



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen  
Marit Stormoen  
David Persson  
Håvard Bjørgen

Fordypningsoppgave 2019, 20 stp

Akvamedisin

## **Effekten av turbiditet i RAS-anlegg på gjellehelse målt i antall slimceller i gjellene hos atlantisk laks i settefiskproduksjon**

Effects of turbidity in RAS-systems on gill health measured in quantity of mucus cells in Atlantic salmon in the freshwater stage

Alexander Figenschou, Linn-Anett Hillestad  
Kull 2013

Marit Stormoen, David Persson, Håvard Bjørgen

# Innhold

Sammendrag .....	4
Definisjoner og forkortelser .....	6
Innledning.....	8
Materiale og metoder .....	14
Materiale.....	14
Metode for måling av siktdybde.....	15
Metode for uttak av prøvemateriale .....	15
Metode for preparering av histologiske gjellesnitt med PAS-farging (Periodic Acid-Schiff's farging) .....	16
Metode for telling av antall slimceller .....	17
Vurdering av primærlameller: .....	17
Rekkefølge for vurdering av primærlameller:.....	20
Telling av slimceller på sekundærlamellene: .....	20
Statistiske metoder .....	21
Metode for patologisk vurdering.....	21
Resultater.....	22
Morfometri – kvantifisering av slimceller i gjeller .....	23
Utvikling av protokoll for telling av mukusceller i gjeller.....	23
Sammenheng mellom siktdybde og slimcelleantall i gjellene .....	27
Slimcelleantall på anleggsnivå mellom uttakene .....	28
Regresjonsanalyse – Slimcelleantall, vekt og anlegg.....	28
Slimceller i gjennomstrømningsanlegg.....	30
Graden av patologiske forandringer .....	30
Diskusjon.....	31

Morfometri – kvantifisering av slimceller i gjeller .....	31
Sammenheng mellom siktdybde og slimcelleantall i gjellene .....	34
Endringer i slimcelleantall innad de ulike anleggene mellom uttakene .....	37
Forskjell mellom de ulike anleggene i mengden slimceller og ulik vekt på fisken .....	38
Slimceller i gjennomstrømningsanlegg. ....	39
Antall slimceller i gjellene som et mål på gjellehelse. ....	40
Graden av patologiske forandringer .....	41
Konklusjon .....	42
Takk til bidragsytere.....	43
Summary .....	44
Referanser.....	46

## Sammendrag

**Tittel:** Effekten av turbiditet i RAS-anlegg på gjellehelse målt i antall slimceller per gjellefilament hos atlantisk laks i settefiskproduksjon.

**Forfattere:** Alexander Figenschou og Linn-Anett Hillestad

**Veileder:** Marit Stormoen, David Persson og Håvard Bjørgen

I dette studiet ble det studert sammenhengen mellom turbiditet og antall slimceller i gjellene til atlantisk laks. Hypotesen var at høy turbiditet (og dermed lav siktdybde i vannkarene) i RAS-anlegg kan føre til økt mekanisk belastning på gjellene. Denne belastningen kan tenkes å gi en økning i antall slimceller. Gjeller fra totalt 220 fisk fra fem ulike resirkuleringsanlegg ble samlet inn. 20 fisk ble prøvetatt fra hvert anlegg med to ukers mellomrom (totalt 40 fisk fra hvert anlegg). En fiskegruppe fra et tradisjonelt gjennomstrømningsanlegg (n=20) ble også inkludert i studiet.

Resultatene viste en ikke-signifikant sammenheng mellom antall slimceller i gjellene og siktdybde i karene. Derimot ble det funnet sammenheng mellom slimcelletall i gjellene og hvilken lokalitet fisken kom fra. Lavest slimcelletall var det i gjennomstrømningsanlegget.

Det ble utviklet en standardisert metode for å telle slimceller i gjellene hos atlantisk laks. Av variablene dette studiet tok for seg var det anlegg og vekt som signifikant påvirket antall slimceller. Årsaken til den signifikante forskjellen i antall slimceller mellom de ulike anleggene skyldes trolig sammensatte faktorer som ulike driftsrutiner, ulik teknisk innredning og vannkvalitetsparametere, som alle er viktige parametere som påvirker gjellehelsen.

Gjellehelse i RAS-anlegg ble i fiskehelserapporten 2018 definert som et problemområde. I dette studiet ble det kun registrert ett individ med nevneverdige patologiske forandringer (betennelse og hyperplasi av sekundærlamellene), blant et relativt stort utvalg materiale. Dette

i seg selv er et interessant funn, selv om anleggene ikke var valgt tilfeldig. Det ble derimot påvist en signifikant sammenheng mellom lavere slimcelleantall og fisk fra gjennomstrømningsanlegg sett opp mot RAS-anleggene. Utvalget fra gjennomstrømningsanlegget var mindre enn i RAS-anleggene, som gir mindre styrke til dette resultatet og det kan derfor ikke trekkes noen faste konklusjoner angående gjellhelse i gjennomstrømningsanlegg i forhold til RAS-anlegg.

Resultatene viser til en forskjell i antall slimceller mellom anleggene og vekt på fisken. Videre studier trengs for å avklare om mengden slimceller kan brukes til å fortelle noe om gjellehelsen til fisk.

## Definisjoner og forkortelser

- **Mukusceller / slimceller** – En celle av epitelialt opphav som produserer mukus
- **Gjellebue** – Opphenget som utgjør rammeverket til de funksjonelle delene av gjellene.
- **Primærlamelle/gjellefilament** – To rader gjellevev med utspring fra hver gjellebue. Inneholder blodkar, brusk, nerver, epiteliale celler og mukusceller. De utgjør opphenget til sekundærlamellene
- **Primærlamelle basis** – Delen av primærlamellen nærmest gjellebuen.
- **Primærlamelle apeks** – Delen av primærlamellen som er lengst bort fra gjellebuen
- **Sekundærlamelle** – Små filamenter som er festet på primærlamellene. De står i 90 graders vinkel på primærlamellene og er hvor mesteparten av gassutvekslingen foregår.
- **Sekundærlamelle basis** – Delen av sekundærlamellen som er nærmest og festet til primærlamellen.
- **RAS-anlegg** – Recirculating Aquaculture System
- **Turbiditet** – Et mål på konsentrasjonen/mengden partikler som er i vannet. Defineres som mengden lys som refrakteres 90° når det passerer gjennom en vannsøyle.
- **Settefiskproduksjon** – Produksjonsfasen av laksefisk av arten *Salmo salar*, i ferskvannsfasen
- **Mekaniskfilter** – Filter for å fjerne store partikler fra vannet når det renses.
- **Biologiskfilter** – Filter med bakteriekultur- for nitrifiseringen av avfallsstoffet ammoniakk fra vannet.
- **Monmic / Monfisk** – Forskningsprosjektet som denne oppgaven er underlagt
- **Teleoster**: Beinfisker, hvor blant annet atlantisk laks fra laksefisken hører under.

- **PAS-farging** – Periodic Acid Schiff – Metode for farging av histologiske snitt, som brukes for deteksjon av polysakkarider som glykogen, mukosubstanser som glykoproteiner, glykolipider og musiner i vevet.
- **Rostrale del av gjellebuen** – De to delene av en gjellebue som er nærmest hodet til fisken (Figur 10).
- **Kaudale del av gjellebuen** – Den delen av gjellebuen som er høyest oppe i buen av gjellebuen og delen av gjellebuen som er lengst unna fiskens munn (Figur 10).
- **Glykogen** – Et polysakkarid som finnes i store mengder i mukus.
- **Glykoproteiner** – Proteiner som har sukkerrester bundet til peptidkjedene. Finnes i store mengder i mukus.
- **Proteoglykaner** – Et molekyl der et protein har festet ett eller flere lineære polysakkarider til seg, finnes bla i store mengder i mukus.
- **Slimhinne/mukosa** – Et vev som kler den ytre overflaten av gjellene. Slimhinnen består av epitelceller, en basalmembran og slimceller.
- **Kolloid** – en væske som inneholder partikler som på størrelser mellom 0,001 og 1µm i størrelse
- **Intralammelærtrom** – Rommet mellom to sekundærlameller på primærlamellen.
- **Observatør** – En av personene som leste av snitt og talte slimceller.
- **Tellevariasjon** – Forskjellen i antallet slimceller talt i et snitt mellom to observatører.
- **Cut-off verdi** – En grenseverdi eller terskelnivå
- **Morfometri** – En kvantitativ analyse av noe på basis av morfologi
- **Hyperplasi** – Økning i antall celler

## Innledning

Atlantisk laks (*Salmo salar*) er et viktig produksjonsdyr i Norge og er rangert som nasjonens nest største eksportprodukt etter olje. I dag kommer i underkant av fem prosent av maten vi spiser fra havet. Laksefisk er svært energieffektive og utnytter tilførte næringsstoffer mye bedre enn andre, mer tradisjonelle husdyr (1). Jordens befolkning er stadig økende, og det settes stadig høyere krav til næringsrike og bærekraftige proteinkilder som skal kunne dekke behovet i dag og i fremtiden. Av miljø- og klimamessige grunner må andelen mat som produseres i havet øke for å møte kravet om høyverdig proteiner til den nåværende økende befolkningen og kommende generasjoner (2).

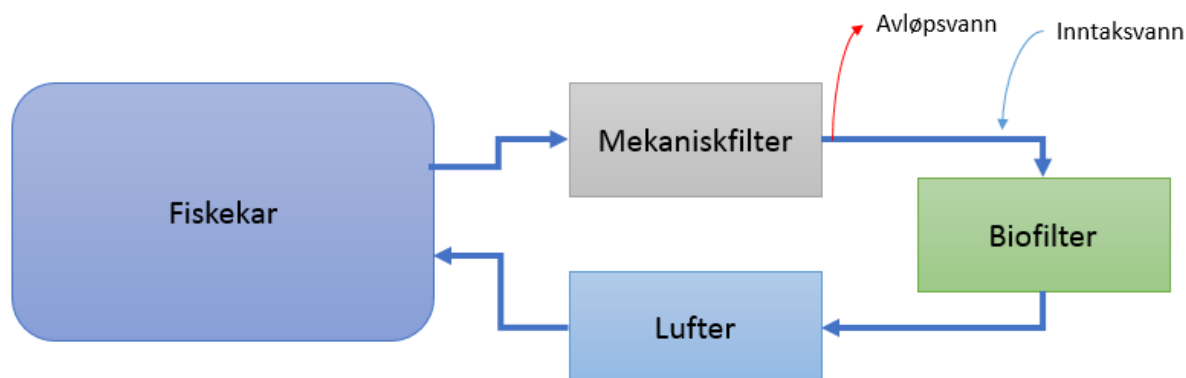
For ytterligere vekst i oppdrettsnæringen bør det være en forutsetning at laksen har god helse (3). Ny teknologi og sykdomskontroll blir enda viktigere i fremtiden når både miljøhensyn og dyrevelferd skal ivaretas. Produksjon av settefisk med god helse er helt avgjørende for den videre utviklingen til slakteklar fisk. Et godt utgangspunkt i tidligere livsstadier har vist å gi fisk som er mer motstandsdyktige mot sykdom, utnytter fôret bedre, gir bedre potensiale for vekst, bedre dyrevelferd og derved også større økonomisk gevinst for produsentene (4).

### Produksjon av settefisk

Tradisjonelt har produksjonen av settefisk foregått i gjennomstrømningsanlegg. Gjennomstrømningsanlegg krever store vannressurser og har store begrensninger med tanke på geografisk lokalisasjon, når anlegget må ligge i nærheten av en vannkilde (5). Resirkulering i akvakultur (RAS) er ny teknologi, hovedsakelig brukt i produksjon av settefisk, men som nå også er tatt i bruk for hele produksjonssyklusen av fullmoden slakteklar fisk. RAS-anlegg er ikke avhengig av de samme begrensende vannressursene som et gjennomstrømningsanlegg. Et resirkuleringsanlegg bygger på prinsippet om gjenbruk av vann (se Figur 1). Det er i utgangspunktet ikke noen nedre grense for vannbruk i et resirkuleringsanlegg da dette beror på hvor omfattende vannbehandlingen er i systemet. I praksis er gjenbruksandelen 95-99% (6). Det biologisk aktive biofilteret spiller en essensiell rolle i RAS-teknologi (7). Det er mange fordeler, men også nye utfordringer ved å bruke RAS-teknologi. Erfaringene så langt er at RAS-teknologien krever enda større fokus på biosikkerhet for å sikre sykdomsfri fisk og smittefritt vann (8). RAS-teknologien er mer



miljøvennlig med hensyn til bruk av ferskvann som en vannressurs og gir bedre kontroll over det akvatiske miljøet i anlegget.



Figur 1 Skjematisk figur av et resirkuleringsanlegg.

RAS-anlegg krever mer kunnskap og oppfølging enn tradisjonelle gjennomstrømningsanlegg. Konsekvensene kan bli store dersom en eller flere av delene i rensesystemet ikke fungerer slik som det skal (9). Fiskens helse og velferd vil avhenge av mange faktorer i et RAS-anlegg. Fôring av fisken vil i stor grad være det som bestemmer belastningen som systemet utsettes for og dermed behovet for behandling og dimensjoneringen av vannbehandlingen. Fiskens metabolisme vil påvirke vannkvaliteten i driftsvannet ved at fôret blir omdannet til karbondioksid, TAN (total ammonium nitrogen), avføring og urea som skilles ut i vannet. Vannbehandlingen i et resirkuleringsanlegg må kontinuerlig fjerne stoffene som tilføres for å unngå konsentrasjoner som potensielt kan være skadelige for fisken. TAN fjernes fra vannet av bakterier som tilhører familien *Nitrospora* som kultiveres i det biologiske filteret og bruker TAN og nitritt som energikilder. Bakteriene omsetter TAN fra nitritt til nitrat ved tilgang på oksygen (10). Avføring fra fisken og eventuell overfôring fanges skånsomt opp og fjernes så raskt som mulig fra vannet. Partiklene fanges opp i det mekaniske filteret. Karbondioksid fjernes ved utlufting. Organisk materiale akkumuleres til en viss grad i resirkuleringsanlegg som en følge av overfôring, fôrstøv, avføring og avskalling av biofilm fra overflater i systemet (11).

