senere til statistisk analyse.

3. Resultater

3.1 Pilotforsøk

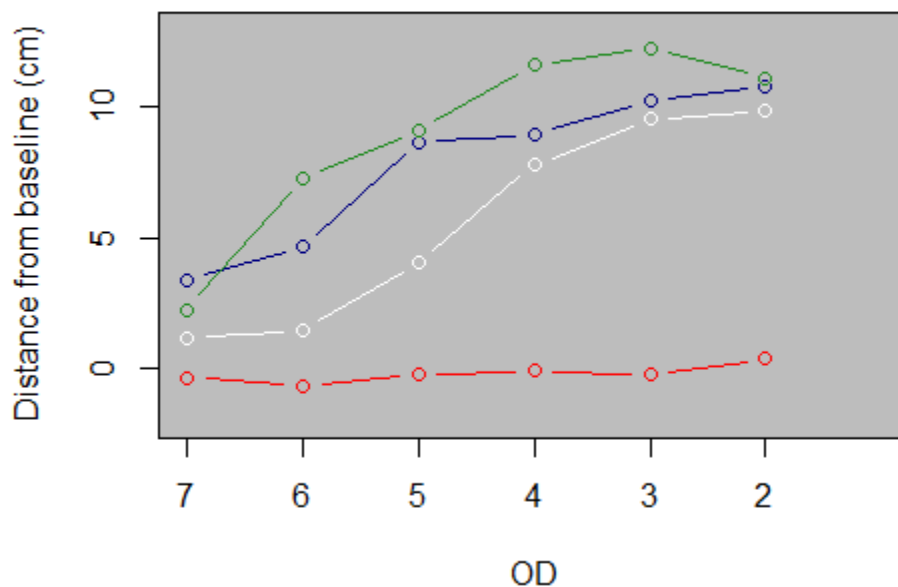
Det var stor spredning i respons mot tre av fargene: Blue, Green og White (Figur 8). Imidlertid var det tilnærmet ingen respons rettet mot Red. Selv om spredningen for Blue, Green og White var stor, var medianverdiene for alle tre replikat svært lave, i likhet med den for Red.



Figur 8: Respons som funksjon av farge, for OD-innstilling 7-2. Medianposisjonene til alle kopepodittene er hentet ut for hver OD-innstilling. I disse boksploottene representerer de svarte strekene gjennomsnittet av alle medianposisjonene for hver enkelt farge, mens de fargede boksene representerer 75% av populasjonen og de stiplede linjene er standardavviket (25%) for hver farge, for alle tre replikat X-aksen representerer fargene brukt i fargesensitivitetstesten og y-aksen er definert som avstand fra baseline, hvor 0 er satt til gjennomsnittlig posisjon til alle kopepodittene i karet før lyskilden ble satt på. Negativ verdi på y-aksen skyldes at noen kopepoditter har svømt fra lyskilden. A) for alle tre replikat, b) respons som funksjon av farge for replikat 2. Figuren utarbeidet av Elisabeth Børset, gjengiitt med tillatelse.

Etter å ha studert resultatene fra de tre replikatene ble det funnet store forskjeller mellom de ulike replikatene. Det var svært lav respons i replikat 1 og 3, mens replikat 2 viste en betydelig høyere respons for tre av fargene (Figur 8b). Det var fremdeles tilnærmet ingen respons hos kopepodittene mot Red, men for Blue og Green lå medianverdien (for OD2) for populasjonen på hhv. 9 og 10 cm forflytning fra *baseline*, og medianverdien for White (OD7-2) hadde steget til rundt 6 cm. Dette tyder på at replikat 1 og 3 avviker i stor grad fra replikat 2.

Vi ser fra Figur 9 at kopepodittenes respons mot Red (replik 2) ikke steg med økt irradians, mens for White, Green og Blue økte responsen med økende irradians. For White var det en signifikant økning (5 cm) fra OD 6-4, hvor stigningen i responsen så ut til å flate av ved OD 3. For Green var det en økning allerede ved OD 6. Økningen fortsatte fra OD 5-4, men siden flatet økningen i responsen ut, og responsen sank noe fra OD 3-2. Tendensen for Blue var noe annerledes, hvor vi så en liten økning i respons fra OD 7-6, men stor økning i respons fra OD 6-5. Generelt for White, Green og Blue så vi en økt respons mot lyskilden ved OD 5 (± 1), før responsen avtok noe for de siste OD-innstillingene, trolig grunnet at de individene som hadde respondert allerede hadde nådd lyskilden i enden av racewayen.

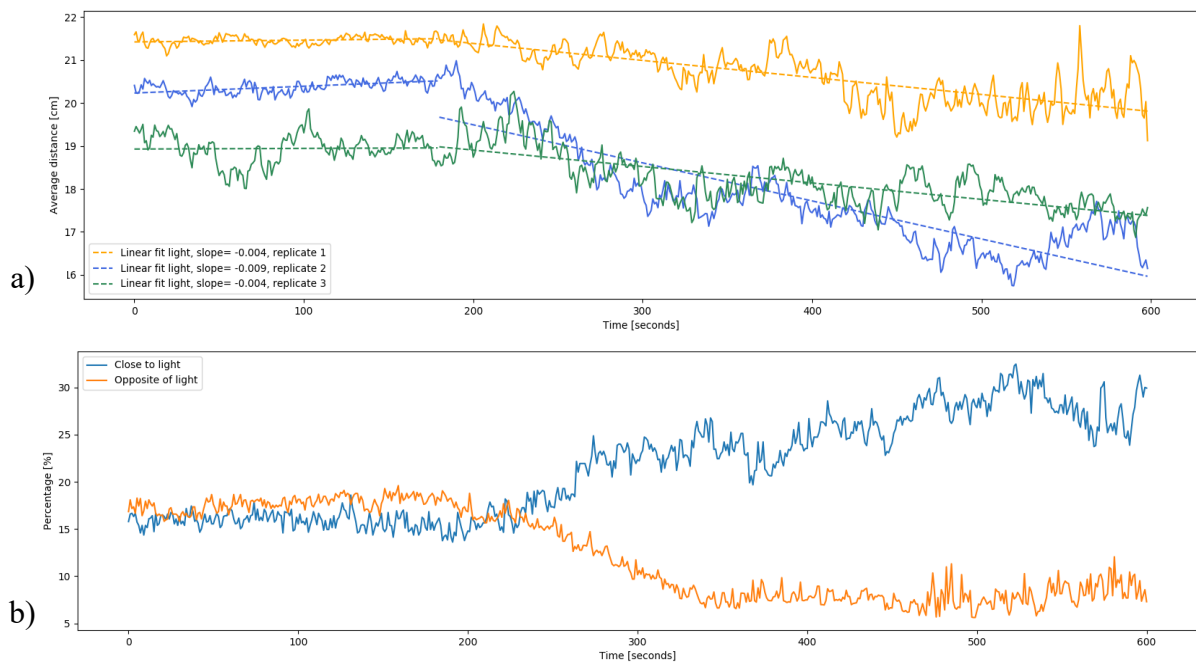


Figur 9 Profilplot av resultatene fra fargesensitivitetstestene (replik 2), med respons (median avstand fra baseline, fra siste minutt til hvert OD-nivå) som funksjon av OD-innstilling, illustrert for alle fire fargene (Red, White, Green og Blue). Figuren utarbeidet av Elisabeth Børset, gjengitt med tillatelse.

3.2 Deteksjonsforsøk

For analyse av disse forsøkene ble det benyttet deteksjonsalgoritmer (se vedlegg A3), som detekterte og kartla posisjonene til alle kopepodittene under hele forsøket. På denne måten kunne vi sammenligne de ulike forklaringsvariablene, og se hvordan disse påvirket forflytningen til populasjonen. Eksempler på dette ser vi i Figur 10 og Figur 11. Disse viser to ulike framstillinger av respons for to ulike forsøk. Etter 180 sekunder, ser vi at alle tre replikatene har en tydelig respons mot lyskilden. Av de tre replikatene ser vi at regresjonslinjen til replikat 2 har lavest stigningstall, noe som betyr at den gjennomsnittlige avstanden til lyskilden til populasjonen synker mest for dette replikatiset.

Fra deteksjonsforsøkene kunne vi også måle hvor stor prosentandel av populasjonen som hadde forflyttet seg mot lyskilden i løpet av forsøket. Her kunne vi dele opp karet i fem like store seksjoner (5 x 20 %), og se hvor stor del av populasjonen som var i de ulike seksjonene til en hver tid. I Figur 10b (replikat 2) kan vi se at kopepodittene var jevnt fordelt under kontrollperioden, hvor det var 16 (± 4) % kopepoditter i seksjonen nærmest lyskilden, og 17 (± 3) % kopepoditter i seksjonen lengst unna lyskilden. Da lysstimuluset ble slått på etter omlag 180 sekunder, begynte andelen av kopepoditter nærmest lyskilden å stige, samtidig som andelen lengst borte fra lyskilden begynte å synke. Etter endt forsøk hadde andelen kopepoditter i seksjonen lengst unna lyskilden sunket til omlag 7%, mens seksjonen nærmest lyskilden huset rundt 30%.



Figur 10: Data fra deteksjonsforsøk med Blue, OD1, P₃. Lysstimulus skrudd på etter 180 sekunder. a) Gjennomsnittlig avstand til lyskilden, med lineære regresjonslinjer for alle tre replikat. X-aksen viser tid (sekunder), mens Y-aksen viser gjennomsnittlig avstanden fra lyskilden. b) Prosent-andel av kopepodittene i de ytterste seksjonene (å 8cm / 20%) av akvariet. X-aksen viser tid (sekunder) og Y-aksen viser prosent-andelen av kopepodittene i seksjonen nærmest lyskilden (blå) og i seksjonen lengst unna (oransje). Figurene er utarbeidet av Live Forfang Bjørnstad og Maria A. Solstad, gjengitt med tillatelse.