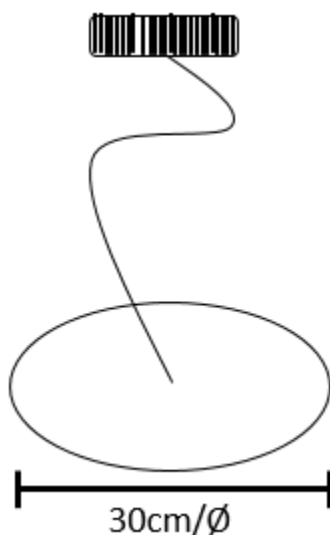
Organisk materiale fungerer som vekstmateriale for bakterier, noe som kan medføre bakteriellvekst ved dårlig renhold. Nedbrytningen av organisk materiale gir økt oksygenforbruk og økte nivåer av karbondioksid og ammoniakk. Fisk tåler høyere konsentrasjon av nitrat i forhold til ammoniakk og nitritt. Stor partikkelmengde i vannet vil

også redusere effektiviteten av desinfeksjon med UV og ozon. Et suboptimalt RAS-anlegg vil ikke fjerne partiklene i vannet i tilfredsstillende grad. Økt partikkelmengde i vannet gir økt turbiditet (11).

### **Turbiditet**

Turbiditet er et mål på mengden partikler i vann. Turbiditet kan defineres som mengden lys som refrakteres 90° når det passerer gjennom en vannsøyle (12). En annen måte å måle partikkelmengde på er ved å bruke en secchi skive (se Figur 2). Secchidybden bestemmes av døde uorganiske partikler og fargede organiske materialer som feces og fôrrester (13).

Flere studier har vist at det er korrelasjon mellom secchi dybder og turbiditet deriblant artikler av Davies et al (14) og Håkonsen et al (15). Økt turbiditet vil gi dårligere vannkvalitet og trolig ha en negativ effekt på fiskehelsen, blant annet gjellehelse.



**Figur 2** Skjematisk fremstilling av en Secchi skive

### **Påvirkning av gjeller**

Gjellehelse er en stadig økende utfordring hos oppdrettsfisk og i RAS-anlegg (16). Gjelleepitelet utgjør en like stor overflate som huden til fisken og utgjør dermed en hovedrolle i å ivareta fiskens indre homeostase. Selv små strukturelle forandringer kan gi store problemer med osmoreguleringen og gi respiratoriske problemer (17). Gjellesykdom kan påvirke fiskens vekst og redusere fiskens immunologiske barriere slik at fisken blir mer mottagelig for andre sykdommer (18).

Da gjellesykdommer ikke er meldepliktige er tallfesting av hvor mange anlegg som blir rammet hvert år usikkert. I følge fiskehelse rapporten 2018, er det et større gjellehelseproblem i resirkuleringsanlegg enn i gjennomstrømningsanlegg. Årsaken til gjellesykdom kan være tydelig og skyldes én enkelt faktor, men ofte vil flere faktorer opptre samtidig og i ulike kombinasjoner. Resultatet er at manifestasjonene kan være komplekse og vanskelige å tolke (19).

### **Gjelle anatomi og fysiologi**

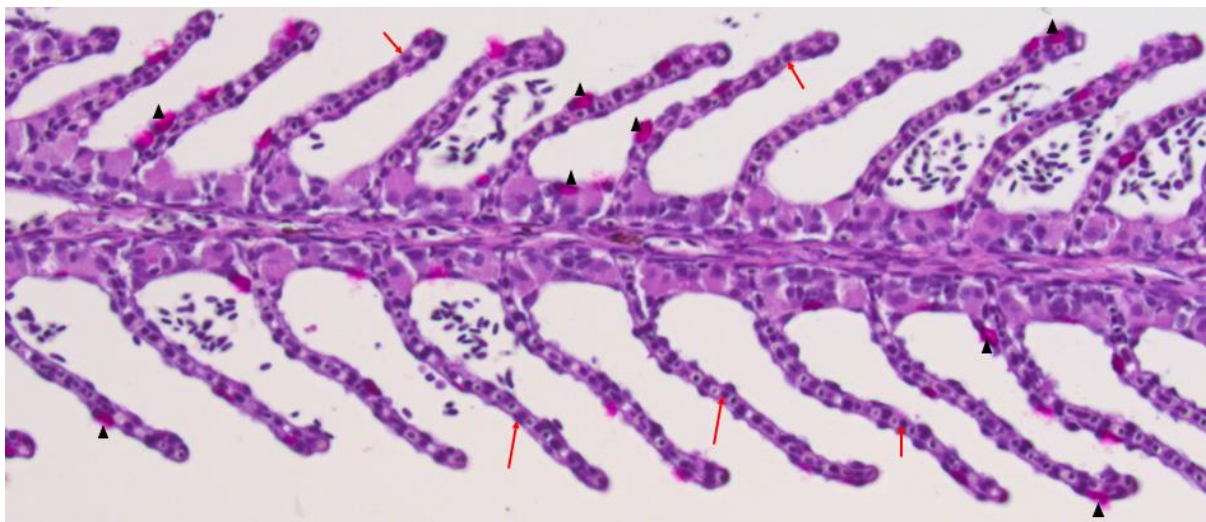
Gjellene er fiskens respiratoriske organ, men er også viktig for opptak og utskillelse av andre stoffer. Gjellene har flere par gjellebuer som sitter i bakre del av munnhulen, ved siden av svelget. Primærlameller, også kalt gjellefilamenter sitter på gjellebuene i rader. På primærlamellene sitter de sekundære lamellene, de sitter i rader vinkelrett på og på begge sider av primærlamellene, det er her gassutvekslingen foregår (20).

Sekundærlamellene til teleoster er anatomisk komplekse strukturer. De er hovedstedet der gassutveksling foregår, men det foregår også i noen grad gassutveksling i primærlamellene og gjellebuen. Gjellene har flere andre funksjoner; syre-base balanse, ioneregulering, ammonium-regulering, immunforsvar, hormonproduksjon, og metabolisme av forskjellige sirkulerende metabolitter (21).

Opptak av oksygen fra miljøet involverer diffusjon av gass fra vannet gjennom gjellepitelet og inn i blodet. Sekundærlamellene har en plateaktig morfologi som maksimerer overflateområdet samtidig som det minimerer diffusjonsdistansen og dermed tillater en effektiv og hurtig gassutveksling mellom blod og vann. Blodet, som strømmer i motsatt retning i forhold til strømmen av det ventilerende vannet, dette blir gjort mulig av pilarcellene. Pilarcellene er gjennomgående i hele sekundærlamellene og utgjør «reisverket» til sekundærlamellene og binder sammen det respiratoriske epitelet på begge sider (Figur 3). Vann-blod barrieren består av ett eller flere lag av epitelceller, en basalmembran og deler av pilarcellene som danner den indre lumen av sekundærlamellen (21).

Spredd i gjellepitelet finnes slimceller som produserer slim. Slimet er viktig for mekanisk og immunologisk beskyttelse av lamellene. Slim er et viskøst kolloid som inneholder uorganiske salter, antiseptiske enzymer (som for eksempel lysozymer), immunoglobulin M (IgM) og glycoproteiner som er med på å beskytte mot infeksjose agens som sopp, bakterier og virus.

(22). Slimproduksjon hjelper å beskytte de epiteliale barrierene ikke bare mot infeksjon men også dehydrering og fysisk og kjemisk skade (23).



**Figur 3 Primærlamell med sekundærlameller på hver side. De røde pilene peker på pilarceller. De svarte trekantene markerer PAS-positive slimceller.**

Slimceller sekreterer produktet gjennom kanaler som kommuniserer med den ytre gjelleoverflaten, gjennom et møtepunkt av tre eller flere epitelceller. Sekrerte mucosomer brytes ned for så å frigjøre innholdet. Når mucinet kommer i kontakt med vann dannes det en viskøs gel (24).

Ved ulike irritasjonstilstander vil disse cellene kunne proliferere (25). Produksjon av mukus øker når gjellene blir utsatt for forurensning eller parasitter, likeledes både kvalitative og kvantitative variasjoner kan sees ved andre forandringer i vannkvaliteten som ammonium og kalsiuminnhold. Økning i antall, distribusjon og størrelse av slimcellene er rapportert ved mange forskjellige typer gjell sykdommer, på samme måte som det er i øvre luftveislidelser hos pattedyr (24).

Selv om dette er i utgangspunktet en beskyttende respons, ved for eksempel å hindre muligheten for patogener å nå det underliggende epitelet eller å ha en bedre effekt på fjerning av fremmede partikler, kan det også føre til negative effekter. Økt slimproduksjon vil gi en økt tykkelse av slimlaget. Dette kan påvirke strømmen av vann gjennom gjellene og vil mest sannsynlig påvirke gass og ioneutvekslingen negativt (24).

### **Mål for denne oppgaven**

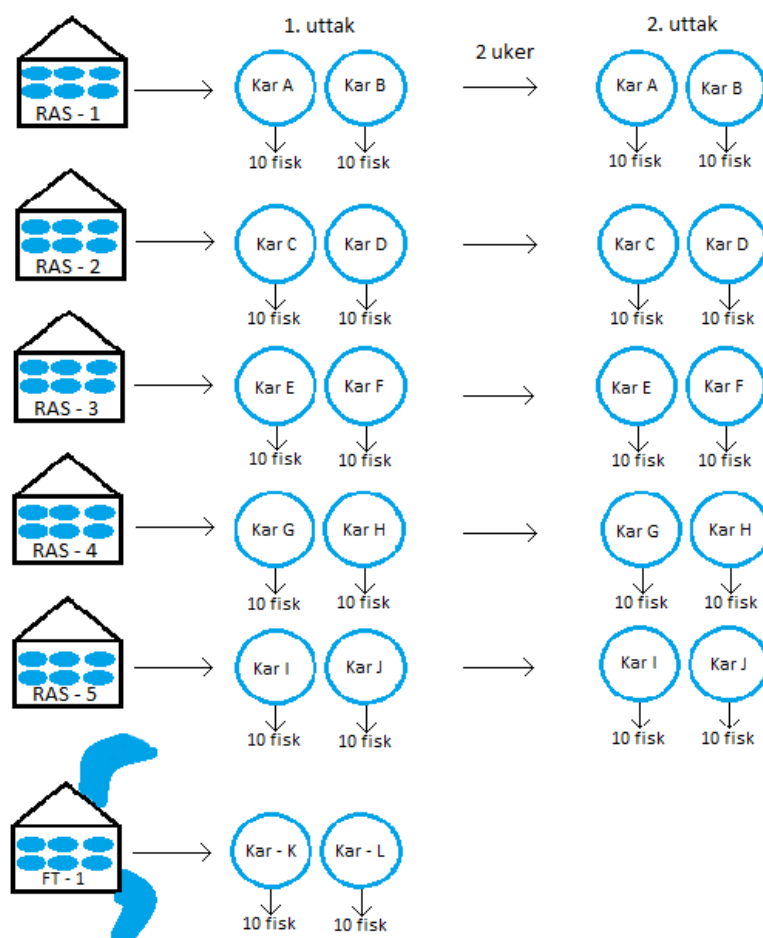
Det er fortsatt usikkert hvordan gjellene, som er svært delikate strukturer, påvirkes av vannkvaliteten. Det er derfor svært interessant å se om det finnes en sammenheng mellom antall slimceller og mengden partikler i vannet. Det vil i så fall være kunnskap som kan brukes til å forbedre driftsforholdene ved RAS-anleggene og dermed bidra til bedre fiskehelse. For å undersøke denne sammenhengen, trengs en standardisert metode for å telle slimceller på. Speare et al 1997 gjorde en studie der de så på blant annet antallet slimceller etter en tenkt profylaktisk formalinbehandling mot bakterier, virus, sopp og parasitter. De utviklet en slimcelleindeks basert på antall slimceller per primærlamell (26). Denne metoden ble brukt som grunnlaget for videreutvikling av en metode for å telle slimceller i gjellene.

Hovedmålet med dette studiet er å undersøke om økt turbiditet (målt i siktdybde) gir et økt antall slimceller i gjellene hos settefisk i RAS-anlegg. Videre er første delmål å utarbeide en metode for å telle slimceller. Andre delmål er å undersøke graden av histopatologiske forandringer i klinisk friske gjeller fra settefisk i RAS-anlegg.

## Materiale og metoder

### Materiale

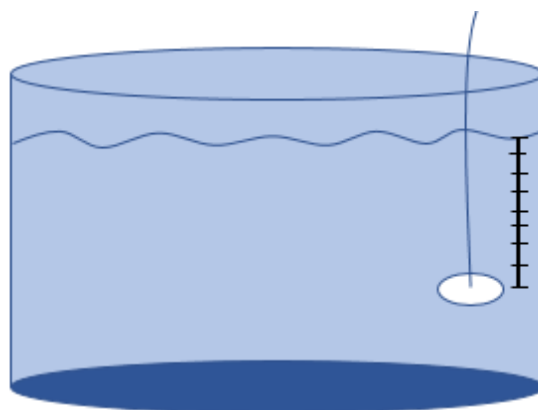
I dette studiet ble det samlet inn gjelleprøver fra 40 fisk ved fem forskjellige RAS-anlegg (totalt 200 fisk). Hvert RAS-anlegg ble besøkt to ganger med 14 dagers mellomrom. Ved første besøk ble det tatt ut 10 fisk fra to ulike kar og ved det andre besøket ble det tatt ut 10 fisk til fra de samme karene. Det ble gjort ett uttak fra et gjennomstrømningsanlegg (FT – 1) på 20 fisk. Alle uttak ble gjort på klinisk frisk fisk, uten synlig sykdom eller patologiske forandringer. Av de 220 fiskene ble det preparert ett histologisk snitt fra hvert individ. Det ble i dette forsøket lagd vellykkede snitt av 211 av fiskene, vekt og lengde ble registrert på 219 av fiskene.



Figur 4: Skjematisk figur av materialeinnsamling

## Metode for måling av siktdybde

Siktdybde ble målt i hvert av karene ved hvert uttak. Det ble anvendt en modifisert secchi skive; en loddet, hvit plast disk med diameter på 30cm/Ø (se Figur 2). Disken ble nedsunket i karene helt til den ikke lenger var synlig, dette ble gjort der det ble opplevd å være minst strøm i karet. Deretter ble avstanden fra punktet man ikke lengre kunne se disken og lengden opp til vannoverflaten registrert (Secchidybden) (se Figur 4). I kar der secchi skiven var synlig helt ned til bunnen av karet, ble den totale vannhøyden i karet registrert.



Figur 5 Måling av secchi dybde

## Metode for uttak av prøvemateriale

Fisk ble håvet ut tilfeldig i forskjellige dybder og steder av karet. Fiskene ble sedert (Finquel vet, Scan Aqua), i et samlekar før de ble avlivet med en overdose Finquel vet. Avlivningsmetoden ble valgt for å unngå unødig mekanisk skade på gjellene. Fisk med makroskopiske lesjoner på gjellene ble ekskludert fra studiet og erstattet med et annet tilfeldig individ. Vekt og lengde ble registrert.

Fisken ble lagt med sin høyre side ned. Rostrale del av 2. gjellebue ble fiksert ved hjelp av en pinsett og gjellebuen ble forsiktig klippet fri fra gjelleopphenget. Den frie gjellebuen ble så klippet fri fra pinsettens grep, slik at resterende del av gjellebuen falt direkte ned i et glass

med 10% formalin. Dissekeringen ble gjort på denne måten for å hindre unødig mekanisk skade på vevet.

## **Metode for preparering av histologiske gjellesnitt med PAS-farging (Periodic Acid-Schiff's farging)**

Etter formalinfiksering, ble prøvene makrodissikert (ca 1x 1 x 0.4cm) og lagt i kassetter for fremføring. For å dehydrere prøvene, ble kassetene fremført over natten (standard fremføringsprogram) og påfølgende dag støpt inn i parafinblokker. Hver enkelt gjelleprøve ble støpt inn i hver sin blokk i standard orientering (lateralt til medialt).

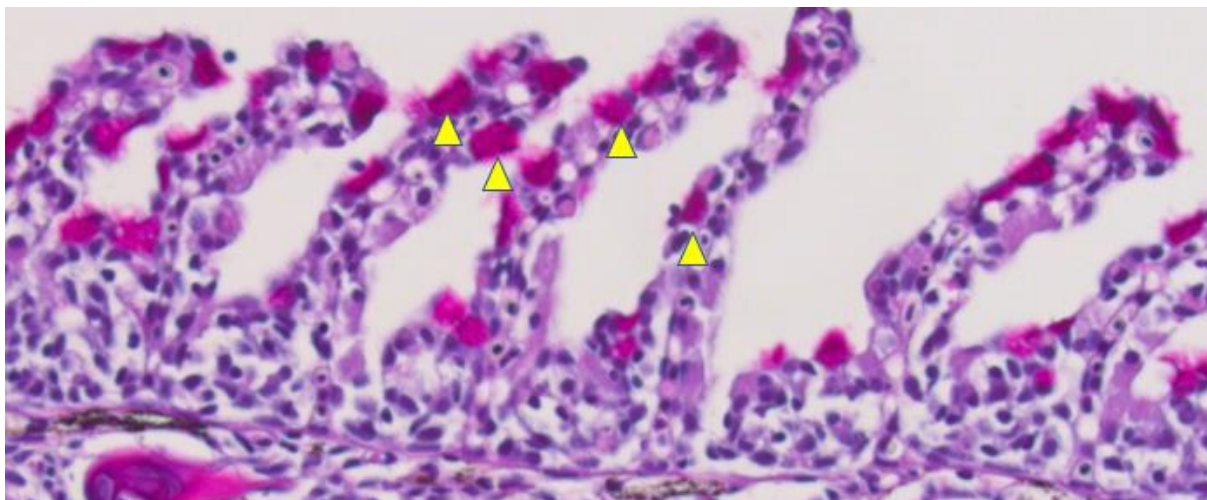
Snitt ble skåret på mikrotom, overført til alkoholbad og strukket i vannbad (40°C), før overføring til objektglass. Snittene tørket på 37°C i minst ett døgn før farging med PAS (Periodic Acid-Schiff's) for deteksjon av glykogen, glykoproteiner og proteoglykaner.

### Metode for PAS-farging:

1. Xylen 2x5min
2. Snittene føres til vann via synkende etanolkonsentrasjon (100% - 96% - 70%)
3. Oksideres 10 min i 1% perjodsyre
4. 10 min i vann
5. Farges 2 min i Schiff's reagens
6. 10 min i vann
7. Farges i 2 min i Mayers hematoxylin
8. 10 min i vann
9. Snittene føres til xylen via økende etanolkonsentrasjon (70% - 96% - 100%)
10. Montering av snittene



Fargingen ble tolket dit hen at PAS-positiv substans ble rød til rosa, mens kjernene ble blå (Figur 6).



**Figur 6** Sekundærlameller; gule trekanter peker til PAS-positive celler

## **Metode for telling av antall slimceller**

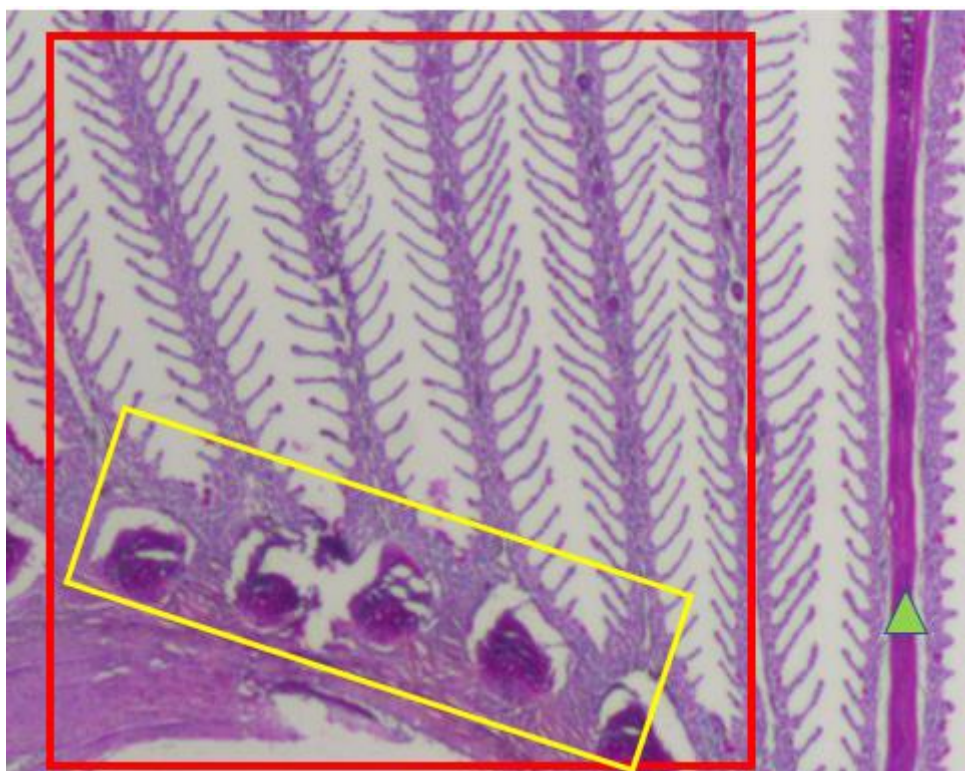
Etter preparering og PAS-farging ble prøvene omkodet og prøveanalysene ble utført blendet for avleser. Snittene ble teknisk vurdert makroskopisk og mikroskopisk på lav forstørrelse (10x), for å vurdere egnetheten til telling av slimceller. Vevsarkitektur, fiksering, feilsnitting (skråsnitting) og farging ble vurdert og snittene ble enten godkjent eller underkjent for telling. Underkjente snitt ble kastet og det ble preparert nye snitt.

### **Vurdering av primærlameller:**

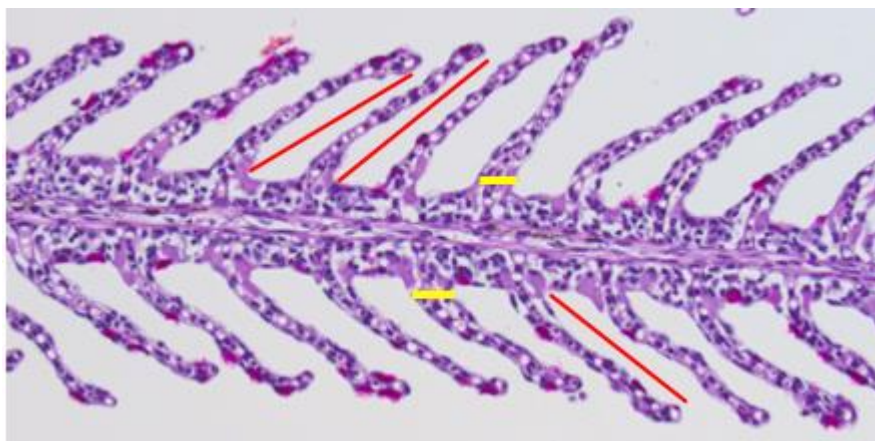
Snittene ble studert på høyere forstørrelse (40x), og det ble valgt ut tre egnede primærlameller for telling. Vurdering av primærlamellene startet med primærlamellen nærmest det mest kaudale punktet på gjellebuen (Figur 10). Primær- og sekundærlamellenes morfologi ble evaluert, hovedsakelig ved basis av primærlamellene, og følgende kriterier ble fulgt for vurdering av lamellene:

1. Normal gjelle morfologi (Figur 7).
2. Basis av primærlamellen skal være intakt og tydelig forbundet til gjellebuen (Figur 7).

3. Sentrale områder i basis av primærlamellen skal ikke inneholde brusk (Figur 7 og Figur 9).
4. Det skal være frie og individuelle sekundærlameller på begge sider av primærlamellen, uten sammenvoksinger eller manglende sekundærlameller (Figur 8 og Figur 9)
5. De første 20-26 sekundærlamellene fra basis av en primærlamell skal være symmetriske i lengde og bredde. Symmetrien gjelder både for sekundærlamellene innad i sidene av primærlamellen og mellom de to sidene av primærlamellen. Størrelsesavvik i lengde og bredde kan ikke overgå  $1/3$  av størrelsen av den største sekundærlamellen i tellelengden (Figur 8)
6. Telling av sekundærlameller kan starte ved sekundærlamell nummer seks fra basis dersom de fem nærmere basis ikke oppfyller kriteriene overfor.
7. Ved et tvilende tilfelle skal en annen primærlamell velges, selv om det betyr at et nytt snitt må prepareres.

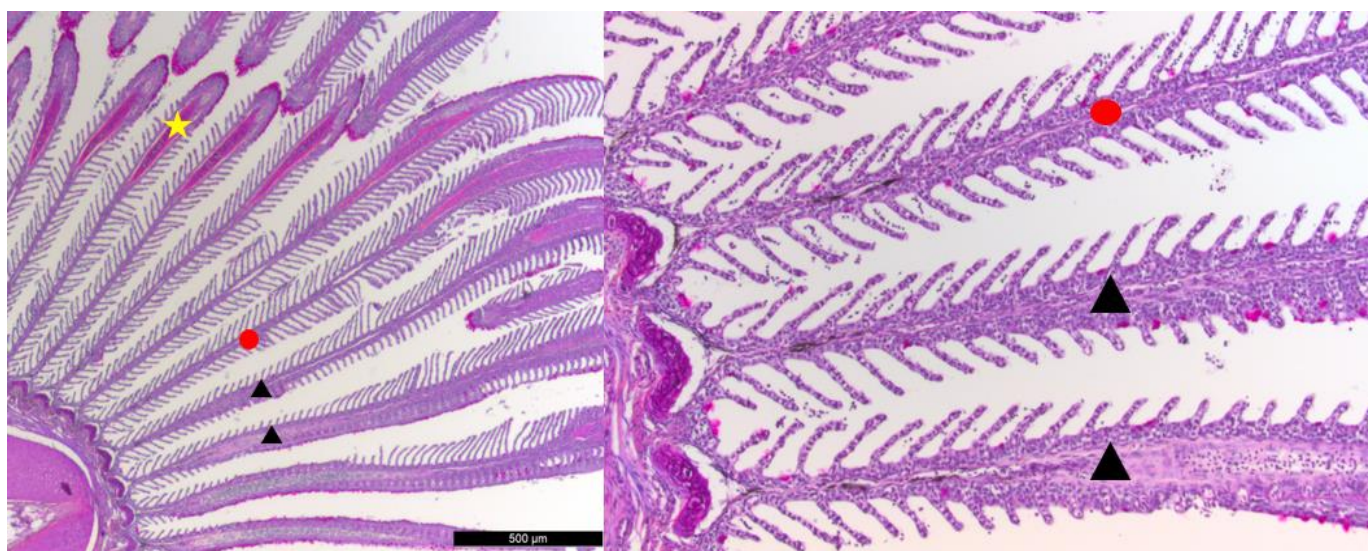


**Figur 7** Beskrivelse av utvelgelse av primærlameller (Regler 1-3): Rød boks viser tilnærmet normal gjelle morfologi, gul boks viser at basis av primærlamellene er intakte og forbundet til gjellebuen, grønn trekant viser brusk sentralt i en primærlamell



**Figur 8** Beskrivelse av utvelgelse av primærlameller (Regler 4 og 5): Frie sekundærlameller uten sammenvoksninger eller annen patologi, Røde streker viser symmetriske lengder på begge sider av primærlamellen, gule streker viser symmetri av bredden på sekundærlamellene.