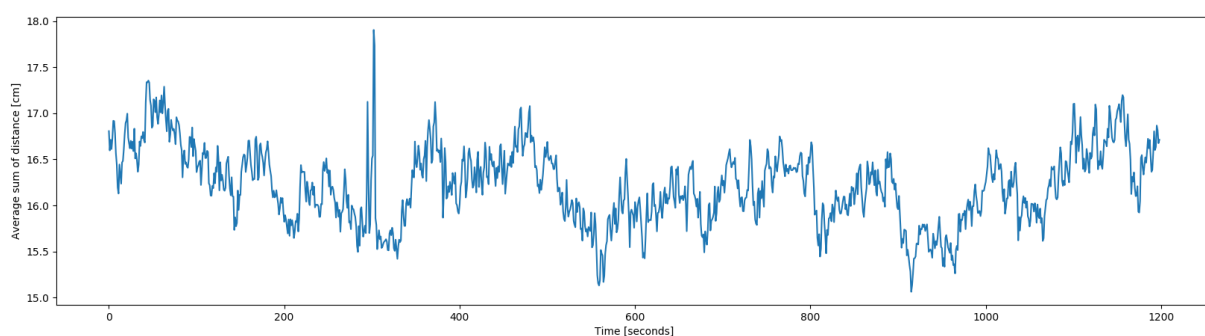
I Figur 11a ser vi at responsen var betydelig redusert sammenliknet med figur 10. Også i Figur 11 var responsen mot lyskilden sterkest for replikat 2. For dette replikatet hadde responsen sunket betydelig fra OD 1 til OD 5. Dette kan vi se av regresjonslinjene, hvor vi ser at stigningstallet har gått fra -0.009 (OD 1) til -0.004 (OD 5). Ser vi på replikat 3 for begge forsøkene, ser vi at gjennomsnittlig avstand til lyskilden går ned for OD 1, men opp for OD 5. Den reduserte responsen for OD 5 vises også i Figur 11b, hvor prosentfordelingen av kopepoditter er jevnere gjennom hele forsøket.



Figur 11: Data fra deteksjonsforsøk med Blue, OD5, P₃. Lysstimulus skrudd på etter 180 sekunder. a) Gjennomsnittlig avstand til lyskilden, med lineære regresjonslinjer for alle tre replikat. X-aksen viser tid (sekunder), mens Y-aksen viser gjennomsnittlig avstanden fra lyskilden. b) Prosent-andel av kopepodittene i de ytterste seksjonene (å 8cm / 20%) av akvariet. X-aksen viser tid (sekunder) og Y-aksen viser prosent-andelen av kopepodittene i seksjonene nærmest og lengst fra lysstimulus.. Figurene er utarbeidet av Live Forfang Bjørnstad og Maria A. Solstad, gjengitt med tillatelse.

IR-sensitivitetstest

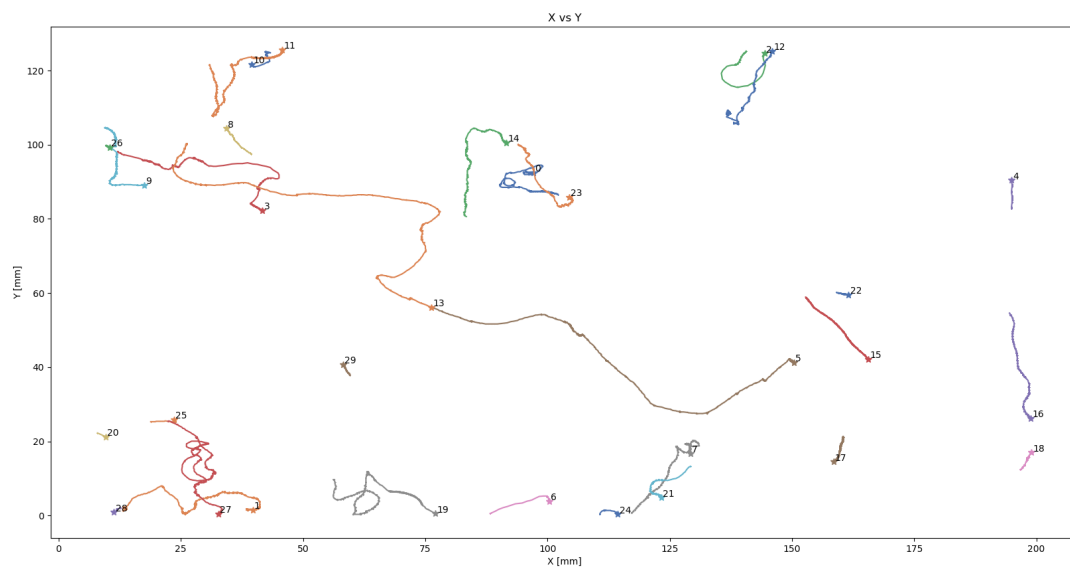
Det ble ikke registrert noen respons på IR-lyset, fra noen av de tre replikatene. Fra Figur 12 ser vi at avstanden til IR-lyset holdt seg stabil gjennom hele forsøket, på omlag 16.5 (±1) cm.



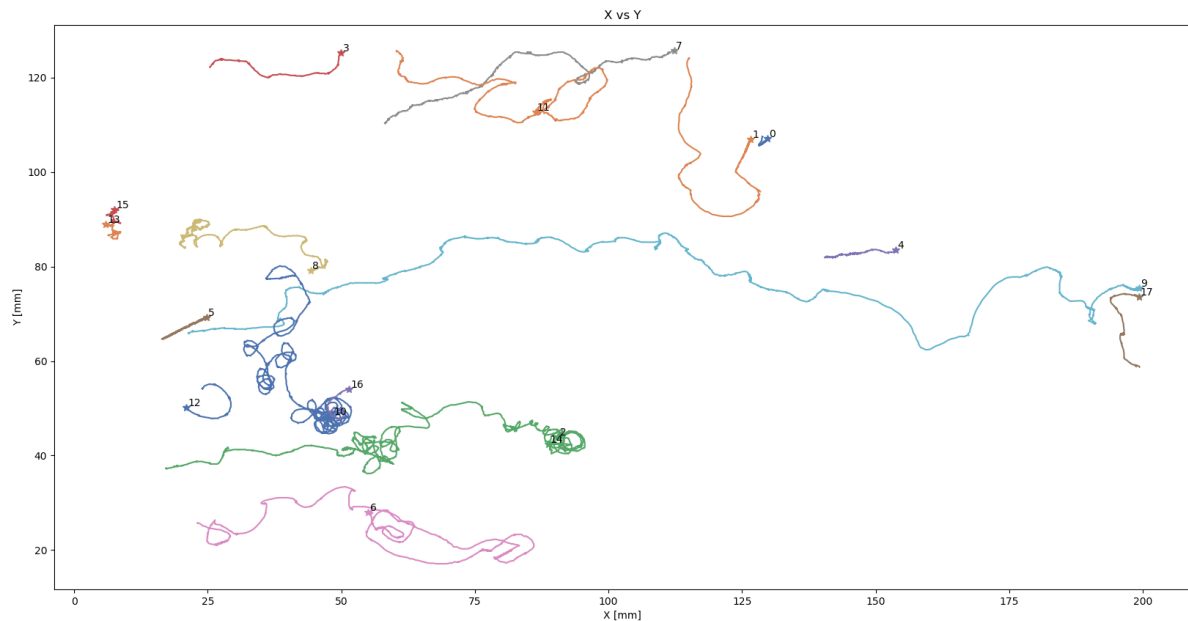
Figur 12: Gjennomsnittlig avstand fra IR-lyskaster som lyskilde. Mørkeperiode (kontrollperiode) de første 300 sekundene ut i forsøket. X-aksen viser tid (sekunder), mens Y-aksen viser populasjonens gjennomsnittlige avstand fra lyskilden (IR-lyskaster). IR-sensitivitetstest, replikat 3. Figuren er utarbeidet av Live Forfang Bjørnstad og Maria A. Solstad, gjengitt med tillatelse.

3.3 Sporingsforsøk

I Figur 13 og Figur 14 ser vi de ulike banene til alle 12 kopepoditter gjennom to sporingsforsøk. Det var varierende svømmemønster blant kopepodittene og i disse forsøkene var det forskjell på hvor mange kopepoditter som svømte direkte mot lyskilden. I Figur 13 ser vi kun én bane (5+13) som ser ut til å forflytte seg målrettet mot lyskilden over en lengre avstand. Ser vi på Figur 14, ser vi flere baner (16, 14 og 6) hvor kopepodittene avlegger større avstander for å svømme mot lyskilden.

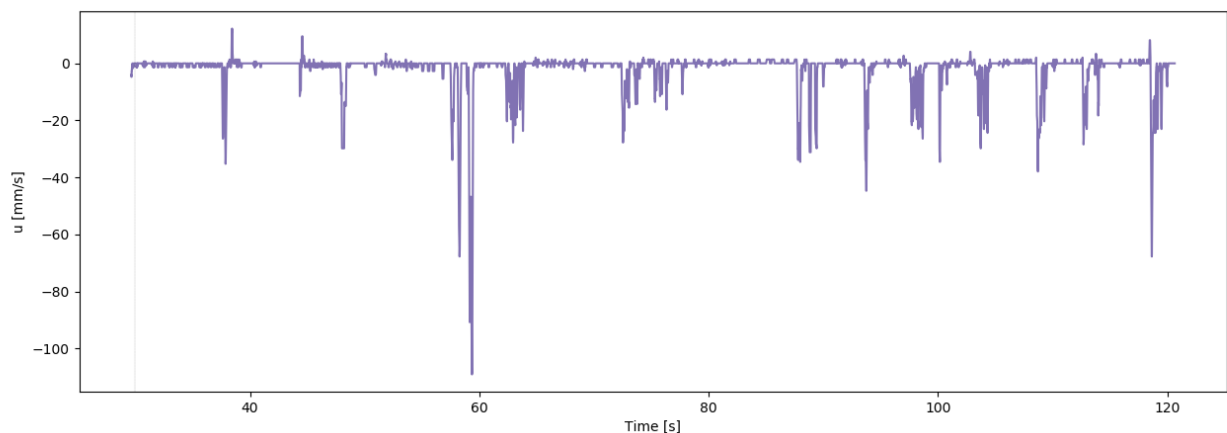


Figur 13: Plot fra sporingsforsøk med Blue, OD1, P_0 , replikat 1. X- og Y-aksen representerer hhv. lengde og bredde (mm) i akvariet. Lyskilden er plassert til venstre for Y-aksen. Hver kopepoditt ble først detektert, slik at sporingsalgoritmen kunne følge kopepodittene fra bilde til bilde. Hver kopepoditt ble fargekodet og gitt et nummer, og startpunktet for alle kopepodittene ble markert med en stjerne. Figuren er utarbeidet av Live Forfang Bjørnstad og Maria A. Solstad, gjengitt med tillatelse.