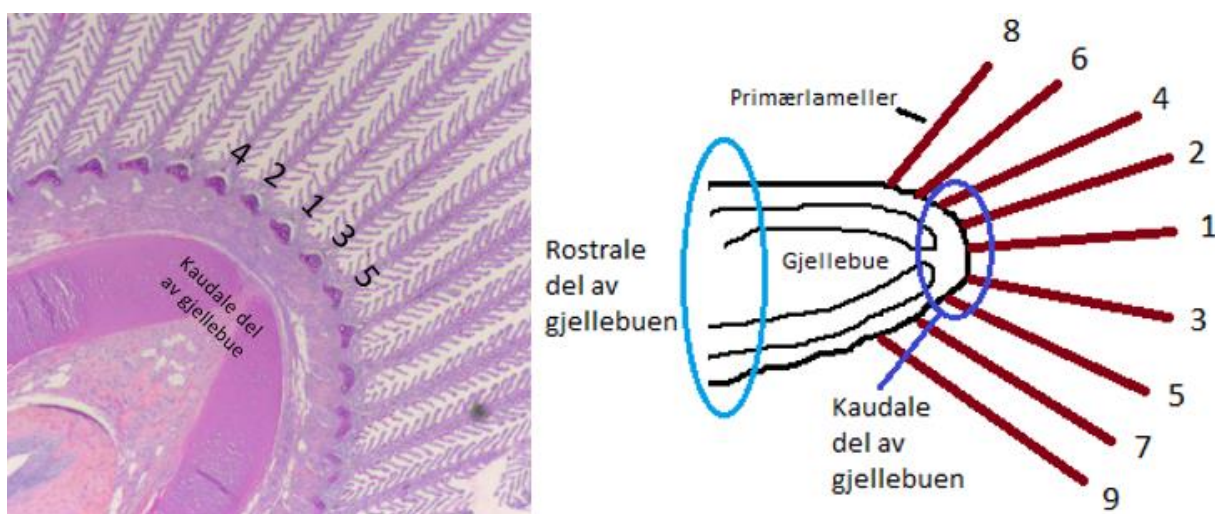
Primærlameller som møtte alle disse kriteriene ble inkludert i tellingen. Dersom ett eller flere av disse kriteriene ikke var oppfylt, ble primærlamellen ekskludert fra tellingen og neste primærlamell ble vurdert etter samme kriterier. Dersom det ikke fantes tre primærlameller som tilfredsstilte alle kriteriene, ble det skåret og farget et nytt snitt fra det gjeldende individet.



**Figur 9** Samme gjellesnittet på forskjellig forstørrelse. Gul stjerne: lamell som er kuttet for skrått slik at brusken er kommet med. Rød sirkel: En lamelle som er kuttet på en tilfredsstillende måte. Trekant: lameller som er kuttet for skrått

### Rekkefølge for vurdering av primærlameller:

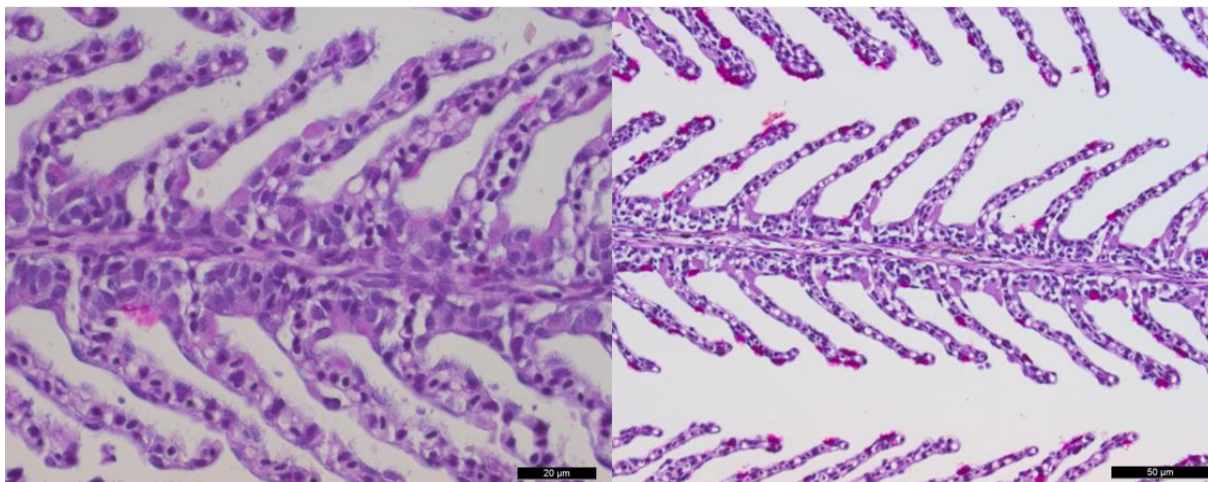
Alle snittene i denne oppgaven ble snittet, preparert og orientert på lik måte, dette muliggjorde standardisering av rekkefølgen i vurderingen av primærlamellene. Rekkefølgen for vurdering av primærlameller er vist i Figur 10. Først ble primærlamellen lengst kaudalt på gjellebuen, "nr 1" vurdert. Dersom denne primærlamellen tilfredsstilte utvelgelseskriteriene beskrevet i forrige avsnitt, ble den talt og neste primærlamell som ble vurdert var "nr 2" og deretter "nr 3".



Figur 10 Histologiske bile og illustrasjon som viser rekkefølgen for vurdering av primærlameller.

### Telling av slimceller på sekundærlamellene:

Tellingen ble gjort på høy forstørrelse (60x). De 20 første sekundærlamellene på hver side av primærlamellene ble talt, totalt 40 sekundærlameller per primærlamell. Tellingen startet mellom den første og den sjette sekundærlamellen, ut ifra hvorvidt de første sekundærlamellene tilfredsstilte kriterier 4 og 5. Det ble talt PAS-positive celler som var tydelig avgrenset og lokalisert til en sekundærlamell. De PAS-positive cellene lokalisert til det intralamellærrum skulle ikke telles. Dette ble gjort på totalt tre primærlameller per snitt. Antallet på hver primærlamell ble registrert individuelt, så summert.



**Figur 11: Snitt til venstre viser gjellevev med få slimceller. Snittet til høyre viser gjellevev med mange slimceller.**

## **Statistiske metoder**

Innsamlet data fra uttakene og tellingene ble registrert i Microsoft Excel. Det ble gjort innledende vurderinger av tallene og beregninger på varians og gjennomsnitt. For å undersøke sammenhengen mellom variablene ble dataene modellert med "flernivå negativ binomial regresjon" i StataSE 15 (StataCorp) med ett nivå (anlegg). I tillegg ble det lagd grafiske fremstillinger i samme program. Resultater anses statistisk signifikant når  $P > 0,05$ .

## **Metode for patologisk vurdering**

Snittene ble først vurdert på lav forstørrelse (10x) for å vurdere vevsarkitekturen og graden av feilpreparering. Deretter ble de utvalgte primærlamellene inspisert på høyere forstørrelse (40x) for å vurdere graden av patologiske forandringer. Snittene ble blant annet evaluert for patologiske forandringer som fortykkede sekundærlameller, lamellært ødem, epitelial nekrose, lameller hyperplasi og lamellær fusjon.

## Resultater

Av de 220 totalt innsamlede fiskene ble det registrert vekt og lengde på 219 individer, det utestående individet ble ikke registrert som følge av menneskeligfeil ved uttakstidspunkt. Det ble preparert histologiske snitt av gjeller fra samtlige 220 fisk i prosjektet. Til de statistiske analysene ble det brukt informasjon fra 211 snitt, etter at histologisnitt fra 9 fisker ble underkjent av telleprotokollen også etter andre re-snitningen (se Tabell 1).

**Tabell 1 Oversikt over uttakene.**

Anlegg	Uttaks dato	Kar ID	Kardybde (cm)	Siktdybde (cm)	Antall fisk registrert med vekt	Gjennomsnittlig vekt (g) (Range)	Antall godkjente snitt fra uttaket
RAS - 1	22.10.2018	A	400	230	10	69,9g (50,0 – 86,0)	10
		B	400	213	10		10
	05.11.2018	A	400	275	10	88,7g (66,0 – 124,0)	9
		B	400	336	10		9
RAS - 2	05.11.2018	C	300	174	10	116,7g (52,0 – 182,0)	9
		D	300	163	10		10
	19.11.2018	C	300	190	10	174,4g (92,0 – 284,0)	10
		D	300	180	9		10
RAS - 3	03.12.2018	E	400	400	10	226,1g (146,0 – 312,0)	9
		F	400	400	10		10
	17.12.2018	E	400	400	10	276,0g (174,0 – 432,0)	10
		F	400	400	10		10
RAS - 4	14.01.2019	G	410	410	10	90,7g (66,5 – 123,5)	10
		H	410	410	10		10
	28.01.2019	G	410	410	10	99,8g (72,0 – 127,0)	10
		H	410	410	10		9
RAS - 5	14.01.2019	I	450	380	10	143,6g (108,0 – 213,0)	10
		J	450	380	10		9
	28.01.2019	I	450	295	10	183,7g (134,0 – 260,0)	8
		J	450	257	10		9
FT - 1	16.01.2019	K	350	350	10	116,0g (56,0 – 218,0)	10
		L	350	350	10		10
Total / Gjennomsnitt					219	144,0g	211

## **Morfometri – kvantifisering av slimceller i gjeller**

### **Utvikling av protokoll for telling av mukusceller i gjeller**

Første utprøvde metode baserte seg på metoden beskrevet av Speare et al., 1997 (26), med enkelte modifikasjoner (Figur 15). 48 tilfeldige snitt ble talt parallelt av to observatører, bundet av det første, uraffinerte telleregelverket (Figur 15). Fra den innledende tellingen ble det funnet en gjennomsnittlig tellevariasjon på 7,7 mukusceller per snitt mellom observatørene. Det ble registrert totalt 14 snitt der variasjonen var større enn ti mukusceller per gjellesnitt. Gjennomsnittlig tellevariasjon i disse 14 snittene var 14,93.