Figur 14: Plot fra sporingsforsøk med Blue, OD1, P₂, replikat 1. X- og Y-aksen representerer hhv. lengde og bredde (mm) i akvariet. Lyskilden er plassert til venstre for Y-aksen. Hver kopepoditt ble først detektert, slik at sporingsalgoritmen kunne følge kopepodittene fra bilde til bilde. Hver kopepoditt ble fargekodet og gitt et nummer, og startpunktet for alle kopepodittene ble markert med en stjerne. Figuren er utarbeidet av Live Forfang Bjørnstad og Maria A. Solstad, gjengitt med tillatelse.

Fra disse forsøkene kunne vi altså studere de individuelle svømmemønstrene gjennom hele forsøket. Et illustrerende eksempel på dette er Figur 15, hvor «bane 9» fra Figur 14 er illustrert som hastighet i x-retning. Her ser vi at første aktive svømmerespons mot lyskilden kom etter omlag 35 sekunder, 5 sekunder etter lyskilden ble skrudd på. Generelt for denne figuren ser vi at kopepodittens målrettede svømmerespons foregikk i intervaller, hvor de fleste «hoppene» hadde en hastighet på $30 (\pm 10)$ mm/s. Den raskeste svømmeresponsen mot lyskilden for denne kopepoditten var like over 100 mm/s.



Figur 15: Hastighet for kopepoditt 16 i x-retning. Hentet fra sporingsforsøk med Blue, OD1, P₂, replikat 1. X-aksen representerer tid (sekunder), Y-aksen viser hastighet (mm/s) i x-retning. Ettersom avstanden til lyskilden minker, vises hastigheten som negativ. Negativ hastighet er altså hastighet i retning lyskilden. Figuren er utarbeidet av Live Forfang Bjørnstad og Maria A. Solstad, gjengitt med tillatelse.

4. Diskusjon

4.1 Justering av forsøksoppsett

Underveis i metodeutviklingen ble det gjort flere modifikasjoner for å forbedre oppsettet og metoden. En av de største utfordringene underveis var støy i billedfilene, i form av luftbobler og støv, noe som medførte redusert treffsikkerhet hos algoritmene. Dette gjorde at akvariet måtte vaskes og lufttørkes hver dag, fylles med vann dagen før forsøkene og dekkes med plastfolie. Under pilotstudien ble det oppdaget at lyset fra lyskilden ble reflektert i glasset vis á vis lyskilden. Det ble satt inn en matt, svart plastplate for å redusere denne refleksjonen. Lyskilden ble også flyttet mellom «høyre» og «venstre» i de forskjellige replikatene for å eliminere romeffekt. For å hindre at også andre forklaringsvariabler (oscillering, semiokjemiske signaler, temperatur og salinitet) skulle påvirke resultatene til forsøkene ble det gjort flere forebyggende grep. Det ble lagt en kappe over forsøksoppsettet for å redusere både luftstrømninger fra vifteanlegget, men også støv og krystalliserte saltpartikler fra viften. Vannet brukt i forsøkene ble filtrert for å redusere partikler og annet organisk materiale, og det ble målt temperaturforskjeller under alle forsøkene. Flere av disse forebyggende tiltakene har bidratt til å redusere støy i billedfilene. Manglende konstruktiv respons hos kopepodittene under kontrollperioden (perioden i mørke i starten av hvert forsøk), vitner om at de potensielle forklaringsvariablene ikke har innvirket på responsen til kopepodittene under forsøkene.

En annen utfordring var å gjøre lusa synlig nok på bildefilene, uten at det skapte for sterke refleksjoner i glasset. Dette krevde mye justering og flytting av IR-lyskasterne. Disse refleksene er ikke synlig lys, men infrarøde refleksjoner som kun synes på bildene. For å redusere de infrarøde refleksene i glassveggene, ble lyskasterne dekket med to lag tynn hvit plast.

Når pulseringsintervallene som forklaringsvariabel skulle fastslås, henvendte vi oss til litteraturen. Fields et al. (2017) hadde allerede i sine studier testet fire ulike pulseringsintervaller: 1,8:0,9 s, 3,7:0,9 s, 3,7:5,5 s og 3,7:16,5 s. I studien så de sterkest respons ved 3,7:5,5 s og 3,7:16,5 s (80%), mens det var liten endring i effekt ved å øke mørkeperioden fra 5,5 sekunder til 16,5 sekunder. Det ble derfor besluttet å ikke ha mørkeperiode over 5 sekund. De korte intervallene brukt i våre forsøk ble benyttet for å videre simulere lysrefleksjoner fra vertens skjell. Etter å ha kjørt noen enkle pilotforsøk med ulike pulseringsintervaller ble de fire pulseringsinnstillinger nevnt i kapittel 2.2.2 fastsatt. Disse pilotforsøkene ble ikke filmet og analysert, responsen ble kun observert ved manuell overvåkning.

Kort tid før forsøkene skulle gjennomføres ble det registrert sykdom hos deler av lusekulturen (Sp1) i fiskehallen til NTNU. Det ble derfor bestilt nye kopepoditter og eggstrenger fra Industrielaboratoriet (ILAB), Høyteknologisenteret, Bergen. Kopepodittene fra ILAB var klekket i tidsrommet 28.-30. desember 2018 og holdt på 9°C. Klekkeriet på NTNU ble desinfisert og det ble laget nye klekkeinkubatorer til kopepodittene (Sp2) og eggstrengene (Sp3) fra ILAB. Kopepodittene fra Sp3 klekket mellom 11. og 13. januar 2019. Kopepoditter fra Sp2 ble brukt i forsøk 10., 11. og 14. januar, mens kopepoditter fra Sp3 ble brukt til de resterende forsøkene. Dette drøftes videre i kapittel 4.3 – pålitelighet.

Når det skulle besluttes hvor mange kopepoditter som var nødvendig i sporingsforsøkene ble det av statistiske hensyn anbefalt å bruke så mange som mulig, med et estimat på 30 kopepoditter. Men av hensyn til sporingsalgoritmens treffsikkerhet (å unngå at kopepodittene skulle overlappe banene til hverandre) ble det bare benyttet 12 kopepoditter fra Sp3 i hvert forsøk. Dette var selvfølgelig en avveining, men nøyaktigheten til algoritmene var for oss en så viktig faktor at vi ikke kunne gå over 12 kopepoditter, som ble et endelig kompromiss.

Den manglende responsen i pilotforsøkene på Red (bølgebånd på rundt 625-675 nm) samsvarer med studier gjort på andre marine kopepoder (Båtnes et al. (2015, (Cohen & Forward, 2003), hvor Cohen og Forward (2003) viste redusert respons hos flere arter ved bølgebånd over 600 nm (± 20). Imidlertid avviker dette noe fra lignende studier gjort med lakselus-kopepoditter, hvor Bron et al. (1993) registrerte fototaktisk respons hos kopepoditter mot bølgebånd opp til 700 nm. Publiserte resultater omkring denne problemstillingen er sprikende, og vi har valgt å forholde oss til resultatene fra våre pilotforsøk, og besluttet derfor å ikke bruke Red som lyskilde i hovedforsøkene. Det ble også besluttet å ikke bruke OD-innstillinger lavere enn OD 5, da dette så ut til å være en terskelverdi for respons. Å redusere antall forklaringsvariabler til deteksjons- og sporingsforsøkene var en viktig del av den statistiske forsøksplanleggingen, ettersom det var med på å effektivisere gjennomføringen av forsøkene.

4.2 Tolkning av resultater

Innledningsvis ble det presentert fire konkrete forskningsspørsmål, og vi ville undersøke om metoden utviklet kunne brukes til å besvare disse spørsmålene. Resultatene fra deteksjons- og sporingsforsøkene er viktige for å evaluere metoden, og det er viktig å være klar over at det er styrker og svakheter med begge forsøkene. For deteksjonsforsøkene har vi mulighet til å øke studieutvalget og kan undersøke en «populasjon», mens for sporingsforsøkene må vi redusere antall dyr for å kunne spore hver enkelt kopepoditt. Dette lar oss igjen se nærmere på og kartlegge de individuelle forskjellene blant kopepodittene. En annen forskjell for disse metodene er varigheten på forsøkene, hvor deteksjonsforsøkene har en lys-periode på 7 minutter, mens sporingsforsøkene kuttet etter 90 sekunder. Videre har vi i skrivende stund kommet lengre i arbeidet med resultatene fra deteksjonsforsøkene, og det er derfor klarere hvilke statistiske metoder det er fornuftig å bruke for disse resultatene. For sporingsforsøkene ser vi foreløpig bare konturene av hvordan man kan analysere resultatene. I det videre vil jeg gå systematisk gjennom hvert forskningsspørsmål, og drøfte hvilke resultater som kan besvare disse spørsmålene.

1. Hvor stor andel av studiepopulasjonen har en signifikant fototaktisk respons?

Første forskningsspørsmål kan besvares med metoden for både deteksjons- og sporingsforsøkene. Fra Figur 10b kan vi se at deteksjonsalgoritmene kan kartlegge posisjonen til alle kopepodittene, og at denne rådataen så kan brukes til å regne ut hvor mange prosent av populasjonen som etter endt forsøk har havnet i de 8 cm nærmest lyskilden. Man kan også bruke denne algoritmen til å kartlegge forflytningen til alle individene i populasjonen, og regne ut en gjennomsnittlig forflytning, som vist i Figur 10a. Denne metoden har klare likhetstrekk med den brukt i studien til Båtnes et al. (2015), hvor forfatterne hentet ut ett bilde i minuttet og analyserte bildet ved hjelp av program for bildeanalyse. Vi har for våre forsøk hentet ut flere bilder og har dermed langt høyere oppløsning, men begge metodene kan brukes for å vise gjennomsnittlig forflytning av populasjonen, og se hvor mange prosent som etter en gitt tid har forflyttet seg til en definert seksjon av akvariet. Men dette forskningsspørsmålet kan også undersøkes ved hjelp av sporingsforsøkene, hvor man enkelt kan bestemme hvilke kopepoditter som har respondert mot lyskilden. Videre kan man også regne om dette til en andel av populasjonen. Svakheten med denne metoden er som sagt at antallet kopepoditter brukt i disse forsøkene er forholdsvis lavt.

2. Hvilke terskelverdier er det for respons innad i en populasjon, for ulike bølgebånd og pulseringer?

På dette stadiet i studien vet vi fremdeles ikke om OD 5 vil være under terskelverdien for de ulike lysinnstillingene. Om resultatene viser respons for alle forsøkene kjørt med OD 5, kan man senere undersøke terskelverdi ved å redusere OD-innstillingene.