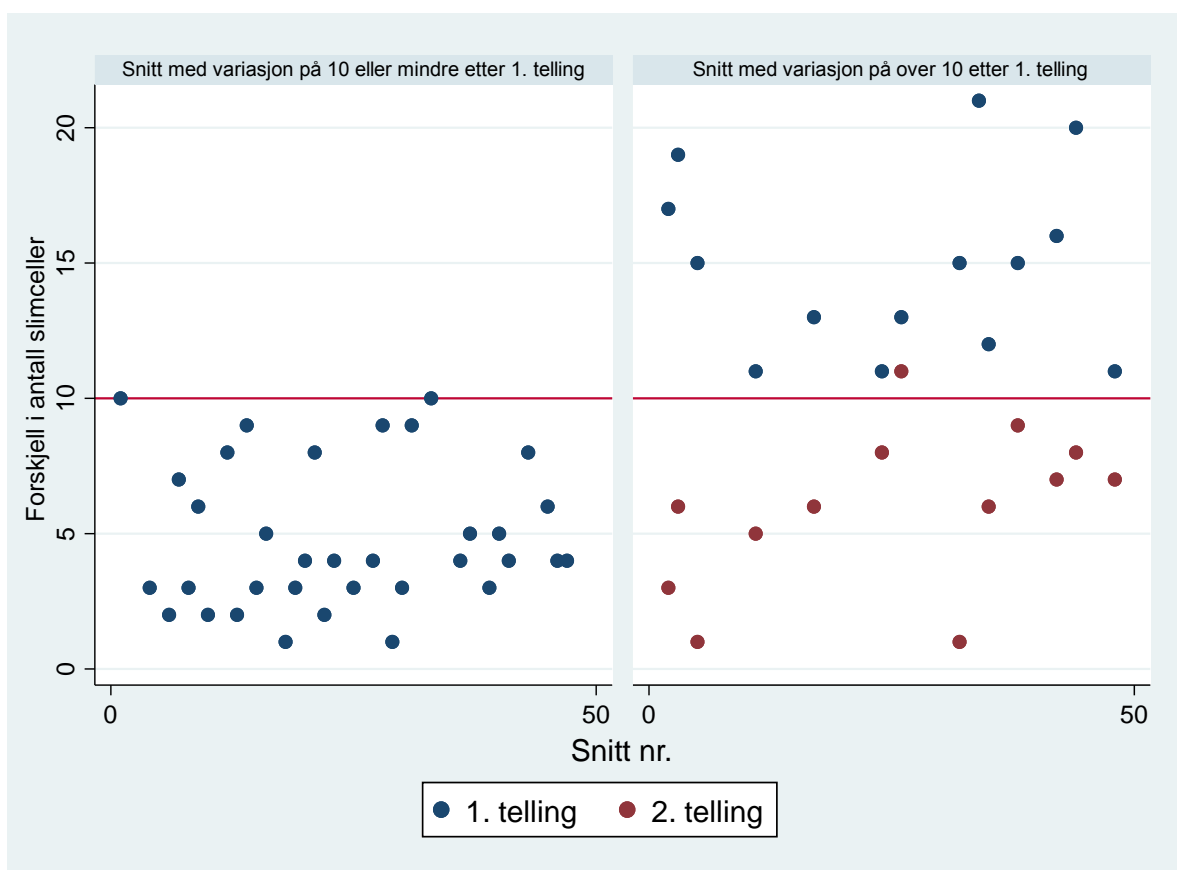
Det ble fastsatt en cut-off verdi på 10 mukusceller i variasjon per snitt, der snitt med mer enn 10 mukusceller i tellevariasjon ble brukt videre i utarbeidelse av tellemetoden. Nye telleregler ble utarbeidet, hovedsakelig basert på høyere standard for prepareringen og flere kriterier for utvelgelsen av de tre primærlamellene som skulle telles (Figur 14 og Figur 15). De nye reglene for telling ble implementert og de 14 snittene over cut-off verdien ble talt igjen, parallelt, av begge observatørene. Fire av de 14 snittene ble underkjent av begge observatører og måtte prepareres på nytt. Ett av disse snittene ble etter re-snitting igjen underkjent og er derfor manglende i beregningen for den andre tellingen og ekskludert videre i studiet. Gjennomsnittlig tellevariasjon, i de 13 snittene, etter andre telling med de endelige tellereglene, ble registrert til 6,0 mukusceller per snitt. Dette var en forbedring på 59,81% fra første telling av de samme snittene (se Figur 12).

Beregninger basert på den første telling av de 48 snittene, av begge observatører, viste en korrelasjonskoeffisient på 0,957 av maksimalt 1 (Figur 13). Det ble også beregnet tellekorrelasjon på basis av de 34 snittene som var under cut-off verdien (verdier fra den første tellingen ble brukt) og de resterende 13 snittene over cut-off verdien som ble talt igjen

(verdier fra andre telling ble brukt) (Figur 13). Denne beregningen viste en korrelasjonskoeffisient på 0,974 av maksimalt 1. Begge beregningene viser at telleresultatene er svært like, uavhengig av observatør. Dette støttes også grafisk (Figur 13). Variasjonen mellom observatørene er jevnt fordelt. Det er ingen tegn til at det er større forskjell når det telles snitt med få eller mange slimceller. Beregningene viser en tydelig forbedring av korrelasjonskoeffisienten, fra 0.957 til 0.974, etter implementering av den endelige telleprotokollen.

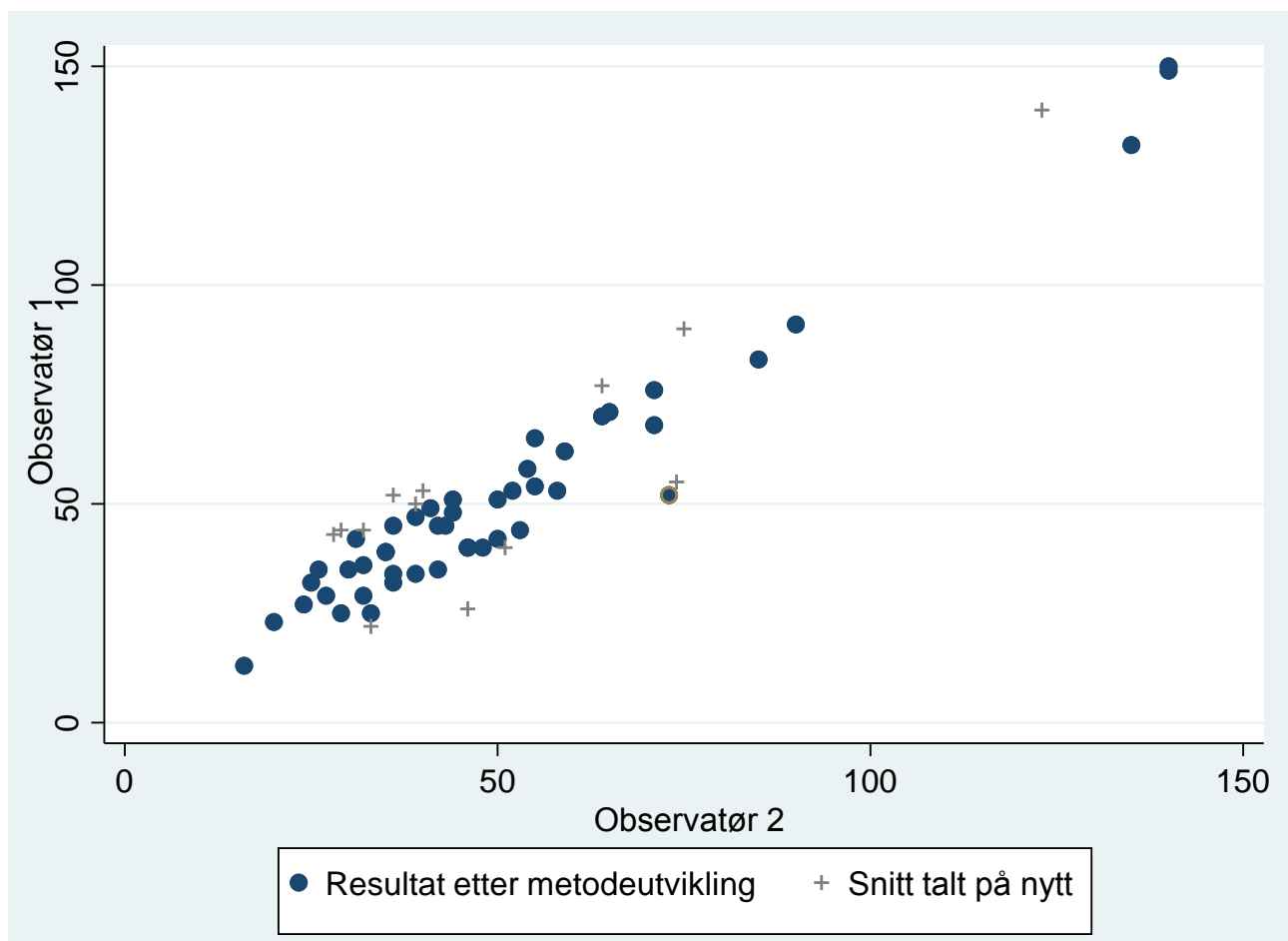
De resterende snittene i oppgaven ble talt en gang av en enkelt observatør.

Flyttdiagrammer under viser en oppsummering av utviklingen av tellemetoden (Figur 14), samt forskjellene mellom de to metodene (Figur 15).

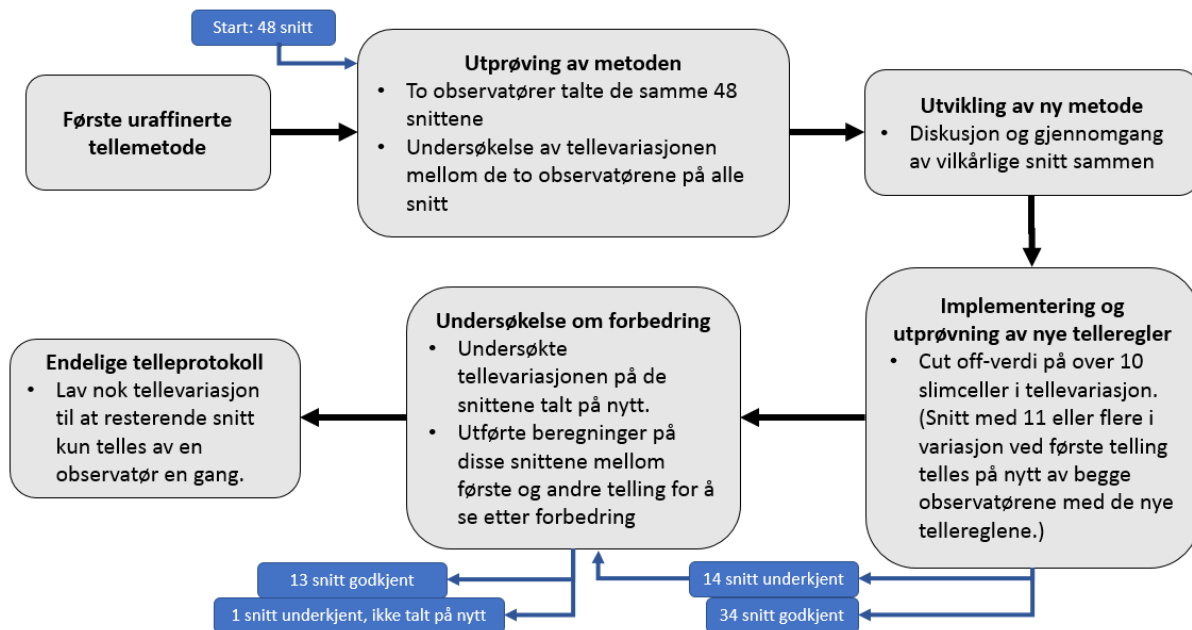


**Figur 12 Graf på venstre side: Viser tellevariasjonen til hvert enkelt snitt som hadde 10 slimceller eller mindre i variasjon. Graf på høyre side: Viser de snittene som hadde mer enn 10 slimceller i tellevariasjon ved første telling. Blå prikker viser variasjonen ved første telling, røde prikker viser tellevariasjonen til de samme snittene etter andre telling etter den nye telleprotokollen ble innført.**

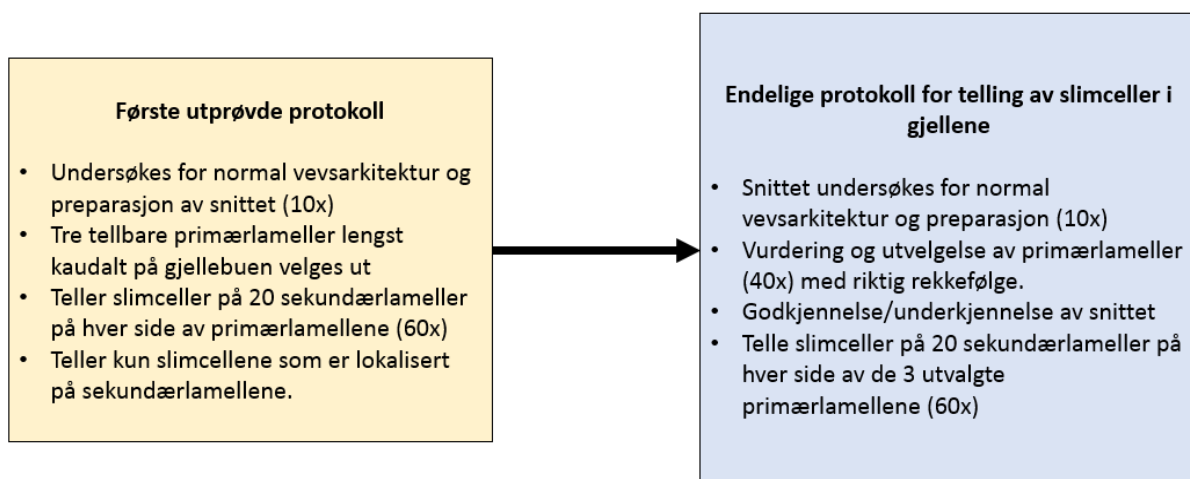




**Figur 13** Korrelasjonen mellom observatører i tellingene av de 48 snittene i utviklingen av telleprotokollen: De blå prikkene representerer verdiene av antallet slimceller for alle snitt, etter forbedring av telleprotokollen. Grå kryss indikerer verdien fra første telling til de 13 snittene som ble talt på nytt. Den ene blå prikken med grå ring viser telleresultatet fra snittet som var over cut-off verdien etter første telling, men underkjent også ved telling nr 2 og derfor ikke talt igjen.



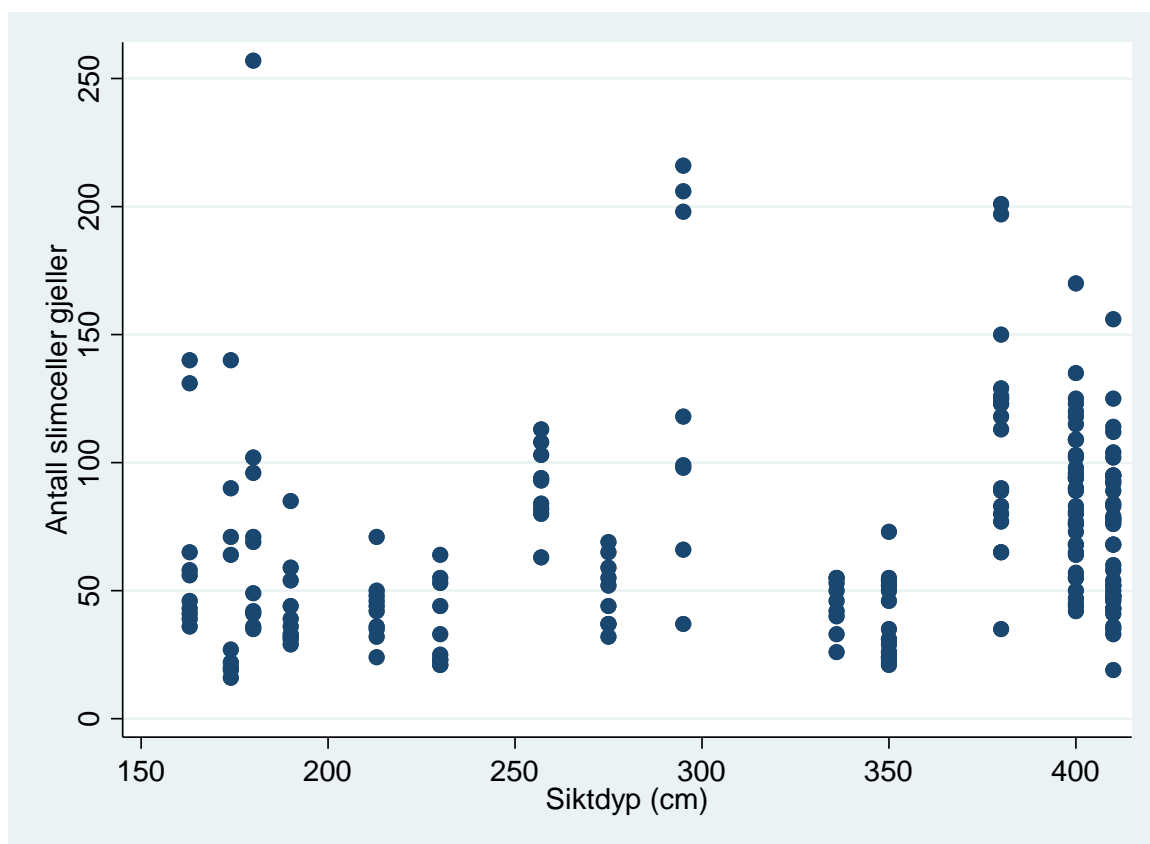
Figur 14 Flytdiagram utvikling av telleprotokollen. Blå rubrikker viser flyten av snitt.



Figur 15: Endringer gjort i forbedring av telleprotokoll

## Sammenheng mellom siktdybde og slimcelleantall i gjellene

Sammenheng mellom siktdybde og slimceller viste en P-verdi på 0.094, hvilket betyr at det fantes ingen signifikant korrelasjon mellom antall slimceller og turbiditet (siktdybde). Variablene ble fremstilt grafisk, der var det heller ikke mulig å se en korrelasjon mellom siktdyp og antall slimceller ( Figur 16).



**Figur 16:** Punktplot som viser antall slimceller hos ett individ sett opp mot siktdypet i karet. Hver fisk i studiet er representert.

## Slimcelleantall på anleggsnivå mellom uttakene

Det var lite variasjon i gjennomsnittlig slimcelleantallet mellom de to uttakene på anleggsbasis (Tabell 2). Dette illustreres sammen med vekt i Figur 18.

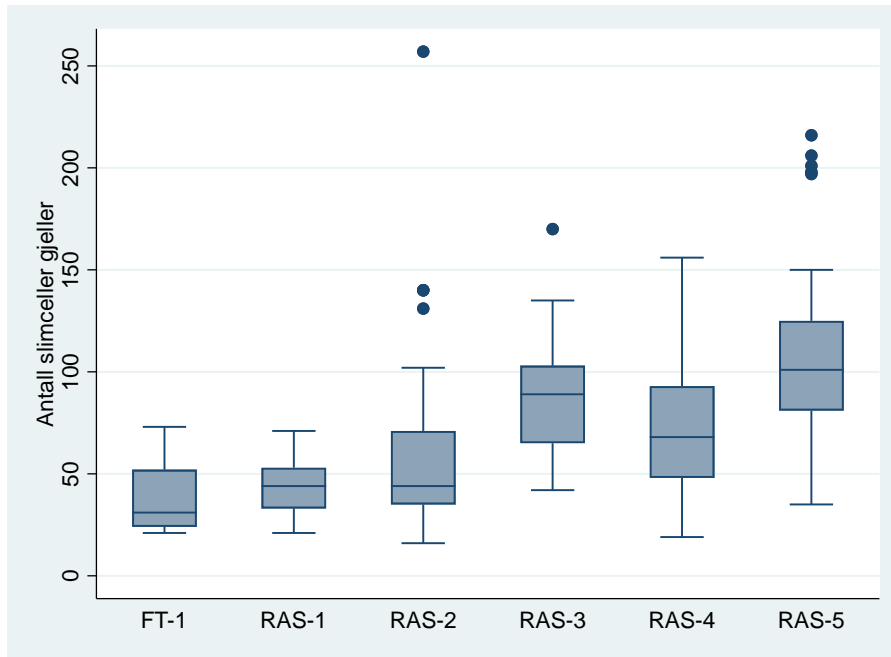
Tabell 2 Variasjon i gjennomsnittlig slimcelleantall mellom uttak.

Anlegg	Uttaks nr	Slimcelleantall	Variasjon
RAS - 1	1	39,5	7,7
	2	47,2	
RAS - 2	1	59,2	2,8
	2	62	
RAS - 3	1	87,9	2,7
	2	85,2	
RAS - 4	1	65,7	11,2
	2	76,9	
RAS - 5	1	111,2	1,9
	2	109,3	

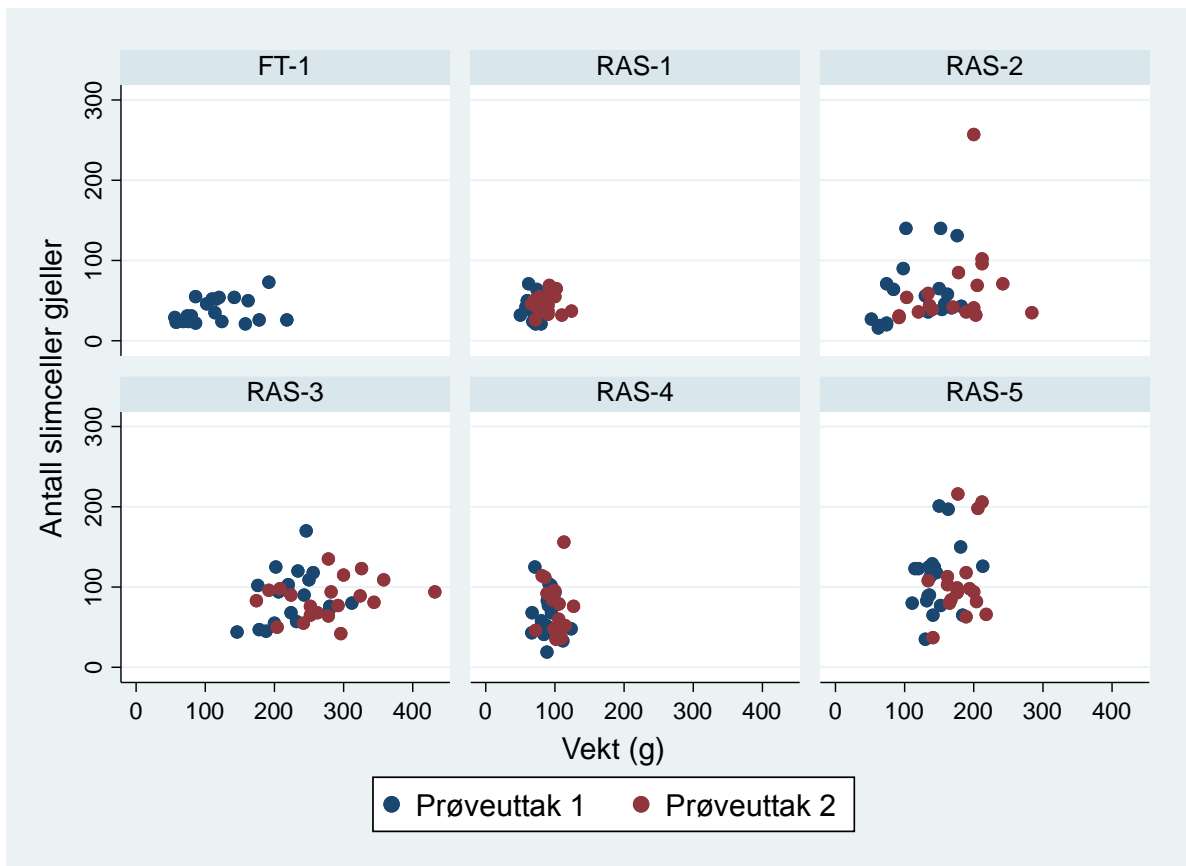
## Regresjonsanalyse – Slimcelleantall, vekt og anlegg

Det ble observert tydelige forskjeller i antall slimceller mellom de forskjellige lokalitetene (se Figur 17). Gjennomstrømningsanlegget hadde lavest antall slimceller, etterfulgt av RAS – 1 som hadde litt flere slimceller, men hadde mindre spredning i antall mellom individene.

Det ble også registrert en sammenheng mellom fiskens vekt og slimcelleantall, sammenhengen var signifikant ( $P > 0,001$ ) der anlegg er spesifisert som nivå i modellen. Dette er også mulig å se grafisk (se Figur 18).



**Figur 17** Boksploot som viser antall slimceller (og median) i gjellene hos all fisk i utvalget, kategorisert etter anlegg



**Figur 18** Grafisk fremstilling av antall slimceller og vekt på de forskjellige anleggene, som viser de to forskjellige uttakene på individnivå

## Slimceller i gjennomstrømningsanlegg

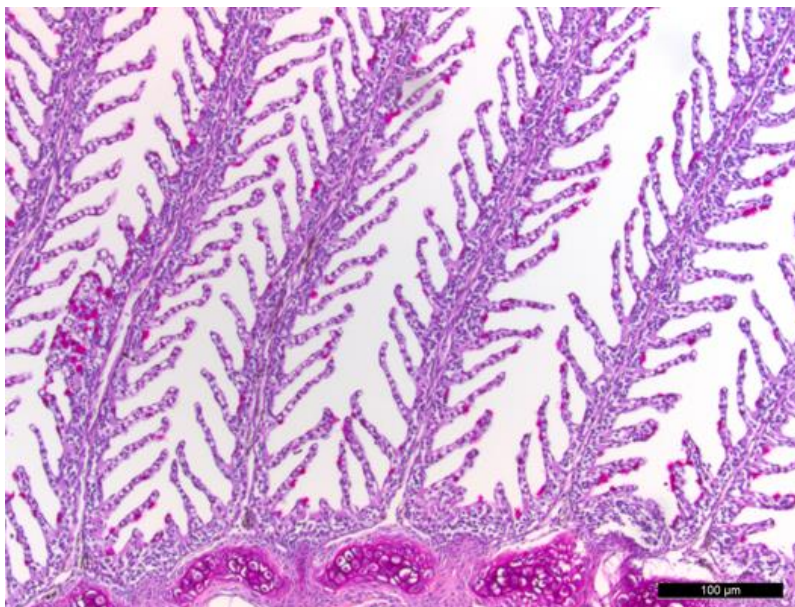
Slimcelleantallet i gjennomstrømningsanlegget (FT – 1) var lavest blant alle anleggene. Den hadde lavest median og gjennomsnitt, men var tett etterfulgt av RAS – 1 (Tabell 3)

Tabell 3 Fordelingen av median og gjennomsnittlig slimcelleantall

Anlegg	Median	Gjennomsnitt
FT - 1	31	37,6
RAS - 1	44	43,2
RAS - 2	44	60,6
RAS - 3	89	86,5
RAS - 4	68	71,2
RAS - 5	101	110,3

## Graden av patologiske forandringer

Det var kun ett snitt som viste tydelig tegn på patologiske forandringer som et cellerikt bilde, invasjon av immunceller, lamellær fusjon og økt antall slimceller (Figur 19). I de resterende snittene ble det ikke funnet nevneverdige patologiske forandringer.



Figur 19: Snitt med uttalte patologiske forandringer. Gjellene er generelt cellerikt, med invaderende leukocytter, økt antall slimceller og et tydelig område med lamellær fusjon.

## Diskusjon

I dette studiet ble det gjort tilfeldig uttak av 200 fisk fra fem forskjellige RAS-anlegg, med to uttak på hvert anlegg. Det ble også gjort et uttak på 20 fisk fra et gjennomstrømningsanlegg. Partikkelmengden i vannet, målt som siktdybde, ble målt for å undersøke en eventuell sammenheng mellom antall slimceller i gjellene og partikkelmengde i vannet. Det ble også utviklet en ny og reproducerbar metode for telling av slimceller.

### Morfometri – kvantifisering av slimceller i gjeller

Det første delmålet var å utvikle en robust metode for å telle slimceller i gjellene. Resultatet fra den første tellingen viste en betydelig varians på en stor prosentandel av snittene selv om trendene i første telling var relativt like og den generelle korrelasjonen mellom observatørene var god (Figur 13). En variasjon i den størrelsesorden på enkelte snitt ville utgjort en altfor stor usikkerhet i resultatene. Det var derfor nødvendig å videreutvikle og forbedre metoden. Gjennom diskusjon og ved at de to observatørene gikk gjennom flere tilfeldige snitt sammen, ble det konkludert med at de hadde god overensstemmelse med hensyn til karakteriseringen av PAS-positive slimceller og hvilke som møtte kriteriene for om de skulle med i tellingen. Det var derimot ikke like god overensstemmelse på hvilke primærlameller som ble valgt ut for telling. Derfor hadde denne delen av tellemetodikken størst forbedringspotensial og ble derfor hovedfokuset for videreutviklingen av telleprotokollen.