Terskelverdiene for de ulike forklaringsvariablene ble primært undersøkt ved hjelp av deteksjonsforsøkene, hvor man kunne bruke et større studieutvalg og undersøke responsen over lengre tid. Sporingsforsøkene ga et mer detaljert bilde av individenes respons, siden de tilhørende algoritmene kunne avdekke nøyaktig tidspunkt for detekterbar respons.

3. I hvor høy hastighet foregår bevegelser mot lyskilden, og hvor store individuelle forskjeller er det (heterogenitet)?

Dette forskningsspørsmålet lot seg kun besvare ved hjelp av sporingsforsøkene. Her måtte vi beregne svømmehastigheten til hver enkelt kopepoditt, som indikert i Figur 15. På denne måten kan vi kartlegge hastigheten til alle banene i et sporingsforsøk, og se på de individuelle forskjellene i svømmehastighet.

4. Hvor målrettet er studiepopulasjonens fototaktiske svømmerespons (forventning og varians i diffusjonsligningen)?

For å besvare dette forskningsspørsmålet kreves også resultatene fra sporingsforsøkene. Videre kreves det at hastighet og retning er beregnet for de ulike banene, gjennom hele tidsserien, slik at man kan studere både forventningsverdi og varians. Figur 15 viser et eksempel på hastighet i x-retning (mot lyskilden). Av figuren ser vi at hastigheten varierer noe, her synes bevegelsen å være ganske målrettet, uten at dette foreløpig er analysert i detalj. Sporingsforsøkene tillater oss også å undersøke svømmehastigheten i y-retning. Dette betyr at man videre med denne metoden kan regne ut totalhastigheten til hver enkelt kopepoditt, og sammenligne totalhastighet mot hastighet i alle retningene.

At vi med sporingsforsøk kan registrere både individuelle svømmehastigheter og svømmemønster, betyr også at vi kan se nærmere på hvilken type svømmemønster kopepodittene har, like før de lokaliserer en vert.

4.3 Pålitelighet og gyldighet

Ettersom problemstillingen i denne oppgaven hovedsakelig omhandler metodeutvikling, vil det videre bli lagt vekt på pålitelighet og gyldighet knyttet til metodene brukt i denne studien. For mer utfyllende diskusjoner knyttet de kybernetiske og statistiske metodene, samt de ferdigstilte resultatene, se: (Bjørnstad & Solstad, Pre-print), (Børset, Pre-print) og (Miljeteig et al., Pre-print)

Pålitelighet

Pålitelighet, eller reliabilitet, sier noe om hvor reproducerbare resultatene fra en studie er. I en tverrfaglig studie som denne er det mange ulike faglige hensyn å ta, og menneskelige og tekniske feil kan redusere resultatenes pålitelighet. Selve forsøksplanleggingen, som både har optimalisert forsøkene og redusert risikoen for feilkilder, har vært et helt sentralt aspekt ved denne studien. Den statistiske innfallsvinkelen har kastet lys over utfordringer som ellers kan være vanskelig å se, og dette har uten tvil styrket studiens design. Kanskje en av de viktigste faktorene her har vært hvordan forsøkene ble segmentert slik at man kunne randomisere og teste de ulike forklaringsvariablene uavhengig av hverandre, for alle forsøkene i denne studien. Som en nødvendig del av den statistiske forsøksplanleggingen har det også vært en styrke for denne studien at det har blitt gjennomført pilotforsøk før alle forsøkene. Dette har bidratt til å strukturere forsøkene, avdekke og rette opp mulige feilkilder, samt optimalisere de ulike forsøkene. En annen viktig styrke ved denne studien har vært utviklingen av deteksjons- og sporingsalgoritmer. Vi mener disse har medført en større grad av presisjon og kontinuitet i deteksjonen enn om dette skulle blitt gjort manuelt. Men en av utfordringene med bruk av slike algoritmer er hva som skjer om en lus «forsvinner» fra bildet som analyseres. Her var refleksene fra IR-lyskasterne et tilbakevendende problem, ettersom kopepodittene gikk i ett med de lyse refleksene i veggene til racewayen. Dette kan ha påvirket og svekket påliteligheten til dataene fra disse forsøkene. For mer detaljert beskrivelse av hvordan dette ble håndtert se (Bjørnstad & Solstad, Pre-print).

Selv med god planlegging og gode metoder krever slike biologiske forsøk en viktig basalkunnskap om den arten man ønsker å studere. Den brede kompetansen omkring lakselus, samt kunnskap om hvordan man skal håndtere forsøksdyrene, har for disse forsøkene vært en essensiell faktor. Men selv med denne kompetansen kan man ikke utelukke feilkilder, og den største biologiske feilkilden for denne studien var trolig studiepopulasjonen. Under

analyseringen av deteksjonsforsøkene så man at flere kopepoditter var blitt ekskludert av algoritmen fordi de var inaktive (døde eller ikke svømmedyktige) under forsøket. Dette ble også visuelt registrert under selve forsøkene, hvor aktiviteten i racewayen varierte mye fra dag til dag, både under kontroll- og forsøksperiodene. Det er selvfølgelig vanskelig å fastslå hva som er årsaken til dette, men sannsynligvis kan ulike studiepopulasjoner, klekkedato og potensiell sykdom ha forårsaket den høye andelen inaktive dyr.

Under pilotforsøkene var det få dyr fra Sp1 tilgjengelig og det ble derfor besluttet å bruke to grupper dyr, som skulle brukes i to dager hver. Det betyr at dyrene i replikat 1 og 3 fra pilotforsøkene allerede hadde gjennomgått en runde med forsøk og stått i samme kar i over 24 timer, uten tilførsel på nytt vann eller oksygen når de ble brukt, og dette kan ha en sammenheng med den lave responsen fra disse replikatene. Kort tid før deteksjonsforsøkene ble kjørt ble det registrert sykdom på Sp1-kulturen. Det er usikkert når denne sykdommen brøt ut, så vi kan ikke utelukke at kopepodittene var påvirket av dette, selv om utbruddet ble oppdaget to måneder senere. Klekkeriet ble grundig vasket og desinfisert før vi tilsatte Sp2 og Sp3, men vi kan heller ikke utelukke at agens fra sykdomsutbruddet overlevde desinfiseringen og manifesterte seg på nytt i klekkeriet. Dette kan ha medvirket til det høye tallet på inaktive kopepoditter.

For deteksjonsforsøkene ble det brukt to ulike studiepopulasjoner, hvor Sp2 hadde klekkedato mellom 28. og 29. desember 2018, som betyr at det siste forsøket kjørt med Sp2 (14.01.19) hadde dyr som potensielt var 17 dager gamle. Tucker et al. (2000) undersøkte påslag som funksjon av alder på kopepoditter, og fant i sine studier at påslagsprosenten sank med hele 36% fra 3 dpm til 7 dpm. Den samme tendensen ble funnet i studier gjort på *Caligus rogercresseyi*, hvor (Cumillaf et al., 2018) registrerte påslagsprosent på 53% og 9%, ved smitteforsøk med kopepodittstadiet (henholdsvis 6 - og 15 dpm) til *Caligus rogercresseyi*. Ettersom påslagsprosenten er vist å gå ned ved økt alder, kan man også anta at responsen og muligens svømmeevne er redusert, noe som i så fall kan tyde på at alderen til de ulike studiepopulasjonene brukt i denne studien kan ha påvirket responsen i forsøkene. Dessuten kan uttaket av kopepoditter til hvert forsøk og påkjenningen fra selve forsøkene ha bidratt til å svekke studiepopulasjonen. For hvert uttak av kopepoditter ble det brukt en buttonert glasspipette for å redusere påkjenning, men kopepodittene kan fremdeles ha tatt skadet under uttak, seleksjonen eller overføringen til akvariet. Ettersom det ble kjørt flere forsøk per gruppe med kopepoditter, kan det ha oppstått en fototaktisk «metning» hos kopepodittene, hvor sanseapparatet deres ble sløvet av de foregående forsøkene. I tillegg til selve metningen kan det

være at akklimatiseringsperioden mellom forsøkene var for kort, eller at det ble kjørt for mange forsøk per gruppe lus og at kopepodittene hadde en energireduksjon utover i forsøkene.

I ettertid ser vi at det er noen justeringer som skulle vært gjort av denne studien for å unngå disse feilkildene. Den viktigste justeringen er utvalg av kopepoditter. Her burde alle forsøkene blitt kjørt med dyr fra samme studiepopulasjon, hvor alle gruppene var like gamle, selektert på samme måte og oppbevart på samme måte. Det gjenstår også litt arbeid med selve forsøksoppsettet hvor det etter mye prøving og feiling fremdeles var problemer med refleks i sideveggene fra IR-lyskasterne. Det er vanskelig å kommentere algoritmene, modellene og analysen brukt under dette forsøket, da de andre deltakerne i denne studien ikke er ferdige ennå. Når alle resultatene er analysert, kan man i ettertid se nøyere på om dette arbeidet kunne blitt gjort på en bedre måte. Dette vil bli gjort i (Miljeteig et al., Pre-print).

Gyldighet

Gyldighet, eller validitet, betegner hvor godt en metode eller et forsøk klarer å måle det studien har som hensikt å måle. Det er derfor viktig å kartlegge hva man ønsker å undersøke, om dette er en direkte eller indirekte årsak/virkningsrespons, samt om det er eksterne faktorer som kan påvirke resultatene fra forsøkene. I denne studien er det utarbeidet en metode som tester årsak/virkning på en veldig direkte måte, ettersom det kun er lys på/av, det registreres respons og man har relativt god kontroll på potensielle forstyrrende faktorer under forsøkene.

For å kunne vurdere gyldigheten til denne metoden må vi først se på hva det var vi ønsket å undersøke og om dette faktisk ble undersøkt. I denne studien var de ulike forklaringsvariablene vi ønsket å undersøke: bølgelengde, intensitet og pulsering. Vi mener å ha god kontroll på disse faktorene, ettersom bølgelengde og intensitet for alle LED-ene ved ulike OD-nivåer ble målt i studiene til Båtnes et al. (2015) og Miljeteig et al. (2014, og pulseringsintervallene ble styrt ved hjelp av programvaren som styrer strømtilførselen til dioden.

Andre aspekter ved gyldigheten til denne metoden er ulike feilkilder som kan ha forstyrret de forklaringsvariablene vi var ute etter å undersøke. En viktig systematisk feilkilde som kunne ha svekket validiteten til resultatene fra denne studien kunne typisk være lysforurensning. Alle lyskilder på forsøkslokaliteten ble dekket til med aluminiumstape og det ble montert en lyssluse utenfor døren inn til klekkeriet, men IR-lyskasterne og refleksjonen fra lyskilden kan ha påvirket responsen under forsøkene. Det ble kjørt tre replikat med IR-sensitivitetstester under

deteksjonsforsøkene, hvor resultatene fra kapittel 3.2 viser ingen forhøyet respons. Dette mener vi har vært et viktig bidrag til å kontrollere mulig påvirkning fra IR-lyskasterne. Refleksjonen fra lyskilden var vanskeligere å kontrollere, og selv med forebyggende tiltak som den matte platen i racewayen ser man fremdeles noe refleks i denne platen. Hvis denne feilkilden har medført en respons, kan man ikke si med sikkerhet om dette er en positiv fototaktisk respons på refleksen, eller om deler av populasjonen har en negativ fototaktisk respons på lyskilden.

Fra litteraturen kan vi se at det er flere andre faktorer som kan medføre en målrettet svømmerespons hos kopepoditter, blant annet semiokjemiske signaler, oscillering, temperatur og salinitet (Bailey et al. (2006), Heuch et al. (1997), Heuch et al. (2006) og Tucker et al. (2001)). Ettersom alle forsøkene er kjørt med filtrert sjøvann fra samme kilde er det lite trolig at lukt og salinitet skal ha påvirket responsen til kopepodittene. Strømninger i vannet fra omrøringen mellom forsøkene kunne potensielt hatt en påvirkning på kopepodittene, men denne feilkilden ble trolig eliminert grunnet akklimatiseringsperioden mellom forsøkene, noe som støttes av mangel på respons i kontrollperioden. Det er vist at temperaturendringer fra 7 til 12 C har stor effekt på påslagsprosent (Tucker et al. (2001)), I våre forsøk hold temperaturen seg stabil gjennom alle forsøkene ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$), og det er lite sannsynlig at slike små temperatursvingninger kan ha effekt på responsen. Andre potensielle romeffekter kan være luftstrømmer fra vifteanlegget på forsøkslokaliteten. Dette har trolig ikke forårsaket positiv respons blant kopepodittene, da denne faktoren ble eliminert ved å bytte side for lyskilden, samt at det ikke er antydning til respons under kontrollperioden for noen av forsøkene.

Generaliserbarhet

Denne metoden har studert fototaktisk svømmerespons hos kopepoditter klekket i laboratorium, under strengt kontrollerte forhold. Resultatene fra disse forsøkene er trolig i stor grad representative for den fototaktiske responsen hos kopepoditter ute i den «virkelige» verden. I dette forsøket har vi holdt variabler som strømninger i vannet, salinitetsforskjeller, ulike temperaturer, oksygenutskifting, pH-forandringer og UV-innstråling konstante, for å isolere effekten av lys som attraktant. Eventuelle interaksjonseffekter mellom lys og disse variablene er ikke kartlagt. Dette betyr at resultatene i denne studien kan generaliseres til lysrespons som en enkelt faktor for «ville» kopepoditter, men resultatene kan ikke direkte ekstrapoleres til kopepoditters adferd og forflytningsmønster i naturen eller deres helhetlige evne til å lokalisere en passende vert.

4.4 Oppsummering og konklusjon

I denne oppgaven har jeg presentert en tverrfaglig tilnærming til hvordan man kan utarbeide og bruke en metode for å sikre en dypere forståelse av hvordan ulike lyskombinasjoner påvirker kopepoditters svømmemønster. Ved å benytte statistisk forsøksplanlegging har vi kunnet optimalisere forsøkene og utarbeide en pålitelig protokoll som har sikret gyldige og objektive resultater. Dataene generert fra forsøkene er hentet ut ved hjelp av ulike deteksjons- og sporingsalgoritmer, og analysert ved hjelp av ulike statistiske metoder.

Som del av denne oppgaven ble forsøksoppsettet til Miljeteig et al. (2014) og Båtnes et al. (2015) modifisert og forbedret, slik at det nå kunne brukes til å studere lakseluscopepoditters fototaktiske respons. I studien ble det gjennomført tre runder med forsøk: Pilotforsøk, deteksjonsforsøk og sporingsforsøk. Pilotforsøkene var en viktig del av den statistiske forsøksplanleggingen som skulle kartlegge hvilke forklaringsvariabler det ville være interessant å undersøke i deteksjons- og sporingsforsøkene, samt hvordan man skulle teste for de ulike forklaringsvariablene. Deteksjonsforsøkene skulle se på hvor stor forflytning det var innad i populasjonen mot de ulike lysinnstillingene, mens sporingsforsøkene skulle se nærmere på svømmehastighet, målrettet svømmemønster og individuelle forskjeller blant kopepodittene. Alle forsøkene er nå gjennomført, metodene for deteksjon og sporing er etablert og de ferdigstilte resultatene vil bli presentert i (Miljeteig et al., Pre-print).

Metoden presentert i denne studien har vist seg å avlede konkrete svar på de fire forskningsspørsmålene presentert i introduksjonen. I tillegg til at vi kan studere hvor stor andel av en studiepopulasjon med kopepoditter som kan forflytte seg mot en lyskilde, kan denne metoden brukes for å se individuelle fototaktiske responser ved hjelp av sporing. Sporingsforsøkene lar oss nå studere nyanserte responser, med et langt mer detaljert datasett enn det brukt ved tidligere studier. En viktig del av metoden er dessuten dens muligheter for å endre og variere irradians, pulseringer og bølgebånd. I kombinasjon med sporing og deteksjon, gir metoden gode muligheter for å oppdage og fastsette terskelverdier for disse forklaringsvariablene.

For å forstå hvordan lakselus finner en passende vert er det essensielt å forstå hvordan lys, som en av flere faktorer, påvirker kopepodittenes svømmemønster. Gjennom den tverrfaglige tilnærmingen brukt i denne studien mener vi at resultatene fra disse forsøkene vil utgjøre et viktig bidrag til «state of the art»-kunnskap om lakselusas basalbiologi, mer spesifikt

svømmehastighet og målrettet svømmemønster hos kopepoditter mot ulike lyskilder. Kunnskapen denne studien bringer med seg vil også kunne spille en viktig rolle i videre forebyggende arbeid mot lakselus. Den opprinnelige intensjonen med Profylax-prosjektet var å kombinere avansert robotteknologi med nettopp denne type kunnskap, og nå vil også andre aktører kunne dra nytte av dette kunnskapsbidraget i videre arbeid med Integrated Pest Management i oppdrettsnæringen.

Metoden utviklet i dette prosjektet legger et viktig grunnlag for videre forskning, hvor det vil være interessant å undersøke også andre attraktanter og repellenter for lakselus. I tillegg til dette kan vi nå se på lysrespons i kombinasjon med andre forklaringsvariabler, som temperatur, oscillerende, kjemikalier og andre stressfaktorer. Oppsettet og metoden lar oss også se nærmere på respons mot ulike attraktanter som funksjon av tid/alder, hvor det også vil være interessant å gjennomføre smitteforsøk med kopepoditter som allerede har vært utsatt for ulike stressorer. Forsøksoppsettet kan også bygges om til et vertikalt oppsett, hvor man kan se nærmere på lysets påvirkning på vertikal migrasjon hos kopepoditter ved å simulere dagslyset ved hjelp av lyskilden. Man kan også ta i bruk andre lysstimuli, som UV-lys. Det er lagt mye tid og arbeid inn i å utarbeide denne metoden. Med det tilhørende forsøksoppsettet, og algoritmene utviklet i denne studien, vil metoden også kunne brukes til å studere andre arter enn lakselus.

Profylax-prosjektet har gjennom denne studien utviklet og validert en metode for å kvantifisere den fototaktiske svømmeresponsen til kopepoditt-stadiet av *Lepeophtheirus salmonis*. Ved hjelp av maskinsyn, algoritmer og avanserte statistiske metoder har vi sikret pålitelige og objektive resultater basert på disse dataene. I tillegg til å svare på denne oppgavens problemstilling, har dette prosjektet belyst betydningen av og styrken til et tverrfaglig samarbeid. Her har ulike fagfelt gått sammen for å studere en kompleks problemstilling, hvor kompetansen fra fagfeltene har virket komplementerende og dermed lyktes med å belyse nye aspekter omkring lakselusas biologi.

5. Referanser:

- Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K. & Horsberg, T. E. (2015, Feb). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol*, 31(2), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Aarseth, K. A. & Schram, T. A. (1999). Wavelength-specific behaviour in *Lepeophtheirus salmonis* and *Calanus finmarchicus* to ultraviolet and visible light in laboratory experiments (Crustacea:Copepoda). *Marine Ecology Progress Series*.
- Bailey, R. J. E., Birkett, M. A., Ingvarsdóttir, A., Mordue, A. J., Mordue, W., O'Shea, B., ... Wadhams, L. J. (2006, 2006/02/01). The role of semiochemicals in host location and non-host avoidance by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) copepodids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(2), 448-456. <https://doi.org/10.1139/f05-231>
- Berle, H. & RIm, S. Y. (2018). *The Cost of Sea Lice and Its Implications for the Future of the Norwegian Aquaculture Industry* Norwegian School of Economics, Norwegian School of Economics.
- Bjørnstad, L. F. & Solstad, M. A. (Pre-print). *Investigation of light response and swimming behaviour of the salmon lice (Lepeophtheirus Salmonis) using computer vision*. Norwegian University of Science and Technology.
- Boxaspen, K. & Næss, T. (2000, 2000). Development of eggs and the planktonic stages of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) at low temperatures. *Contributions to Zoology*, 69(1/2), 51 - 55. <https://doi.org/urn:nbn:nl:ui:19-534414>
- Bron, J. E., Sommerville, C., Jones, M. & Rae, G. H. (1991). The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, *Salmo salar*. *Journal of Zoology*, 224(2), 201-212. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1469-7998.1991.tb04799.x>
- Bron, J. E., Sommerville, C. & Rae, G. H. (1993). *Chapter 10: Aspects of the behaviour of copepodid larvae of the salmon louse Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837)*. In: *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*. p:125-142. Chichester: Ellis Horwood Limited.
- Browman, H. I., Boxaspen, K. & Kuhn, P. (2004, Dec). The effect of light on the settlement of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*, 27(12), 701-708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00592.x>
- Børset, E. (Pre-print). *Investigating the phototactic response of salmon lice - design and analysis of experiments*. Norwegian University of Science and Technology, Department of Mathematical Sciences.
- Båtnes, A. S., Miljeteig, C., Berge, J., Greenacre, M. & Johnsen, G. (2015). Quantifying the light sensitivity of *Calanus* spp. during the polar night: potential for orchestrated migrations conducted by ambient light from the sun, moon, or aurora borealis? *Polar Biology*, 38(1), 51-65.
- Cohen, J. & Forward, R. (2003). *Spectral Sensitivity of Vertically Migrating Marine Copepods*.
- Cumillaf, J., Paschke, K., Mancilla-Schulz, J., Barria, P., Ruiz, K., Montory, J., ... Urbina, M. (2018). *Energy availability during the early development of Caligus*