Før tellingen ble det enighet om hvilke celler som ble ansett som tellbare slimceller og hvilke primærlameller som kunne telles. Den første tellingen viste en variasjon i tellingene på 7,77 mukusceller per gjellesnitt. De snittene som var over cut-off verdien på 11 mukusceller i differanse mellom observatørene, hadde en gjennomsnittlig variasjon på 14,93 mukusceller

per gjellesnitt. Det ble også registrert at spennet i variasjonene mellom snittene var stor. Enkelte snitt ble talt ganske likt og hadde lav variasjon, mens andre snitt hadde veldig høy variasjon. Derfor var det nødvendig å videreutvikle og forbedre tellemetoden vår. Tilfeldige snitt ble valgt ut og vurdert av observatørene i fellesskap. Overenstemmelse mellom hva observatørene mente var tellbare slimceller var fortsatt god. Derimot ble det kommet frem til at overenstemmelsen over hvilke primærlameller som skulle telles ikke var god og sannsynligvis den faktoren med størst innvirkning på variasjonen. Gjennom diskusjon ble reglene beskrevet i metodedelen utarbeidet. De nye reglene hevet kravene både for kvaliteten av snittingen og for utvelgelsen av hvilke primærlameller som skulle telles.

Etter implementering av ny metode ble det observert en nedgang i variasjon på cirka 59% på de snittene som var over cut-off verdien. Etter denne tellingen var det ingen snitt med høyere variasjon enn 11 slimceller per snitt. Dette ble ansett som god nok overensstemmelse mellom tellerne og derfor ble de resterende snittene talt kun én gang av en observatør.

Det er flere usikkerheter i denne metoden. Det finnes for lite informasjon og dokumenterbar forskning gjort på gjellene til Atlantisk laks og deres slimceller. Fordelingen på antall slimceller langs primærlamellen og distribusjonen over gjellebuen er ikke dokumentert. Dette ble forsøkt korrigert for ved å standardisere tellingen slik at det alltid ble talt slimceller ved basis av primærlamellene.

Det ble innført en del kriterier for å hindre at snitt med store artefakter ble inkludert i studiet. Kriterier mot sentral brus, sekundærlameller nede ved basis og symmetri blant de sekundærlamellene som ble talt, ble iverksatt for å hindre at primærlameller som var snittet for skrått skulle telles. Det ble også her lagt inn en klausul om at man kunne hoppe over de



fem første sekundærlamellene dersom de 20 neste var tellbare. Dette ble gjort for å hindre unødig forkasting av snitt, da histologisk preparering av gjeller er vanskelig og krevende å gjøre helt feilfritt.

Suboptimal snitting førte til at det i noen tilfeller måtte telles lengre rostralt på gjellebuen enn det som var tenkt i utviklingen av metoden. Det ble heller ikke funnet noe i litteraturen angående forskjell i distribusjonen av slimceller på lamellene rostralt i forhold til mer kaudale lameller. For å optimalisere metoden ytterligere ville det vært fordelaktig å innføre enda et tellekriterie som tillot kun kaudale primærlameller i studiet. Dette var det ikke tid nok til å implementere i telleprotokollen.

I utviklingsprosessen av telleprotokollen var det kun 13 snitt som ble talt to ganger. Dette fungerte godt til beregningen av prosentvis forbedring på disse snittene. Derimot var ikke dette optimalt for beregningen av korrelasjonen mellom tellerne. Her ble det i første omgang beregnet korrelasjon på første tellingen på alle de 48 snittene talt på samme måte. I korrelasjons-beregningen for den andre tellingsrunden ble de 13 snittene som ble snittet på nytt talt igjen. De nye slimcelle tallene brukt i beregning sammen med slimcelletallene for de som var under cut-off verdien fra første telling. Ideelt sett burde alle de 48 snittene blitt talt igjen med bruk av den endelige tellemetode. Korrelasjonen basert på en slik andre runde telling hadde sannsynligvis vist en høyere korrelasjon enn det vi oppnådde her. Om dette spiller en stor rolle er uvisst da korrelasjonen mellom observatørene gjort på en mindre optimal måte fortsatt var veldig god.

Metodikken for telling av mukusceller hadde som mål at to individuelle tellere skulle komme frem til å telle de samme primærlamellene og sekundærlamellene og på den måten få så liten

variasjon i tellingene som mulig. Nedgang i tellevariasjon i de snittene talt to ganger på nesten 59% (se Tabell 3), tyder på at den endelige telleprotokollen oppfyller disse kravene.

Korrelasjonen mellom observatørene ble forbedret, men var allerede god før den endelige telleprotokollen ble implementert. Samtidig gikk tellevariasjonen i de 13 snittene betraktelig ned etter implementering av nye regler. Dette tyder på at tellevariasjonen er generelt er lav ved begge metodene, men ved mer utfordrende snitt, med for eksempel mye artefakter, utgjør de nye tellereglene en betydelig forskjell i sikkerheten på tellingen.

### **Sammenheng mellom siktdybde og slimcelleantall i gjellene**

I dette studiet ble det undersøkt om turbiditeten i vannet har påvirkning på antallet slimceller som forekommer i gjellene hos atlantisk laks. Det var ikke mulig å påvise en signifikant sammenheng mellom siktdybden og antall slimceller i gjellene. Undersøkelse av en slik sammenheng avhenger hovedsakelig av variablene siktdybde og antall slimceller talt i gjellesnittene. Før påbegynnelsen av dette studiet var det forventet å finne en slik sammenheng. Underveis i studiet så begynte dette resultatet å se mer tvilende ut.

Denne tvilen var hovedsakelig basert på målingene av siktdybden og dermed turbiditeten.

Målingene av siktdybden ble ikke som forventet. Variasjonen i siktdybde mellom karene var mindre enn forventet. Det var også flere anlegg der det ikke var mulighet å ta en slik reell måling.

Måling med secchi skive ble vurdert som det beste alternativet for å måle en tilnærmet partikkelmengde i karene. Dette baserte seg på tilgjengelighet, kostander og overførbarhet av målinger mellom ulike lokaliteter. Selv om enkelte av anleggene måler turbiditet som en del

av internkontroll, så måles dette ved hjelp av ulike instrumenter og på helt ulike måter, noe som gjør at en verdi fra ett anlegg ikke lar seg sammenlikne med et annet. Det hadde også blitt en usikkerhet i selve målingen da den ikke hadde blitt utført av en som er med i studiet og det da ikke er sikkert at målingen hadde blitt representativ. Det var allikevel flere svakheter og feilkilder ved bruk av secchi skive målingene. Strømhastigheten i karet utgjorde en betydelig faktor i siktdybdemålingene, denne hastigheten ble ikke registrert. Intensjonen bak siktskiven var at skiven skulle senkes loddrett ned i karet helt til den ikke lengre kunne sees. Det ble ikke brukt et tungt nok lodd under skiven, slik at skiven ble dratt med i vannstrømmen. Dette ble forsøkt korrigert for ved å foreta målingene der det ble opplevd at det var minst strøm i karet. Allikevel ble skiven dratt med strømmen, dette førte sannsynligvis til en overestimering av siktdybden og dermed en underestimering av turbiditeten. I tre av de seks besøkte anleggene var det ikke mulig å foreta en reell siktdybdemåling, da secchi skiven fortsatt kunne sees når hadde nådd bunnen var karene. Beregningene ble da basert på vann dybden i karene i stedet (Tabell 1). Dette har mest sannsynlig ført til en underestimering av siktdybden, derved en overestimering av turbiditet. Det er en reell mulighet at dersom nøyaktige målinger hadde blitt utført på samtlige av karene at variasjonen mellom karene hadde blitt større og beregninger kunne vist en sterkere sammenheng mellom siktdybde og slimcelleantall.

Siktdybden ble i dette studiet brukt som indirekte mål på turbiditet, men realiteten er at mange andre faktorer spiller inn på klarheten av vannet, ikke bare løste partikler. Siktdybde er som tidligere nevnt sterk korrelert til turbiditet, men turbiditet er da ikke det eneste som blir målt når det brukes siktdybde. Dette kan ha komplisert datasettet med skjulte variabler og forstyrret en eventuell sammenheng mellom turbiditet og slimcelleantall.

Antallet slimceller som ble talt på fisken var det ingen forventninger om før studiet. Observatørene hadde ingen formening om antallet slimceller det burde være i et gjellesnitt fra frisk fisk, da et heller ikke fantes litteratur på dette. Det resultatene viser er at fiskene fra hvert anlegg er mer eller mindre grupperte når det kommer til slimcelleantall, spesielt RAS – 1 og FT – 1 (Figur 17 og Figur 18). Slimcelleantallet var en variabel som ble talt av observatørene, noe som utsetter variabelen for usikkerhet i form av subjektiviten til tellerne. Denne usikkerheten ble forsøkt gjort så liten som mulig ved å utvikle en mer rigid telleprotokoll. Metoden som ble utviklet viste seg å fungere godt, men er likevel ikke en feilfri metode. Den ble utviklet for å være så nøyaktig som mulig, men måtte også være forholdvis enkel å følge og internalisere for observatørene. Dette førte til et kompromiss i metoden, der nøyaktighet i tellingen i noen grad måtte vike for brukervennlighet og gjennomførbarhet med tanke på den histologiske prepareringen.

Gjellevevet er ømfintlig og vanskelig å preparere korrekt histologisk. Dette førte til stor variasjon i kvaliteten til de histologiske snittene som ble undersøkt. Telleprotokollen satt en grense for hvilke snitt som var av akseptabel kvalitet. I den innledende granskningen av telleresultatene ble det lagt merke til enkelte uteliggende verdier med mye høyere antall slimceller enn de andre snittene fra samme uttak og kar (se Figur 13 og 16). Snittene ble undersøkt og talt på nytt, denne nye tellingen resulterte i tilsvarende verdier som i den opprinnelige tellingen og de opprinnelige tallene ble brukt videre i beregninger. Det ble observert at alle utenom ett av disse snittene var preparert på en slik måte at de kaudale delene av gjellebuene var preget av artefakter. Dette førte til at de primærlamellene som ble talt var langt rostralt på gjellebuen. Det var ikke mulig å finne publiserte funn angående distribusjonen av slimceller i gjellebuen. Det kan derfor ikke utelukkes at det er en varierende distribusjon av slimceller i ulike deler av gjellebuen. Dette er en svakhet i studiet.

Det var relativt få anlegg med i studiet og anlegg som er villige til å være en del av slike studier er ofte de som har god kontroll rundt de fleste driftsrutinene, deriblant vannkvaliteten. Dersom flere tilfeldig anlegg hadde vært med, ville det kunnet blitt registrert større forskjeller i både siktdybde og slimcelleantall og mulig også blitt funnet en signifikant sammenheng mellom disse variablene.

Analyse av dataene kan også tyde på at det er en invers sammenheng mellom slimcelleantall og siktdypet. Der høyere turbiditet fører til lavere antall slimceller i gjellene. Dette er en interessant observasjon som krever mer forskning. Det er presidens for slike funn da artikler av blant annet Speare et al (26) og Moron et al (27) tyder på at påvirkning av ulike stoffer har forskjellige utslag på respons i antall slimceller, samt at ulike arter kan ha motstridende responser på lik påvirkning.

### **Endringer i slimcelleantall innad de ulike anleggene mellom uttakene.**

Registreringene av slimcelleantall gjort på den første uttaksgruppen og den gruppen fra det andre uttaket to uker senere viste at antall slimceller per kar holdt seg stabilt med veldig lav variasjon (se Figur 17 og Tabell 2). Variasjonen var så lav at det kun var ett av anleggene som hadde høyere variasjon enn cut-off verdien som ble brukt i utviklingen av telleprotokollen. Det at denne protokollen ble brukt til å telle de registrerte slimcellene styrker påstanden om stabilitet da vi utfra metoden må kunne tillate en variasjon på minst 10 slimceller per snitt. Dette åpner for muligheten at den variasjonen som ble målt kun var telleunøyaktighet og ikke en reell variasjon.

Liten variasjon er også verdt å dra frem fordi det viser til en god overenstemmelse mellom tellingene til observatørene og en repeterbarhet i selve telleprotokollen. Denne observasjonen

representerer også kvaliteten og driftsrutinene ved anleggene, ved at de målte vannparameterne holder seg relativt stabile over lengre tid. Ved store endringer i vannkvaliteten hadde man sannsynligvis forventet å registrere større forskjeller i siktdybder og muligens også slimcelleantall.

## **Forskjell mellom de ulike anleggene i mengden slimceller og ulik vekt på fisken**

Det ble registrert at det var sammenheng mellom slimcelleantall og hvilket anlegg fisken kom fra. Det er også forskjell i graden av slimcelletall mellom de ulike vektgruppene. For optimal standardisering av forsøket burde fisken ved de ulike anleggene hatt lik størrelse. Variasjonen på størrelsen av fisken er stor. De minste fiskene i studiet er 50 gram og de største fiskene veier 432 gram, nesten ti ganger størrelsen. To av anleggene som hadde minst fisk hadde også minst slimcelleantall blant RAS-anleggene. Større fisk har tilsvarende større sekundærlameller og burde dermed kanskje ha flere slimceller. Det finnes ingen publisert dokumentasjon på at større fisk naturlig har flere eller færre slimceller i gjellene. Regresjonsanalysen ble gjennomført med anlegg som et nivå i regresjonen, følgen av dette er at det ikke er mulig å skille mellom hvilken variabel, anlegg eller vekt, som har størst betydning for antall slimceller, det er sannsynligvis en sammensatt årsakssammenheng med grunn i driftsrutiner og management. Skulle dette blitt belyst burde studiet omfattet flere management variabler. Da hadde det kanskje vært mulig å si noe om hvilke andre faktorer som har størst innvirkning på slimcelleantallet. Slik dette studiet var gjennomført kan man ikke med sikkerhet si noe om sammenhengen mellom størrelse på fisken og antall slimceller, bare at det er en signifikant sammenheng.

Det var tydelige forskjeller mellom de ulike anleggene i graden av antall slimceller. Da det i resultatene ikke var mulig å påvise en signifikant sammenheng mellom slimceller og siktdybde så har trolig slimcelleantallet en sammensatt årsakssammenheng som dreier seg om mange aspekter innenfor vannkvalitet.

### **Slimceller i gjennomstrømningsanlegg.**

I studiet ble det inkludert et gjennomstrømningsanlegg for å ha et sammenligningsgrunnlag i forhold til RAS-anleggene. I et gjennomstrømningsanlegg har man kontinuerlig inntak av vann, noe som fører til andre typer problemstillinger enn i et RAS-anlegg. Ulike hendelser som for eksempel flom og store nedbørmengder kan forringe vannkvaliteten i et gjennomstrømningsanlegg betraktelig i perioder. Det er også positive sider ved gjennomstrømningsanlegg der man unngår opphopning av avfallsstoffer som kan ha negativ effekt på fiskehelsen. Som tidligere nevnt er det i følge fiskehelse rapporten 2018 en større forekomst av diagnosen gjellebetennelse i RAS-anlegg enn i gjennomstrømningsanlegg. Det ble funnet et signifikant lavere slimcelleantall i gjennomstrømningsanlegget enn i RAS-anleggene. Dette er noe som i en viss grad kan sees i sammenheng med fiskehelse rapporten 2018. Det ble kun gjort et enkelt uttak av 20 fisk fra et gjennomstrømningsanlegg og tolkningen av disse resultatene blir derfor i stor grad preget av usikkerhet grunnet den lave utvalgsstørrelsen. Til tross for dette er det et interessant funn. RAS – 1 viser relativt like mengder slimceller som gjennomstrømningsanlegget. Dersom det er mulig å bruke slimceller som et mål på gjellehelse, kan dette resultatet tyde på at RAS-anlegg har potensiale til å være på høyde med gjennomstrømningsanlegg når det kommer til gjellehelse hos settefisk.

## **Antall slimceller i gjellene som et mål på gjellehelse.**

Det finnes ingen referansepunkter for antall slimceller per gjellefilament hos atlantisk laks. Hvilken mengde slimceller som er optimalt for gjellenes funksjon er uvisst. I studiet hadde to av anleggene (RAS-1 og FT-1) lavere nivå av slimceller og mindre variasjon innad gruppene enn de resterende anleggene. Årsaken til denne forskjellen har ifølge vår studie, ikke en signifikant sammenheng mellom turbiditeten i vannet, men er trolig mer sammensatt. Det finnes ingen litteratur som beskriver den reaktive responsen på proliferasjonen av slimceller hverken ved akutt eller kronisk nedsatt vannkvalitet. Fra grunnleggende fysiologi er det kjent at hyperplasi av spesialiserte celler krever involvering av transkribering av gener, noe som tar tid. Det kan tenkes at kronisk nedsatt vannkvalitet vil gi økt antall slimceller. Det ble ikke observert betennelsesceller typisk for påvirkning av vev i en akutfase, i mer enn ett individ i studieutvalget.

En økt mengde slimceller i gjellene hos fisk vil i ulik grad ha innvirkning på gjellenes funksjoner, deriblant gassutveksling. En økt mengde slimceller vil også trolig føre til en økt produksjon og sekresjon av mukus, dette vil igjen føre til at stoffer må diffundere over lengre avstander og påvirke vannstrømmen gjennom filamentene som trolig vil påvirke effektiviteten i funksjonene.

Dette studiet tyder på at det kan være mulig å bruke antall slimceller som en indikasjon på gjellehelsen på anleggsnivå. Denne antydningen er basert på antakelser grunnet manglende tyngde i studieutvalget og manglende faglig litteratur. For å kunne bruke slimcelletall som en indikasjon på gjellehelsen vil i så fall kreve videre studier for å blant annet etablere en referanseverdi for antall slimceller i gjellene til settefisk.



## **Graden av patologiske forandringer**

Det var kun ett snitt som hadde patologiske forandringer. Forandringene var fokale og ikke ansett som utbredt nok til å ekskludere snittet fra studiet. Det er et interessant funn at kun ett snitt av totalt 220 viser patologiske forandringer. Denne observasjonen kan til en viss grad vise til driftskvaliteten som er mulig å oppnå med RAS-teknologi og at gjellehelsen til fisk i disse anleggene er god. Det ble ikke observert noen tydelige forskjeller i histopatologiske forandringer mellom de anleggene som hadde lavere gjennomsnittlig slimcelleantall enn de som hadde høyere gjennomsnitt. Grunnen bak dette kan være at alle anleggene som var med i dette studiet har relativt god kontroll på vannkvaliteten og driftsrutinene generelt. Da det likevel var tydelig signifikante forskjeller i slimcelleantall mellom anleggene så er det mulig at vannkvalitetsparametere ikke er ulike i den grad at anleggene med dårligere kontroll viser patologiske forandringer.

## **Konklusjon**

Ifølge resultatene fra dette studiet er det ingen sammenheng mellom turbiditeten og antall slimceller i gjellene til settefisk i RAS-anlegg. Det er en statistisk signifikant sammenheng mellom antall slimceller og både vekten på fisken og hvilket anlegg den kom fra. Årsakene til dette er sannsynligvis komplekse og sammensatte og krever derfor videre studier. Studiet tyder på at det kan være mulig å bruke antall slimceller som en indikasjon på gjellehelsen på anleggsnivå. Dette vil i så fall kreve videre studier for å blant annet etablere en referanseverdi for antall slimceller i gjellene til settefisk.

Den standardiserte metoden som ble utviklet fungerer godt. Graden av patologiske forandringer var ikke nevneverdig og tyder på at gjellehelsen i anleggene inkludert i studiet var god. Grunnet lavere prøveutvalg kan det ikke trekkes faste konklusjoner angående gjennomstrømningsanlegg i forhold til RAS-anlegg vedrørende gjellehelse på settefisk, selv om det ble funnet en signifikant sammenheng mellom mindre slimceller og gjennomstrømningsanlegget.

## **Takk til bidragsytere**

Vi vil gjerne takke Histologisk Laboratorie ved NMBU campus Adamstuen og alle medhjelperne her, for uvurderlig hjelp i prepareringen av de histologiske snittene. Vi vil takke de ulike produsentene som har latt oss komme å ta prøver fra anleggene deres og røkterne som var behjelpelige under prøveuttakene. Vi vil også takke veilederne våre for all hjelp og støtte de har gitt oss gjennom hele denne prosessen.

## **Summary**

*Title:* Effects of turbidity in RAS-systems on gill health measured in quantity of mucus cells in Atlantic salmon in the freshwater stage

*Authors:* Alexander Figenschou and Linn-Anett Hillestad

*Supervisor:* Marit Stormoen, ProdMed / David Persson, Prodmed / Håvard Bjørgen,  
Basam

The aim of this study was to examine if there is a statistical correlation between turbidity and the number of mucus cells in the gills of Atlantic salmon. The main hypothesis was that high turbidity (measured in a low Secchi depth in the fishtanks) in RAS-farms can lead to an increase in mechanical load on the gills. This increase in load could be thought to lead to a response in the form of an increase in the number of mucus cells in the gills. Gill samples from a total of 220 fish from five different RAS farms were collected. 20 fish were sampled from each RAS farm with a two-week interval (a total of 40 fish from each RAS farm). A group of fish from a traditional flow-through farm (n=20) was also included in this study.

The results of this study showed a non-significant relationship between the number of mucus cells and the Secchi depth. However, there was a relationship between the number of mucus cells and which farm the fish originated from. The lowest mucus cells numbers were found in the flow-through farm. The reason for this relationship is probably complex and dependent upon a large number of variables concerning management and water quality. There was also found a significant correlation between the number of mucus cells and the weight of the fish.

This study also developed and tested a new standardized method/protocol for counting the number of mucus cells in the gills of Atlantic salmon.

Gill health in RAS farms was in the Norwegian fish health report of 2018 defined as an area of concern. In this study, however, there was only registered one individual, out of a reasonably large group, with notable pathological findings (inflammation and hyperplasia of the secondary lamella). This is in its self an interesting observation, even though the locations were not randomly selected.

There was, however, a significant relationship between a lower number of mucus cells and the fish from the flow-through farm, seen in contrast with RAS farms. The sample size from the flow-through farm was, however, smaller, which weakens the strength of this finding. We are therefore not able to draw any tangible conclusions and further studies on the matter are warranted.

The results of this study suggest that the number of mucus cells in the gills possibly could be used as an indicator of gill health in fish in RAS farms, however, not solely dependent on the clarity of the water, but of the basis of location and weight.

## Referanser

1. Salmon NR. Fremtiden ligger i havet 2015 [Available from: <https://norwayroyalsalmon.com/no/Baerekraft>].
2. Froehlich HE, Runge CA, Gentry RR, Gaines SD, Halpern BS. Comparative terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018.
3. Larsen AK. Verdien av velferd 2017 [updated 04.05.2017. Available from: [https://uit.no/nyheter/artikkel?p\\_document\\_id=514648&p\\_dim=88163](https://uit.no/nyheter/artikkel?p_document_id=514648&p_dim=88163)].
4. Biomar. Settefisk 2018 [Available from: <https://www.biomar.com/no/norway/produkter-og-arter/laks/settefisk-laks/>].
5. AquaOptima. Vann i settefiskanlegg - en begrensende ressurs? [Presentasjon]. [www.sjomatnorge.no2008](http://www.sjomatnorge.no2008) [Available from: <https://sjomatnorge.no/wp-content/uploads/importedfiles/Lovik.pdf>].
6. Skajaa K. Strategier for settefiskproduksjon av torsk i Nord-Norge Akvaplan-Nivå; 2005.
7. al Ce. Nitrification kinetics of biofilm as effected by water quality factors. Aquacultural engineering. 2006(34).
8. Haukaas A. Veterinærinstituttet ønsker felles ambisjon om å utrydde visse fiske sykdommer i Norge 2018 [Available from: <https://www.vetinst.no/nyheter/Veterinarinstituttet-onsker-felles-ambisjon-om-a-utrydde-visse-fiske-sykdommer-i-norge>].
9. Kittelsen R, Ulgenes, Selvik, Alne. Tilgjengelige ferskvannsressurser til fremtidig produksjon av settefisk til laks og ørret. 2006.
10. Fjellheim. Vannkvalitet i et kommersielt resirkuleringsanlegg for laks. 2009.
11. Timmons E. Recirculating aquaculture. 2010.
12. Standardization IOF. ISO 7027-1 Water quality - Determination of turbidity - Part 1: Quantitive methods. [www.iso.org](http://www.iso.org); ISO; 2016.
13. Buiteveld H. A model for calculation of diffuse light attenuation (PAR) and Secchi depth 1995. 55-65 p.
14. Davies-Colley RJ, Smith DG. TURBIDITY SUSPENDED SEDIMENT, AND WATER CLARITY: A REVIEW. JAWRA Journal of the American Water Resources Association. 2001;37(5):1085-101.

15. Bachmann RW, Hoyer MV, Croteau AC, Canfield DE. Factors related to Secchi depths and their stability over time as determined from a probability sample of US lakes. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2017;189(5):206.
16. Dalum AS. Gjelleblødning hos atlantisk laks i RAS 2018 [Available from: <http://www.havbruk2018.no/node/547>].
17. R.J. Roberts AEE. *The Anatomy and Physiology of Teleosts*. Fish Pathology 2015. p. 21.
18. Veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten. 2017.
19. Veterinærinstituttet. Fiskehelse rapporten 2018. [www.vetinst.no](http://www.vetinst.no): Veterinærinstituttet; 2018.
20. Døving Kjell RE. *Fiskens fysiologi* 1992.
21. P. Farrell A. *Encyclopedia of fish physiology – from genome to environment*. Elsevier 2011.
22. Uribe C, Folch H, Enríquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review 2011. 486-503 p.
23. Pittman K, Sourd P, Ravnoy B, Espeland O, Fiksdal IU, Oen T, et al. Novel method for quantifying salmonid mucous cells. *Journal of fish diseases*. 2011;34(12):931-6.
24. Ferguson HW. *Systemic Pathology of fish*. 2 ed 2006.
25. Poppe TT. *Fiskehelse*: John Grieg Forlag.
26. Spear et al. Branchial lesions associated with intermittent formalin bath treatment of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of fish diseases*. 1997.
27. Moron SE, Matos PR, Ramos AT, Gomes MGT. Identification of glycoproteins in mucous cells of the gill epithelium of *Colossoma macropomum* after exposure to organophosphate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2018;70:837-42.



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)