- rogercresseyi*, delayed settlement and the implications for fixation success and development times. Innlegg presentert ved Sea Lice 2018, Punta Arenas, Chile.
- Fields, D. M., Skiftesvik, A. B. & Browman, H. I. (2017, Sep 17). Behavioural responses of infective-stage copepodids of the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda: Caligidae) to host-related sensory cues. *J Fish Dis*. <https://doi.org/10.1111/jfd.12690>
- Fiskeridirektoratet. Produksjonsområder. Hentet 10.4.19 2019 fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tildeling-og-tillatelser/Kapasitetsjustering-Trafikklyssystemet/Produksjonsomraader>
- Gjerde, B. K. (2011). Parasittiske arthropodar i veterinærmedisinen. *Kompendium i veterinærmedisinsk parasittologi. Utgave 11. Side 98-99.*
- Hamre, L. A., Eichner, C., Caipang, C. M., Dalvin, S. T., Bron, J. E., Nilsen, F., ... Skern-Mauritzen, R. (2013). The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) life cycle has only two Chalimus stages. *PLoS One*, 8(9), e73539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Hamre, L. A., Glover, K. A. & Nilsen, F. (2009, 2009/12/01/). Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains. *Parasitology International*, 58(4), 451-460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.08.009>
- Helgesen, K. O. & Qviller, L. (2019). Fiskehelserapporten 2018. *Veterinærinstituttet rapportserie*, 81-87.
- Heuch, P. A. (1995). *Experimental Evidence for Aggregation of Salmon Louse Copepodids (Lepeophtheirus Salmonis) in Step Salinity Gradients.*
- Heuch, P. A., Doall, M. H. & Yen, J. (2006). Water flow around a fish mimic attracts a parasitic and deters a planktonic copepod. *Journal of Plankton Research*, 29(suppl_1, 1 January 2007), i3-i16.
- Heuch, P. A. & Karlsen, H. E. (1997). Detection of infrasonic water oscillations by copepodids of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligida). *Journal of Plankton Research*, 19(6), 735-747.
- Heuch, P. A., Nordgreen, J. R. & Schram, T. A. (2000). Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. *Aquaculture Research*, 31(11), 805-814.
- Kristensen, T., Åtland, Å., Rosten, T., Urke, H. A. & Rosseland, B. O. (2009, 2009/09/01/). Important influent-water quality parameters at freshwater production sites in two salmon producing countries. *Aquacultural Engineering*, 41(2), 53-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.06.009>
- Marine Institute Foras na Mara. (2019). Life cycle of the Salmon Louse. Hentet 3. mai 2019 fra <https://www.marine.ie/Home/site-area/areas-activity/aquaculture/sea-lice/life-cycle-salmon-lice>
- Miljeteig, C., Olsen, A. J., Båtnes, A. S., Altin, D., Nordtug, T., Alver, M. O., ... Jenssen, B. M. (2014). Sex and life stage dependent phototactic response of the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 451, 16-24.
- Miljeteig, C., Vatn, J. A. Å., Solstad, M. A., Bjørnstad, L. F., Børset, E., Tyssedal, J. S., ... Båtnes, A. S. (Pre-print). Light responses of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) copepodites.
- Mongomery, D. C. (2009). *Design and analysis of experiments* (7th edition. utg.). Arizona State University.

- Mordue Luntz, A. J. & Birkett, M. A. (2009, Jan). A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Caligidae: Copepoda). *J Fish Dis*, 32(1), 3-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01004.x>
- Nicholl, H. (2017). Trafikklyssystemet: Nytt system for kapasitetsjusteringer i lakse- og ørretoppdrett. *Mastergrad ved juridisk fakultet, UiO*.
- Poppe, T., Dalum, A., Røislien, E., Nordgreen, J. & Helgesen, K. (2018). Termisk behandling av laks. *Norsk veterinærtidsskrift*, nr. 3, 148-156.
- Powell, M. D., Reynolds, P. & Kristensen, T. (2015, 2015/11/01/). Freshwater treatment of amoebic gill disease and sea-lice in seawater salmon production: Considerations of water chemistry and fish welfare in Norway. *Aquaculture*, 448, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.027>
- Produksjonsområdeforskriften. (2017). *Forskrift om produksjonsområder for akvakultur av matfisk i sjø av laks, ørret og regnbueørret (produksjonsområdeforskriften) (FOR-2017-01-16-61)*. Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2017-01-16-61>
- Statistisk sentralbyrå. (2018). Salg av slaktet matfisk. Mengde fordelt på fiskeslag og fylke. Tonn. Ferdige data fra 2017. Hentet 8.3.19 2019 fra <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar>
- Stien, L., Nilsson, J., Hevrøy, E., Oppedal, F., Kristiansen, T., Lien, A. & Folkedal, O. (2012). *Skirt around a salmon sea cage to reduce infestation of salmon lice resulted in low oxygen levels*.
- Store norske leksikon. (2018a). Akklimatisering. Hentet 29 april 2019 fra <https://snl.no/akklimatisering>
- Store norske leksikon. (2018b). Kollimator. Hentet 12. april 2019 fra <https://sml.snl.no/kollimator>
- Stortinget. (2015). *Innstilling fra næringskomiteen om forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett [møte i stortinget 15. juni 2015]*. Hentet fra <https://www.stortinget.no/no/Saker-og-publikasjoner/Publikasjoner/Referater/Stortinget/2014-2015/150615/4/>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O. T., Nilsen, F., ... Jackson, D. (2013, Mar). Salmon lice--impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *J Fish Dis*, 36(3), 171-194. <https://doi.org/10.1111/jfd.12061>
- Tucker, C. S., Sommerville, C. & Wootten, R. (2000). An Investigation into the Larval Energetics and Settlement of the Sea Louse, *Lepeophtheirus salmonis*, an Ectoparasitic Copepod of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Pathology*, 35(3), 137-143. <https://doi.org/10.3147/jsfp.35.137>
- Tucker, C. S., Sommerville, C. & Wootten, R. (2001). The effect of temperature and salinity on the settlement and survival of copepodids of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 23(5), 309-320.
- Urbina, M., Cumillaf, J., Paschke, K. & Gebauer, P. (2018). *Effects of pharmaceuticals used to treat salmon lice on non-target species: Evidence from a systematic review*.
- Wikipedia. (2019). Analysis of variance. Hentet 07.04.2019 fra https://en.wikipedia.org/wiki/Analysis_of_variance

Vedlegg A - Begreper og metodisk grunnlag

A.1 Begrepsavklaring

Akklimatisering: Gradvis tilpasning av organismer til endringer i livsmiljø, især klimatiske forandringer (Store norske leksikon, 2018a).

Attraktant: Element for attraksjon, noe som virker tiltrekkende.

Dpm (Days post moulting): Dager etter skallskifte fra Nauplius II til kopepoditt.

Diffusjonsligningen: «Diffusjonsligningen er en partiell differensialligning. I fysikk beskriver den oppførselen til den kollektive bevegelsen av mikropartikler i et materiale som er resultatet av den tilfeldige bevegelse av hver mikropartikkel»

Fototaktisk respons: En målrettet bevegelse som respons på en lysstimulus.

Integrated Pest Management: En bred tilnærming som integrerer praksis for kontroll av skadedyr.

Haloklin: I denne oppgaven - en grenseflate i en vannsøyle, mellom lag med ulik salinitet.

Heterogenitet: Motsetning til homogent, element av ulikhet, her ulikhet innad i en populasjon.

Irradians: Antall fotoner som mottas av en overflate (per arealenhet).

Kollimator: Optisk, elektrostatisk eller magnetisk linsesystem som samler en stråle til en parallell strålebunt (Store norske leksikon, 2018b).

Produksjonsområde: Fra 15. oktober 2017 ble det innført et nytt system for kapasitetsøkning i norsk lakse- og ørretproduksjon, hvor kysten ble delt inn i 13 geografiske områder (produksjonsområder), hvor miljøindikatorer regulerer kapasitet (Fiskeridirektoratet).

Repellent: Motsetning til attraktant, element for avstøtning, noe som virker avstøtende.

Romeffekt: I denne oppgaven - uidentifiserte effekter av elementer i rommet som potensielt kan påvirke forsøksdyrenes plassering i akvariet, for eksempel luftstrømmer fra kjølesystemet, uidentifiserte lyskilder, temperaturforskjeller ol.

Semiokjemiske signaler (semiochemical cues): I denne oppgaven forstått som - en kjemisk substans frigitt fra en organisme som så påvirker atferd hos andre individer.

Styrkeberegning: En tilnærming hvor man estimerer hvor mange, i dette tilfelle kopepoditter, som trengs for å få sikker evidens på en respons hvis en slik respons eksisterer.

A.2 Statistisk forsøksplanlegging

Dette arbeidet er gjennomført av Elisabeth Børset, masterstudent ved Institutt for matematiske fag ved NTNU og deltager i Profylax-prosjektet. For en mer detaljert beskrivelse av dette arbeidet, se (Børset, Pre-print).

Statistisk forsøksplanlegging sammenfatter planleggingen av et eksperiment slik at passende data blir samlet og analysert av riktige statistiske metoder, som gir gyldige og objektive resultater. Statistisk forsøksplanlegging er viktig fordi analysemetoden avhenger av forsøksdesignet. De tre grunnleggende prinsippene i forsøksplanlegging er randomisering, replikasjon og blokking.

Randomisering betyr at rekkefølgen av hvert forsøk i eksperimentet er tilfeldig bestemt. Ved bruk av statistiske metoder kreves det at observasjonene er uavhengig fordelte tilfeldige variabler, og randomisering gjør vanligvis denne antagelsen gyldig. I tillegg vil randomisering bidra til at effekten av andre faktorer som kan påvirke responsvariabelen, men som ikke er av interesse, blir jevnet ut. Av praktiske årsaker og tidsbegrensning, er det ofte vanskelig å gjennomføre fullstendig randomisering av et eksperiment.

Replikasjon betyr uavhengige gjentakelser av hver faktorkombinasjon. Bruk av replikasjon i et eksperiment gjør at man kan finne et estimat av den eksperimentelle feilen. Et estimat av den eksperimentelle feilen gjør at man kan avgjøre om observerte forskjeller i dataene virkelig er statistisk forskjellige. I tillegg vil replikasjon bidra til at man kan estimere en mer presis gjennomsnittspåparameter av responsen for en faktor i eksperimentet.

I eksperiment der en ønsker å sammenligne effekten av faktorene valgt i eksperimentet, brukes «blokking» for å ytterligere redusere effekten av faktorer som kan påvirke responsen, men som man ikke er interessert i å analysere. Ved planlegging av et eksperiment må en først finne ut hva en ønsker å undersøke. Deretter kommer valg av responsvariabel, og valg av faktorer og nivå. Så bestemmes antall replikasjoner basert på mengde data som er involvert i eksperimentet, effektivitet og kostnader. Til slutt bestemmes rekkefølge av forsøkene, og om det er noen restriksjoner på blokking og randomisering (Mongomery, 2009).

A.3 Bildegjenkjenning

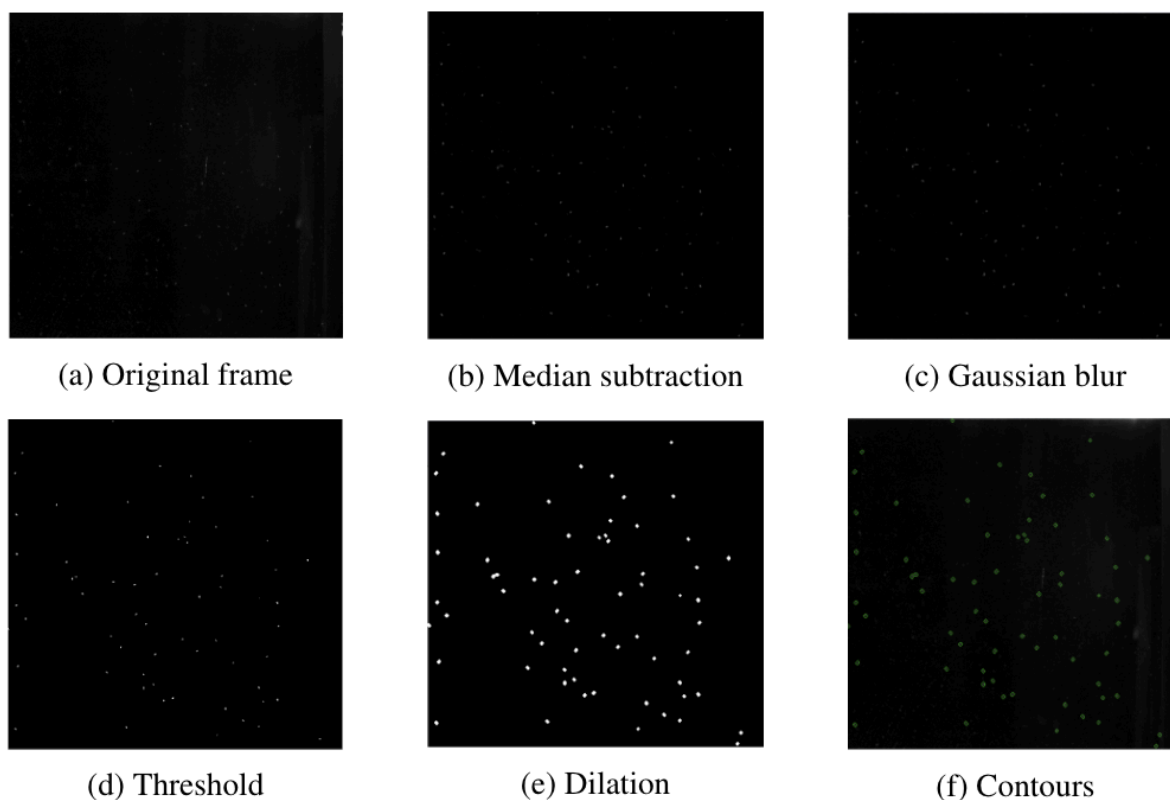
Dette arbeidet er gjennomført av Live Forfang Bjørnstad og Maria Solstad, begge masterstudenter ved Institutt for marin teknikk ved NTNU og deltagere i Profylax-prosjektet. For en mer detaljert beskrivelse av dette arbeidet, se (Bjørnstad & Solstad, Pre-print).

For å analysere alle forsøkene var det først nødvendig å hente ut posisjonen til alle kopepodittene under forsøkene. For deteksjonsforsøkene var det for mange kopepoditter i racewayen og for få bilder i sekundet, til at en algoritme kunne spore alle individer til enhver tid. Derfor var fokuset for bildegjenkjenning av kopepoditter i deteksjonsforsøkene å finne posisjonen til individer i de enkelte bildene. For sporingsforsøkene var det færre individer i racewayen og flere bilder i sekunder, noe som tillot algoritmen å spore hver enkelt lus gjennom hele forsøket og dermed gi hver enkelt lus et «svømmemønster».

Deteksjonsforsøk

For å ekstrahere data fra hvert deteksjonsforsøk ble alle pixlene i bildefilene gjort om til x - og y -koordinater, hvor x -aksen representerer lengderetningen i racewayen (avstand til lyskilden), mens y -aksen representerer bredden av racewayen. En deteksjonsalgoritme ble utviklet for å kunne hente ut xy -koordinater til alle lusene i racewayen. Disse dataene ble senere brukt til plotting av posisjon og forflytning over tid. En utfordring med denne metoden var å skille kopepodittene fra bakgrunnsstøyen i bildet. Dette ble løst ved å fjerne statisk informasjon fra hvert enkelt bilde (mediansubtraksjon) og konvertere bildene til binære bilder. I et binært bilde blir hver enkelt piksel klassifisert som enten hvit eller svart, se Figur 16.

For å avgjøre om pikslene skulle bli svarte eller hvite, ble det satt opp en terskelverdi for gjenkjenning, hvor pixler over en gitt verdi ble hvite og resten av pixlene ble svarte. Når alle bildene var konvertert til binære bilder kunne algoritmen detektere kopepodittene ved å gjenkjenne lyse felter innenfor et visst areal. xy -koordinatene til disse deteksjonene ble deretter hentet ut for videre analyse. De individuelle forflytningene av disse xy -koordinatene ble ikke sporet av algoritmer fra bilde til bilde, og må derfor sees på som forflytning av populasjonen i sin helhet. (Bjørnstad & Solstad, Pre-print).



Figur 16 Stegene i bildegjenkjenning fra original frame/bilde, til detektert lus. Hentet fra (Bjørnstad & Solstad, Pre-print), gjengitt med tillatelse.

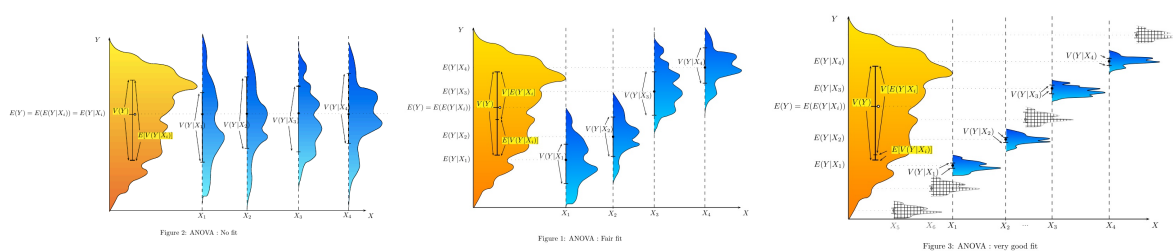
Sporingsforsøk

For sporingsforsøkene ble samme metode for bildegjenkjenning anvendt, men her kunne man spore hver enkelt kopepoditt ved bruk av en ekstra sporingsalgoritme. Denne algoritmen tok utgangspunkt i de koordinatene som deteksjonsalgoritmen hentet ut og disse ble videre brukt for å kartlegge «banen» til hver enkelt kopepoditt. Måten dette ble gjort på er at algoritmen sammenlignet to etterfølgende bilder og sammenlignet «objektforflytningen» fra det ene til det andre bildet. For hvert detekterte objekt i bilde i ble avstanden kalkulert til alle detekterte objekter i bilde $i-1$. Objektets koordinater ble så lagt til i banen tilhørende det objektet i bilde $i-1$ hvor avstanden er kortest. Om avstanden var lengre enn kroppslengden til kopepoditten, ble det opprettet en ny bane, som ikke kobles til tidligere deteksjoner. Når alle bildene var loopet gjennom, ble alle banene undersøkt manuelt og de alle korteste banene ble slettet, da dette kan ha vært mislykkede deteksjoner. De resterende banene ble brukt til å regne ut hastighet, banelengde og hvor målrettet kopepodittenes svømmemønster var.

A.4 Statistiske metoder

Dette arbeidet er gjennomført av Elisabeth Børset, masterstudent ved Institutt for matematiske fag ved NTNU og deltager i Profylax-prosjektet. De statistiske metodene brukt i denne studien er på dette tidspunkt ikke ferdigstilte, og dette vedlegget gir derfor bare et bilde av de tentative metodene, samt en indikasjon på hva vi opprinnelig ønsket fra den statistiske innfallsvinkelen (især sporingsforsøkene). For en mer detaljert beskrivelse av de ferdigstilte metodene, se (Børset, Pre-print).

Generelt for både deteksjons- og sporingsforsøkene kan man si at den overordnede nullhypotesen (H_0) tilsier at forklaringsvariablene ikke har noen betydning for tendens til bevegelse mot lyskilden (respons), mens H_1 tilsier at forklaringsvariablene har betydning for respons. Disse hypotesene svarer til forskningsspørsmål 1 og 2 fra innledningskapittelet. For å kunne beholde eller forkaste H_0 må man se på den interne spredningen av respons innad i en serie med forsøk (bølgelengde, intensitet og pulsering), sammenlignet med den totale spredningen til alle forsøkene (alle kombinasjonene innad i et replikat). Dersom den interne spredningen innenfor en serie er liten, sammenlignet med den totale spredningen (Figur 17), kan vi forkaste H_0 og beholde H_1 .



Figur 17 Intern spredningen av respons innad i en serie med forsøk vs. den totale spredningen til alle forsøkene. Til venstre sees stor spredning av respons innad i serien, i midten ser man liten grad av spredning og til høyre ser man veldig liten grad av spredning innad i hver serie. Hentet fra (Wikipedia, 2019)

For forskningsspørsmål 3 og 4 kan man sette enda en nullhypotese: Heterogenitet og diffusjon innad i populasjonen avhenger ikke av forklaringsvariablenes sammensetning. Dette kan ikke undersøkes i deteksjonsforsøkene men må sees nærmere på ved å analysere sporingsforsøkene.

Deteksjonsforsøk

Utgangspunktet for de innledende statistiske analysene er å undersøke hvilke faktorer som påvirker tendensen til å bevege seg mot lyskilden. Som utgangspunkt for tendens brukes hastighet, v . Datamaterialet som ble sendt til analyse inneholder både x - og y -verdier, men det er kun x -verdiene som ble benyttet i analysen da hovedfokus for deteksjonsforsøkene er bevegelse mot lyskilden plassert i enden av racewayen.

Her vil x_0 betegne gjennomsnittsverdi for alle identifiserte lus og alle målinger de første 3 minutt før lyset slås på. Videre vil x_t betegne gjennomsnittsverdi for alle identifiserte lus og alle målinger i t 'te minutt etter at lyset er slått på. Til slutt vil x_T betegne gjennomsnittsverdi for alle identifiserte lus og alle målinger det siste minuttet forsøket pågår. Gjennomsnittlig svømmehastighet i t 'te minutt vil da være $v_t = x_t - x_{t-1}$. Eventuelt kan man beregne distanse ved $s_t = x_t - x_0$. Etterhvert som lusene nærmer seg lyskilden, vil den systematiske forflytningen mot lyskilden opphøre. Det betyr også at v_t vil avta med økende t . I de første statistiske analysene er det for hvert forsøk, i , beregnet gjennomsnittlig svømmehastighet i tiden fra lyset settes på til forsøket avsluttes. Det vil si at svømmehastighet for forsøk i beregnes ved $v_i = (x_T - x_0)/T$. Eventuelt kan man også beregne distanse for forsøk i ved $s_i = x_T - x_0$.

For denne metoden vet vi allerede at det vil være en del svakheter: kopepodittene forsvinner i refleksen fra IR-lyset, de forsvinner når de når akvarieveggen ved lyskilden, de kunne svømt lengre og noen har gått i andre enden av racewayen (trolig mot en refleks).

Det kan derfor være en mulighet å se på en alternativ modell til v_i , hvor man ikke ser på svømmehastighet, men posisjonering i racewayen, hvor man kan gjøre disse antagelsene:

- De fleste svømmer mot lyskilden
- Noen svømmer mot den andre enden, kan tiltrekkes av refleks i motsatt ende, og svømmer da fra lyskilden
- Dersom det er systematisk tiltrekning vil vi anta at andelen av kopepoditter som er enten i de 5 nærmeste cm til lyskilden eller de 5 fjerneste, er stor, mens de som er mellom 5 og 35 cm («mellomsonen»/ y_i) er få.

Her kan man da telle opp antall kopepoditter i y_i . Dersom ingen effekt (H_0), bør y_i være 75%, det vil si rundt 150 kopepoditter, mens dersom det er effekt (H_1), vil y_i være forholdsvis lav.

Sporingsforsøk

For å kunne svare på forskningsspørsmålene knyttet til heterogenitet i populasjonen og forventning og varians i diffusjonsligningen, kom jeg i innledende fase av denne studien med en «bestilling» til aktørene fra statistisk forsøksplanlegging og modellering. Vi var både ute etter å studere drift og terskelverdi mot lysrespons i en populasjon, men også individuelle responser. For de sistnevnte ville vi særlig vite mer om hva slags svømmemønster kopepodittene hadde, da det kunne si oss mer om hvor målrettet bevegelsen er mot en mulig vert. Her vil være interessant å se om disse mønstrene samsvarer med kjente stokastiske prosesser, som for eksempel Wienerprosessen. Dette arbeidet er ikke klart til levering av denne oppgaven, for en mer detaljert beskrivelse se (Børset, Pre-print)

Wienerprosessen er en probabilistisk modell hvor endringen i posisjon i et lite tidsintervall (for eksempel fra ett bilde til et annet bilde) er normalfordelt med forventning μ og standardavvik σ . Forventningen representerer driften i prosessen, det vil si hastigheten kopepodittene i snitt beveger seg mot lyskilden, mens standardavviket er et mål for variasjonen i svømmehastigheten. Det er av interesse å sammenholde μ og σ for å kunne si mer om hvor systematisk bevegelsen mot lyskilden er. Videre er det interessant å undersøke om μ varierer mellom kopepodittene. Til slutt er det også interessant å undersøke om hvordan Wienerprosessen beskriver bevegelsene sammenlignet med for eksempel den mer «rekeaktige» bevegelsen vi observerer med det blotte øye, i form av «sprang» eller «hopp» i bevegelsen mot en responskilde.

For sporingsforsøkene vil da en egen nullhypotese (H_0) kunne være at μ_{1-12} er like (liten heterogenitet), mens H_1 (stor heterogenitet) vil da være at mins én μ er forskjellig. Dersom μ er stor i forhold til σ er det rask respons, men om σ er stor i forhold til μ er det mye fram og tilbake.

Vedlegg B - Prosjektbeskrivelse Profylax

Profylax is an interdisciplinary collaborative project between NTNU and NMBU, aiming to reduce the infection rate of salmon lice in the Norwegian aquaculture industry. In order to develop an idea of mine, I initiated this project two years ago and managed to engage Øystein Evensen (professor at NMBU) and Asgeir Sørensen (professor at NTNU and director for CoE - AMOS) for the core team. The original intention of this project was to develop an artificial salmon, a remote operated vehicle (ROV), that could distract or possibly hijack infective stages of the marine copepod *Lepeophtheirus Salmonis*. By assembling several possible attractants and implementing these to the ROV, the robot would be able to attract and deflect lice, around the clock. Furthermore, we can construct new generations of this robot, which can retrieve and record health data, environmental registration, wound detection, lice count and escape prevention.

Today the project is housing five master students and has the total of twenty participating people from several disciplines. The current master projects will collaborate to investigate the attraction of salmon lice towards different artificial light sources. To facilitate an efficient research design, a new technology-based method is being developed as part of the project. In addition to facilitating the current project, this technology will be an important contribution to further research on Integrated Pest Management in the Norwegian aquaculture industry. Furthermore, a new non-invasive method of in vivo sea lice counting with advanced ROV-technology will be investigated.

During my initial development of this project, I managed to secure external financing from Arne Ruud and Bjørn Skjævestad at VESO, and this important support has been crucial for running this project. Profylax is now one of the strategic projects at “Taskforce salmon lice” at NTNU – Sealab and has been presented for the entire taskforce and its partners, <https://www.ntnu.edu/oceans/taskforce>. One of the main feedbacks from the audience was the successful integration of research groups from NMBU, AMOS, Taskforce salmon lice and Mathematical Science, NTNU.

Vedlegg C - FOTS-godkjenning

NTNU - Senter for fiskeri og Havbruk
Realfagbygget
7491 Trondheim

Att. Rolf Erik Olsen

Fakturaref: Prosjektnummer
90142601
Vår ref: 18/49362
Dato: 19.03.2019
Org.nr: 974767880

Statens tilsyn for planter, fisk, dyr og næringsmidler



VEDTAK OM BRUK AV FORSØKSDYR - FOTS ID 15366

Virksomhetsnummer 154: NTNU - Senter for fiskeri og Havbruk

Behandlet av Mattilsynet, 19.03.2019.

Saken gjelder

Søknaden er opprinnelig godkjent som en blokk søknad for å produsere lakselus og skottelus på laks. Formålet med endringssøknaden er å benytte 10 laks for å utvikle maskinsyn for lusetelling og individgjenkjenning av laks. Laks med lus vil bli bedøvd, merket med VIE (visible implanted elastomers), flyttet over i et eget kar for en periode på 1,5 t, hvor de blir filmet, før de flyttes tilbake.

Dokumenter i saken:

1. Endringssøknad, FOTS id 15366 datert 07.02. 2019
2. Tilleggsinformasjon, datert 11.03.2019 og 18.03.2019

Vedtak

Vi godkjenner endringen av forsøket slik den er beskrevet i endringssøknaden og tilleggsinformasjonen, jfr. Forskrift 18.juni 2015 om bruk av dyr i forsøk § 37, jf. § 6.

Begrunnelse

Vi vurderer at formålet med endringen av forsøket og bruken av dyr er tilfredsstillende beskrevet i endringssøknaden og tilleggsinformasjonen, slik at kravene i forsøksdyrforskriften § 10 (formål med forsøket), § 11 (metoder, teststrategier og endepunkter) og § 9 (erstatning, reduksjon og forbedring) er oppfylt. På bakgrunn av en vurdering av hvor nyttig deler av forsøket er i forhold til belastningen for dyrene mener vi at dyr ikke utsettes for unødvendige belastninger, jf. forsøksdyrforskriften § 1.

Vi klassifiserer forsøket fortsatt som lett belastende, fordi bedøvelse og VIE-merking, håndtering/flytting og filming, ikke forventes å få mer en helt forbigående belastning.

Vi minner om kravet om årsrapportering, jf. forsøksdyrforskriften § 36. Manglende rapportering vil kunne medføre tvangsmulkt.

Vi viser for øvrig til den opprinnelige godkjenningen av forsøket.

Vi krever inn et gebyr på 1565 NOK (+100 NOK i administrasjonsgebyr) for behandling av søknad om endring av forsøk med dyr, jf. forskrift 13. februar 2004 nr. 406 om betaling av gebyrer for særskilte ytelser fra Mattilsynet § 4.

Vedtak kan påklages til Mattilsynet, jfr. lov 10 feb 1967 om behandlingsmåten i forvaltningssaker (forvaltningsloven) § 28. Klagefristen er 3 uker fra mottak av dette brev, jfr. forvaltningsloven § 29. Klagen stiles til Mattilsynet, Hovedkontoret, men sendes via avdeling nasjonale oppgaver.

Mattilsynet
Avdeling nasjonale oppgaver

Saksbehandler: Gunvor Knudsen
Tlf.: 22 40 00 00
E-post: postmottak@mattilsynet.no
(Husk mottakers navn)

Postadresse:
Felles postmottak, Postboks 383
2381 Brumunddal
Telefaks: 23 21 68 01

www.mattilsynet.no



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway