

Dato: 28.10.2023

Faglig sluttrapport
FHF-prosjekt 901690

Metode som bruker kitinolytiske enzymer til å
forebygge og kontrollere lakselus

1. Sammendrag

Sammendrag

I dette prosjektet har vi evaluert en ny metode som bruker kitinolytiske enzymer for å kontrollere lakselus, med formålet å undersøke om den kan være et verdifullt tillegg til eksisterende behandlinger. For å kunne vurdere metoden, måtte vi først identifisere de mest passende kitinolytiske enzymene og deretter produsere dem. Etter omfattende karakterisering og vurdering ble *SmChiC* og *VaLPMO* valgt som de mest optimale enzymene for bruk under marine betingelser (pH 8, 0.6M NaCl og 12°C). Oppskalering av enzymproduksjon ble vellykket i en fermentor med kapasitet på 30 liter, og enzymene viste seg å være egnet for både frysing og frysetørking. Det var også av stor betydning at enzymene produserte kitooligosakkarider når lakselus ble brukt som substrat. I *in vitro* forsøk, der levende lakselus ble eksponert for kitinolytiske enzymer, kunne vi observere en tendens til at lakselus døde raskere i nærvær av enzymene. Det er imidlertid viktig å merke seg at slike forsøk ikke egner seg godt for å vurdere langsiktige effekter på lakselus, da lakselus naturlig vil dø når den fjernes fra sin vertsorganisme. Det ble derfor vurdert at det var viktig å utføre undersøkelser av effekten på lakselus som var eksponert for kitinolytiske enzymer *in vivo* på fisk. Dessverre observerte vi ingen signifikant forskjell mellom behandlingsgruppa og kontrollgruppa. Den manglende effekten kan muligens tilskrives det beskyttende slimlaget som omgir lusene på fisken. Vi forsøkte å undersøke dette ved hjelp av scanning elektron mikroskopi, men våre funn gav ingen entydige svar. Parallelt med fiskeforsøket, undersøkte vi også effekter på *off-target species*. Rekelarver eksponert for 10 mg/L kitinolytiske enzymer viste ingen negative effekter verken på overlevelse, utvikling, spiserate eller svømming.

Konklusjon: Badbehandling med kitinolytiske enzymer har vist seg å ikke være en egnet metode for å behandle luseinfisert fisk. Selv om kitooligosakkarider (nedbrytningsprodukter av kitin) frigis fra lakselus, og *in vitro* forsøk på lakselus gir lovende resultater, har det vist seg vanskelig å oppnå effektiv behandling av lakselus på fisken selv. Det som fortsatt gjenstår å utforske, er om bakterier som produserer kitinolytiske enzymer kan benyttes som probiotika i denne sammenhengen.

Abstract

In this project we have evaluated a new method that utilizes chitinolytic enzymes to control salmon lice, with the aim of investigating whether it could be a valuable addition to existing treatments. To assess the method, we first had to identify the most suitable chitinolytic enzymes and then produce them. After extensive characterization and evaluation, SmChiC and VaLPMO were selected as the most optimal enzymes for use under marine conditions (pH8, 0.6M NaCl and 12°C). The upscaling of enzyme production was successful in a 30L fermentor, and the enzymes proved suitable for both freezing and freeze-drying. It was also of significant importance that the enzymes produced chitooligosaccharides when salmon lice were used as a substrate. In in vitro experiments where live salmon were exposed to chitinolytic enzymes, we observed a tendency for the salmon to die more quickly in the presence of enzymes. However, it is important to notice that such experiments are not well suited for assessing long-term effects on salmon lice, as they naturally die when removed from their host organism. Therefore, it was considered important to conduct studies on the effect of salmon lice exposed to chitinolytic enzymes in vivo on fish. Unfortunately, we observed no significant difference between the treatment group and the control group. The lack of effect may possibly be attributed to the protective mucus layer surrounding the lice on fish. We tried to investigate this by scanning electron microscopy, but our findings did not provide clear answers. In parallel with the fish experiment, we also examined the effects on non-target species. Shrimp larvae exposed to 10 mg/L chitinolytic enzymes showed no negative effects on survival, development, feeding rate, or swimming activity.

Conclusion: Bath treatment with chitinolytic enzymes has proven to be an unsuitable method for treating fish infested with salmon lice. Despite the release of chitooligosaccharides (breakdown products of chitin) from salmon lice, as well as promising in vitro results on the lice, it has been challenging to achieve effective treatments of salmon lice on the fish themselves. What remains to be explored is whether bacteria that produce chitinolytic enzymes can be used as a probiotic in this context.

2. Innledning

Faglig bakgrunn:

Oppdrett av laks (*Salmo salar*) i norske fjorder og langs kysten er en viktig næring og et politisk og økonomisk satsingsområde. Økt miljømessig bærekraft og god fiskevelferd er prioriterte områder innen norsk havbruksnæring. Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en av de største utfordringene som havbruksnæringen står overfor. Parasitten finnes naturlig i havet og den kan raskt danne store populasjoner. Ved å spise slim, hud og blod fra verten forårsaker lakselusen skader på fisken. Dette kan igjen gjøre fisken mottakelig for sekundærinfeksjoner av bakterier, virus og sopp, og det kan påvirke saltbalansen hos fisken. Siden oppdrett av laks i stor grad skjer i åpne merder langs kysten, kan lakselus også spre seg fra oppdretts- til villfisk. Lusetallet og påvirkningen på villfisk er i dag dimensjonerende for videre utvidelse av oppdrettsnæringen i sjø.

I store deler av Norge har lakselus utviklet resistens mot kjemiske avlusingsmidler (Aaen, Helgesen, Bakke, Kaur, & Horsberg, 2015; Sevatdal & Horsberg, 2003; Treasurer, Wadsworth, & Grant, 2000). Siden det bare finnes noen få godkjente kjemiske avlusingsmidler, er dette problematisk. Næringen har derfor de siste årene redusert bruken av kjemiske avlusingsmidler, samtidig har bruken av alternative behandlingsformer som rensefisk og fysiske/mekaniske behandlingsmetoder økt. Kontroll med parasitten gjøres i dag ofte enten med langvarig bad i ferskvann eller kortvarig varmtvannsbad. For å opprettholde og øke produksjonen av laks, vil det være et behov for nye og forbedrede metoder til å kontrollere lakselus.

I dette prosjektet skal vi evaluere en ny behandlingsmetode som bruker kitinolytiske enzymer for å forebygge og kontrollere lakselus. Kitinolytiske enzymer angriper kitin i skallet hos lakselus. Det finnes ikke mye tilgjengelig kunnskap om lakselusens skall, men kitin syntese hemmere som Diflubenzuron og Teflubenzuron er blitt brukt til kjemisk avlusing (Aaen & Horsberg, 2016; Branson, Ronsberg, & Ritchie, 2000). Disse virker ved å hindre kitin syntesen og påvirker dermed skallskiftet til organismer med kitinholdig skall. Kitin syntese hemmere virker derimot ikke på voksne stadier som ikke lenger gjennomgår skallskifte.

Dersom den nye behandlingsmetoden lykkes, vil den ha mange fordeler:

1. Metoden er tilpasset dagens teknologi med åpne merder.
2. Den er skånsom mot fisken og dermed økes dyrevelferden. Ved forsøk er det vist at det ikke forekommer skade på laks som er blitt behandlet med kitinolytiske enzymer (FHF-prosjekt 901651).
3. Enzymene vil virke mot alle stadier av lakselus som har skall, altså også de voksne stadiene hos lakselus.
4. Ved å tilpasse enzymene, kan en behandle mot lakselus uavhengig av årstid (temperatur).
5. Metoden har miljømessige fordeler. Enzymene er proteiner som forventes å brytes ned raskt i naturen. Kitinolytiske enzymer forekommer dessuten naturlig i det marine miljøet. Etter behandling av merden, vil det være enkelt å samle opp et evt. overskudd av enzymer før behandlingsvannet slippes ut i naturen dersom dette skulle vise seg å være nødvendig. Dette kan gjøres ved å tilsette kitin, f. eks i form av rekeskall, som enzymene vil binde seg til.
6. Ettersom enzymene angriper et endeprodukt i syntesen, er det mindre sannsynlig at lakselus utvikler resistens fordi det ikke finnes feedback mekanismer.
7. Enzymer kan produseres i stor skala og formuleres som pulver eller konsentrerte løsninger med lang holdbarhet, på linje med vanlig industrielle enzymer. Derfor vil distribusjon til næringen være enkelt.

I prosjektet vil vi evaluere ulike kitinolytiske enzymer for å finne de beste enzymene og reaksjonsbetingelsene, samt dokumentere effektiviteten og gjennomføre miljødokumentasjon.

Prosjektets omfang:

Startdato: 01.10.2021

Sluttdato: 30.09.2023

Budsjett: 6 081 000 NOK

Tilleggsbevilgning: 100 000 NOK

Prosjektorganisering:Prosjektgruppe:

Ved Høgskulen på Vestlandet (HVL):

- Ingunn Alne Hoell, Professor
- Gunnar Thuestad, Høgskolelektor
- Marianne Nilsen, Førsteamanuensis

Ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU):

- Vincent Eijsink, Professor
- Gustav Vaaje-Kolstad, Professor
- Martin Larsen, Forsker

Ved NORCE:

- Renée Katrin Bechman, Forsker II

Referansegruppe:

- Ketil Rykhus, Sinkaberg-Hansen AS
- Ingebjørg Sævareid / Jan Olav Langeland, Salmon Group
- Gro Vee / Preben Antonsen, Mowi ASA

FHF-ansvarlig:

- Kjell Maroni

3. Problemstilling og formål

Prosjektets effektmål (betydning for næringen, nytteverdi):

For næringen vil nytteverdien knyttet til FHF-prosjekt 901690 bestå av økt kunnskap om en mulig ny metode for forebygging og kontroll av lakselus. God fiskevelferd og bærekraft er sentralt for næringen og innebærer blant annet: lave lusetall, minst mulig håndtering av fisken, at tiltakene igangsettes på riktig tidspunkt, og optimalisering av tiltakene for å sikre lengst mulig pause mellom behandlinger.

Flere av de eksisterende avlusingsmidlene kjennetegnes ved at de er mer giftige for lakselus enn for laksen som behandles, men de kan også være giftige for andre marine arter, såkalte non-target organismer. Bruk av den nye metoden med kitinolytiske enzymer reiser derfor spørsmål om påvirkning på miljøet rundt oppdrettsanlegg og mulig påvirkning på andre arter enn lakselus. Hvilken konsentrasjon og hvor lenge de ulike organismene utsettes for enzymene vil bestemme hvor stor effekten er. Miljødokumentasjon rundt metoden vil derfor gi et bedre kunnskapsgrunnlag for næringen, og slik miljødokumentasjon vil være viktig for næringens omdømme.

I tillegg vil resultatene kunne gi nødvendig sikkerhet for etablering av enzymproduksjon i større skala, og dermed gjøre metoden tilgjengelig for oppdrettsnæringen.

Prosjektets resultatmål (leveranser i prosjektet):

Hovedmålet med prosjektet er å framskaffe kunnskap om en ny behandlingsmetode som bruker kitinolytiske enzymer for å forebygge og kontrollere lakselus.

Vi har i tillegg følgende **delmål**:

- 1)** Finne de beste enzymene og kombinasjoner av enzymer, samt å finne reaksjonsbetingelser som er optimale, kan anvendes i merdene, og maksimerer LPMOenes effektivitet.
- 2)** Dokumentere effektiviteten av kitinolytiske enzymer mot lakselus slik at vi kan gi anbefalinger som gjelder behandling.
- 3)** Dokumentere hvordan kitinolytiske enzymer påvirker miljø, villfisk og skalldyr.

4. Prosjektgjennomføring

Beskrivelse av metodikk:

Enzymproduksjon:

- Kitinaser og LPMOer med høyt ekspresjonsuttrykk samt høy aktivitet mot kitin under marine betingelser (pH ~8, ~0.6M salt og ~12°C) ble identifisert gjennom litteratursøk. Kandidatenzymer ble også vurdert ut ifra likhet med kjente kitinolytiske enzymer, tilstedeværelse av kitinbindende domener, signal peptid etc. Aktuelle gener ble så klonet uten signalpeptid i pET100/D-TOPO vektoren og overuttrykt i ulike vertsstammer (*Vibrio natriegens* Vmax Express X2 kjemisk kompetente celler, *E. coli* ArcticExpress (DE3) og *E. coli* BL21 (DE3)). De rekombinante stammene ble dyrket som anbefalt av produsent og/eller relevant litteratur. Hoveddelen av de rekombinante enzymene ble sekretert til vekstmediet, men det var også noe enzym igjen i cellepellet. Supernatant og cellepellet ble lagret ved enten 4 eller -20°C, avhengig av tid før videre rensing. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0.45 µm filter og deretter oppkonsentrert via en filterkassett med enten 10- eller 30 kDa cut-off membran. Enzymløsningen ble så rensset med en avsaltingskolonne (når renhet av enzymet var høy) eller vha. en anionbytter kolonne (ved lavere renhet av enzymet). Protein konsentrasjon ble målt med Bradford, mens renhet ble estimert med Image Lab 6.0.1's relative quantification tools (densitometry).
- Etter hvert som prosjektet skred frem ble det klart at produksjonen av ChiC ved bruk av de enkle bioreaktorene (Harbinger systemet) var mindre effektivt enn forventet. Grunnen til dette var at det alltid var en uforutsigbarhet i proteinproduksjon per flaske, samt tidvis problemer med overbobling og tap av kultur. Oppkonsentreringen av supernatantene var også veldig tidkrevende. Det ble derfor bestemt å forsøke produksjon av ChiC i større skala, nærmere sagt i en 30 liters fermentor. Her ville vi ha full kontroll på alle parametere som pH, oksygenering og tilførsel av vekstmedium, hvilket ville gi mer forutsigbarhet for prosessen. Et så stort volum ville også tillate oss å benytte bioraffineringsutstyr for tofaseseparering og ultrafiltrering, hvilket ville gi store tidsbesparelser. Det måtte gjøres en endring i mediet for å tilpasse betingelsene til ståltankene, nemlig å bytte ut NaCl (veldig korrosivt) til Na₂SO₄ (lite korrosivt). Testforsøk med forskjellige konsentrasjoner Na₂SO₄ viste at *V. natriegens* vokste godt med dette saltet og produserte SmChiC som normalt. Basert på optimaliseringsforsøkene ble det bestemt å bruke 20 g/L Na₂SO₄ i mediet. En forkultur på 1 L ble dyrket opp i en 2 L fermentor og brukt som inokuler i 24 L vekstmedium i en 30 L fermentor. Etter en vekstfase på 16 timer ble kulturen høstet og overført til en tofaseseparator for å fjerne bakteriene fra kultursupernatanten. Etter dybdefiltrering for fjerning av bakterierester ble kultursupernatanten filtrert med ultrafiltrering. Mediet ble da byttet til 50 mM ammonium bikarbonat, en flyktig buffer som egner seg godt for frysetørking. Etter bytting av buffer og konsentrering av SmChiC ble retentatet frysetørket i aluminiumsbokser. Enzympulveret ble oppbevart i kjøleskap frem til bruk. Det skal nevnes av frysetørking av SmChiC og rekonstituering i buffer allerede hadde blitt utprøvd med stor suksess.

Enzymkarakterisering:

- *Kitin bindings-assay:* 15 µg av enzym ble tilsatt til finalt 200 µL av sjøvann med 20 g/L α-kitin. Etter 1 time ved 12°C og 800 rpm risting ble løsningen sentrifugert. Supernatanten ble analysert med SDS-page for å undersøke hvor mye ubundet enzym som var igjen. Pellet ble vasket 2 ganger med 500 µL sjøvann. Både pellet og supernatant ble analysert med SDS-page for å finne mengde av hhv. bundet og ubundet enzym.
- *Enzym aktivitets-assay:* Analyser av enzymatisk nedbrytning ble utført på α-kitin ettersom dette er den dominerende formen av kitin i kopepoder. α-kitin ble siktet gjennom en 500 µm stålsikt, deretter ble det laget en suspensjon med 20 g/L kitin i enten sterilt sjøvann eller dH₂O. For å sikre homolog suspensjon og reproducerbar pipettering av substratet, ble løsningen rørt med en magnetrører under pipettering.

Enzymaktivitet ble også sjekket mot intakte, døde lakselus. Før lusene ble tatt i bruk ble det utført minimum fem fryse/tine sykluser på dem. Mellom hver syklus ble lusene vasket med sterilfiltrert sjøvann for å drepe den naturlige mikroflora hos lakselusene. Lakselusene ble lagret ved -80°C og tint ved behov.

Tilstedeværelse av løselig kitinfragmenter (hovedsakelig GlcNAc and GlcNAc₂) i prøver fra enzym aktivitets-assayene ble kvantifisert ved hhv. MBTH reduserende ende assay eller ionebytter kromatografi (med REZEX kolonne). I MBTH metoden utgjør absorbansen ved 620 nm et mål for antallet reduserende ender blant suktermolekylene i prøvene, nærmere beskrevet i Horn & Eijsink (2004). Man kan analysere prøver med høyt saltinnhold med denne metoden, men det er ikke mulig å detektere oksiderte produkter. REZEX kolonnen kan derimot detektere oksiderte produkter, men kan ikke brukes til å analysere prøver som inneholder sjøvann. Kontrollmålinger ble foretatt med kitobiose standardløsninger for både MBTH og REZEX kolonna.

- *Langtidslagring av enzym:* Konsentrerte enzymløsninger ble lagret ved 4°C eller frosset ved hhv. -20°C og -80°C, med og uten 10% glycerol, for å undersøke stabiliteten til enzymene under langtidslagring.

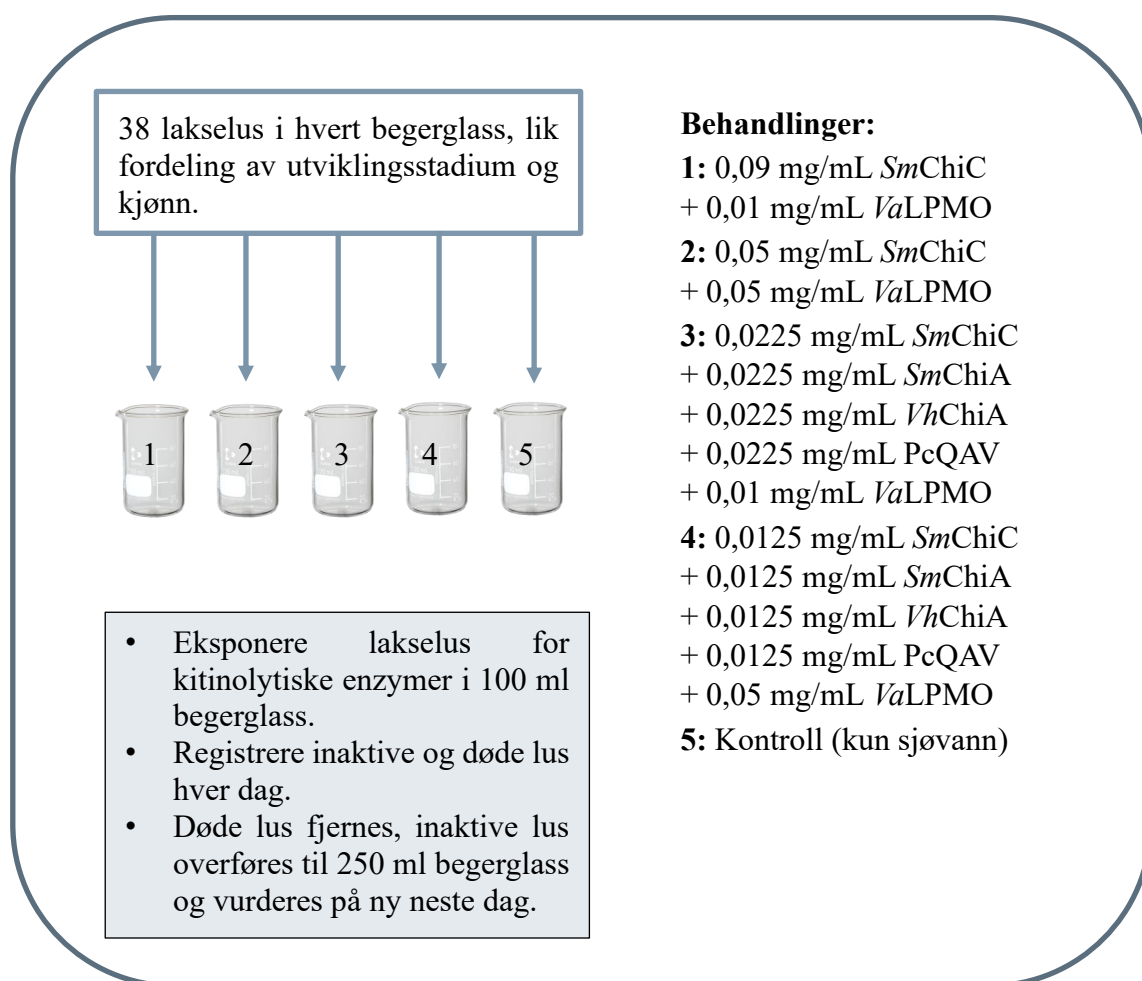
In vitro forsøk på lakselus:

- *Høsting av lakselus:* Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) ble hentet ved oppdrettsanlegg i nærheten av HVL, campus Haugesund, i forbindelse med lusetelling som ble utført av personell på stedet. Fisken ble da bedøvet etter vanlige rutiner med Benzoak Vet. Etter telling, mens fisken fortsatt ble holdt, ble lusene fjernet fra fisken ved hjelp av to tynne plastkort. Lusene ble umiddelbart overført til en 20 liters plastbøtte med sjøvann. Under transport tilbake til laboratoriet, ble luft (1L/min) kontinuerlig tilført sjøvannet vha. luftpumpe (Elite 802 med silikonslange og boblestein), og temperaturen ble holdt lav vha. kjøleelementer.
- *Eksponering med kitinolytiske enzymer:* Forsøkene ble gjennomført ved 15°C i et inkubatorskap med temperaturvariasjon +/- 0.5 °C. Ved starten av eksperimentet ble lakselus fordelt i begerglass med sterilt sjøvann slik at det var like mange lakselus av hvert kjønn og utviklingsstadium i hvert begerglass. Under forsøkene ble begerglassene tilført 0.2 µm sterilfiltrert luft fra luftpumpe. Luften ble fordelt til begerglassene via silikonslanger med individuelt justerbart luftvolum. Lufttilførsel pr. begerglass var >6 ml/minutt. Begerglassene ble dekket til for å redusere fare for sprut og kontaminering mellom ulike behandlinger. En oversikt over de ulike eksponeringsforsøkene er gitt under.
- *Evaluerer av overlevelse:* Overlevelse av lakselus ble registrert 2 ganger daglig. Lus som tydelig var døde, f. eks var degradert, ble fjernet umiddelbart. For å vurdere de resterende lakselusene, ble begerglassene rotert i sirkelbevegelser. Lakselus som fremdeles hang fast på glassveggen, ble pirket borti med en steril podenål for å undersøke svømmeaktivitet. Lakselus som både holdt seg fast i glassveggen og som svømte eller beveget seg, ble vurdert som levende. Lakselus som derimot ikke klarte å holde seg fast i glassveggen ble individuelt sjekket. Lusene ble da overført til nytt begerglass med sterilt sjøvann hvor de ble observert i flere minutter for bevegelse (ikke kun svømming, men alle typer bevegelse). Dersom lusene beveget seg under observasjonen, ble de ført tilbake til begerglasset sammen med de andre lakselusene. Dersom lusene ikke viste noen tegn til bevegelse, ble de holdt adskilt fra de andre til neste dag for en endelig avgjørelse på levedyktighet; dersom fortsatt ingen bevegelse neste dag, ble lakselusene vurdert som døde.

Eksponeringsforsøk 1 in vitro forsøk på lakselus: Finne beste enzymkombinasjon

Figur 1 viser en skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet. Hensikten med dette forsøket var å finne beste enzymkombinasjon. Vi ønsket å sammenligne *SmChiC* med en enzymmix med flere kitinaser (i tillegg til *SmChiC*, var også kitinasene *SmChiA*, *VhChiA* og *PcQAV* inkludert). Det er kjent at det kan oppstå synergieffekter ved å kombinere ulike enzymer. I tillegg inneholdt alle enzymbehandlingene *VaLPMO*.

Total enzymkonsentrasjon i hver av de fire ulike enzymbehandlingene var 0.1 mg/mL. I tillegg var det et begerglass som kun inneholdt sjøvann som ikke ble tilsatt enzym (kontroll). For å finne et godt forholdstall mellom kitinaser og LPMO, testet vi hhv. 9:1 og 1:1 forhold. Det ble ikke utført replikater av de ulike behandlingene for å spare både enzym og lakselus, samt å få mest mulig informasjon raskt i disse innledende forsøkene.

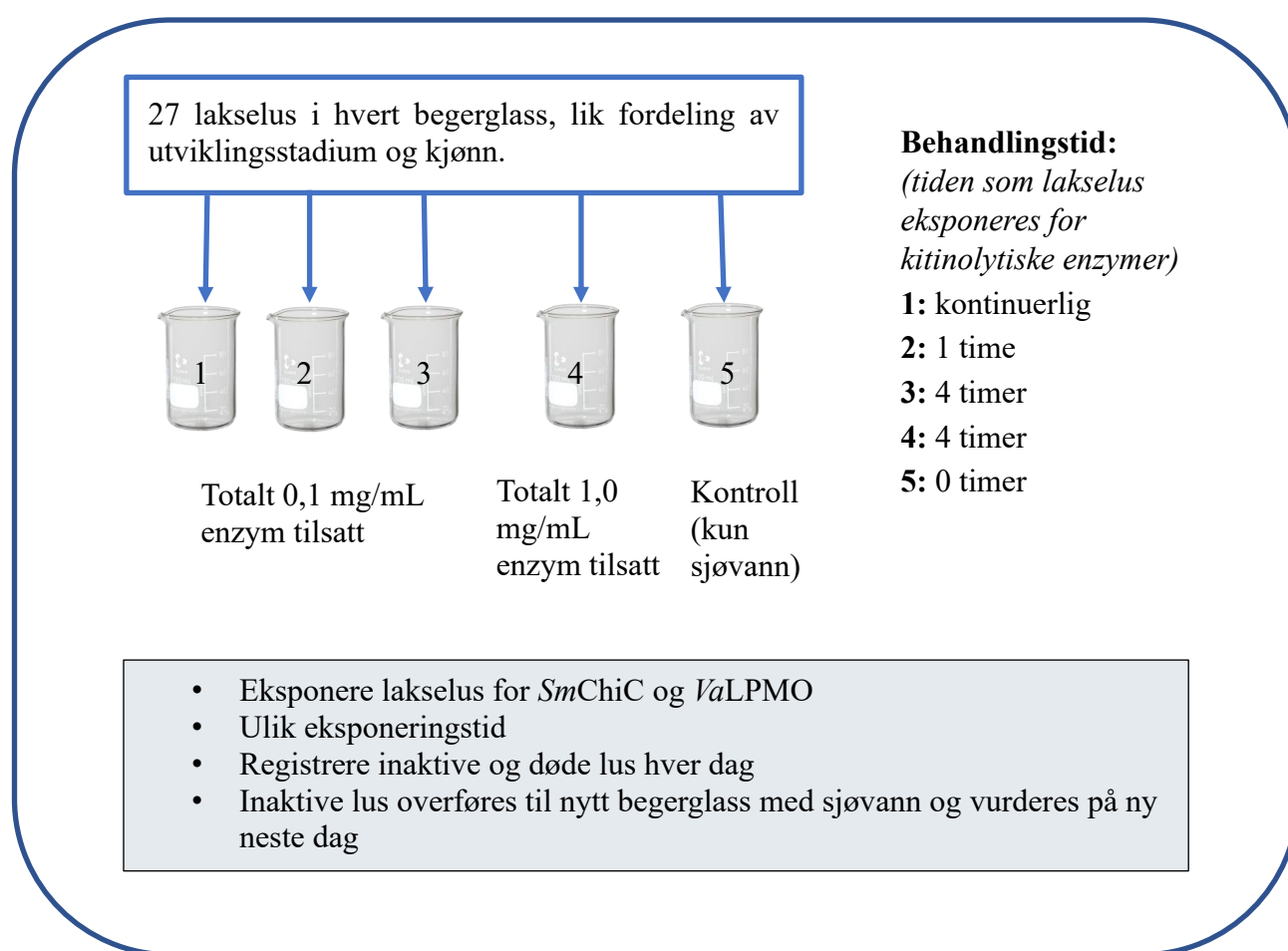


Figur 1: Skjematisk framstilling av forsøksoppsettet som ble brukt for å velge enzymblanding til videre *in vitro* og *in vivo* eksperimenteringsforsøk.

Eksponeringsforsøk 2 in vitro forsøk på lakselus: Finne optimal behandlingstid

Figur 2 viser en skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet. Hensikten med dette forsøket var å finne optimal behandlingstid.

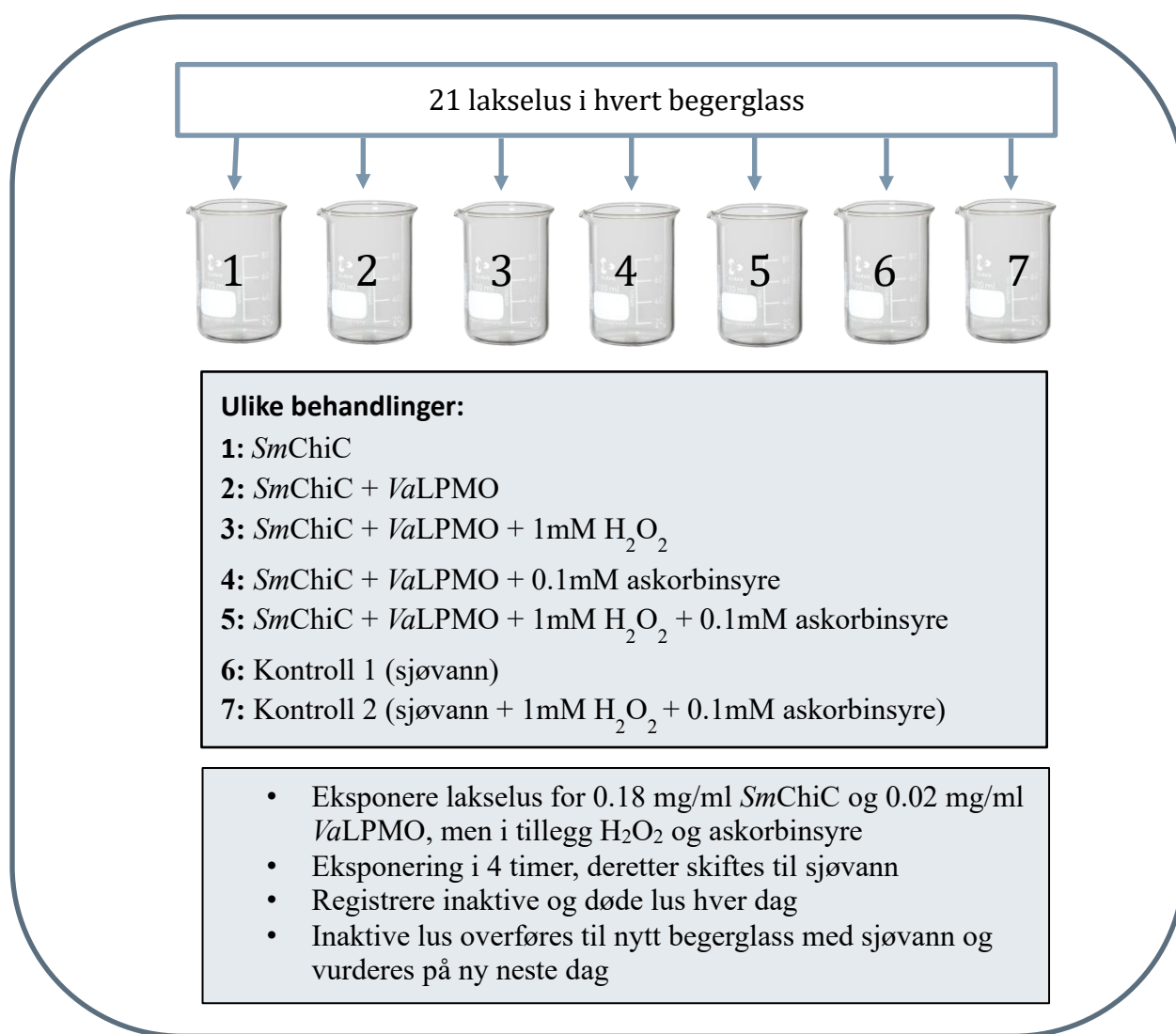
- Alle enzymbehandlingene inneholdt *SmChiC* og *VaLPMO*, hhv. i forholdet 9:1. Total enzymkonsentrasjon i enzymbehandlingene nr. 1-3 var 0.1 mg/mL, mens enzymbehandling nr. 4 hadde total enzymkonsentrasjon 1.0 mg/mL. Begerglass nr. 5 inneholdt sjøvann (kontroll). Det ble ikke utført replikater av de ulike behandlingene for å spare både enzym og lakselus, samt å få mest mulig informasjon raskt i disse innledende forsøkene.
- Behandlingstiden ble variert for å finne optimal behandlingstid. Enzymbehandling nr. 1-3 med 0.1 mg/ml total enzymmengde ble eksponert hhv. kontinuerlig, 1 time og 4 timer. I tillegg testet vi kort behandlingstid, men med høyere enzymkonsentrasjon (1.0 mg/ml).



Figur 2: Skjematisk framstilling av forsøksoppsettet som ble brukt for å finne behandlingstid for videre *in vitro* og *in vivo* eksperimenteringsforsøk.

Eksponeringsforsøk 3 in vitro forsøk på lakselus: vurdering av nytteverdi av LPMO, samt optimalisering av enzymaktivitet.

Figur 3 viser en skjematisk fremstilling av forsøksoppsettet. Hensikten med dette forsøket var å vurdere nytteverdien av LPMO, samt å optimalisere enzymaktiviteten vha. H_2O_2 og askorbinsyre.

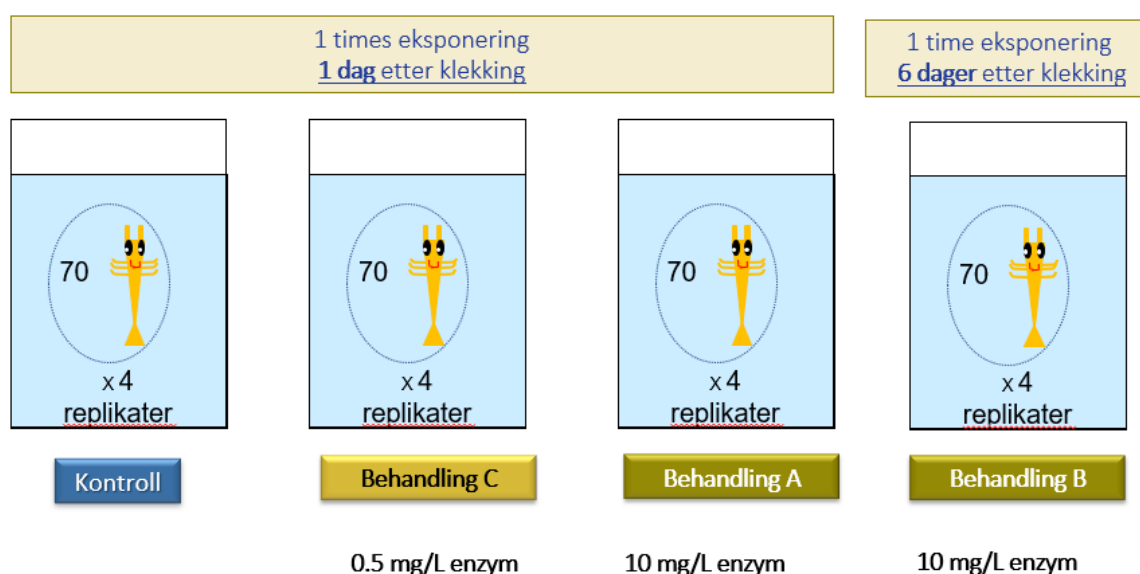


Figur 3. Skjematisk framstilling av det planlagte forsøksoppsettet for å undersøke hvordan behandlingen med *SmChiC* kan effektiviseres.

In vitro forsøk på krepsdyr:

- **Godkjenning av forsøk:** Alle eksperimentene ble på forhånd godkjent i Dyreforsøksnemda (FOTS id 30047) ettersom dypvannsreker tilhører tífotkreps og er inkludert i «Forskrift om bruk av dyr i forsøk».
- **Høsting av reker:** Dypvannsreker (*Pandalus borealis*) ble høstet ved hjelp av teiner på omtrent 100 meters dyp. Rekene ble deretter transportert til laboratoriet (NORCE, Mekjarvik) hvor de ble akklimatisert i 1 måned. I denne perioden ble rekene gitt 2 mm pellets av fiskefôr *ad libitum*.
- **Eksponering med kitinolytiske enzymer:** Forsøket ble gjennomført i et temperaturregulert rom ved 7°C og med temperaturregulert sjøvann. Sjøvannet hentes fra 80 meters dyp. Det ble gjennomført fire replikater av hver behandling (for oversikt se figur 4):
 - kontroll (uten tilsatt enzym)
 - behandling A (1 dag gamle rekelarver eksponert for 10 mg/L enzym i 1 time)
 - behandling B (6 dager gamle rekelarver eksponert for 10 mg/L enzym i 1 time)
 - behandling C (1 dag gamle rekelarver eksponert for 0.5 mg/L enzym i 1 time)

Behandling A og B tilsvarer 50x fortynnet enzymløsning sammenlignet med dose som skal brukes i fiskeforsøk (0.5 mg/ml i 8 timers behandling). Behandling C tilsvarer 1000x fortynnet enzymløsning.

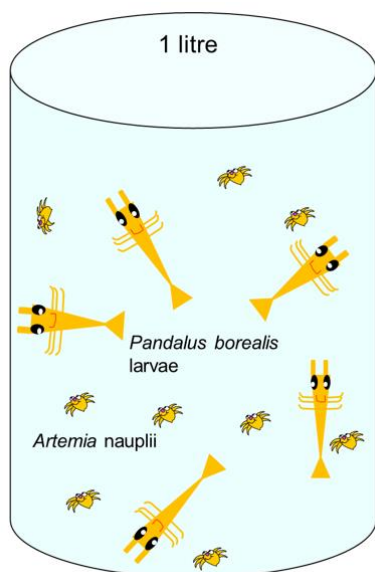


Figur 4: Skjematisk framstilling av forsøksoppsettet for å undersøke effekt av eksponering med kitinolytiske enzymer på overlevelse og utvikling hos rekelarver.

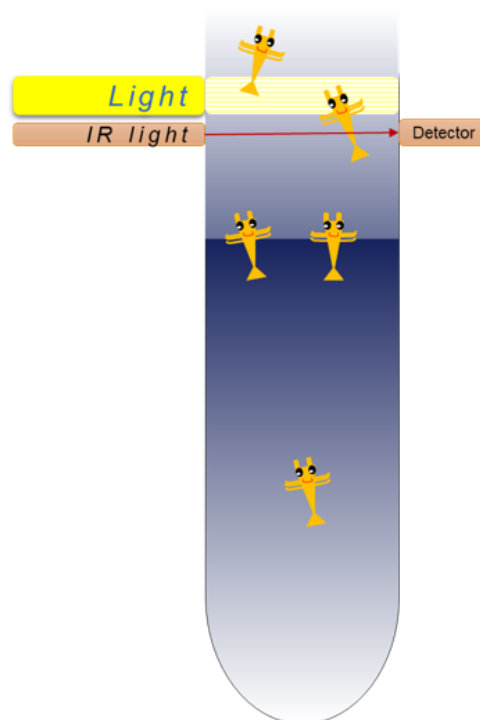
Ved starten av eksperimentet ble 70 larver tilsatt enten i 3-liters glassboller (for kontroll, behandling A og C) eller i 12 liters akvarier (for behandling B). Rekelarvene ble eksponert statistisk i 1 time for kitinolytiske enzymer enten første dag etter klekking (behandling A og C) eller 6 dager etter klekking (behandling B). Omtrent 6 dager etter klekking gjennomgår rekelarvene skallskifte mellom stadium I og stadium II. Larvene i kontrollen ble behandlet likt som rekelarvene som ble behandlet med enzymer og ble derfor holdt 1 time i 3 liters glassboller dag 1 etter klekking. Etter 1 time ble larvene tellet og overført tilbake til 12 liters akvarier med gjennomstrømmende sjøvann. Ved dag 3, 6, 9, 12 og 14 ble det registrert overlevelse og utviklingsstadium for larvene med behandling A, behandling B, samt kontroll. Tilsvarende ble overlevelse og utviklingsstadium til larvene registrert ved dag 9, 12 og 14 for behandling B. Ved individuell sjekk av larvene ble de overført til en glassbolle: Aktive (normale) larver vil da svømme/bevege seg, mens svake larver legger

seg på bunnen av glassbollen og beveger seg bare når de blir forstyrret av vann fra en pipette.

- **Fôringsforsøk:** 14 dager etter at larvene var blitt eksponert for kitinolytiske enzymer, ble det utført et fôringsforsøk som beskrevet i Arnberg *et al.* (2013) (Figur 5). Fem larver i stadium II ble overført fra hvert akvarium og over i 1L glassflasker. Forsøket ble utført i temperaturregulert rom (7°C), og rekelarvene ble sultet i 24 timer før oppstart av eksperimentet. Nyklekkede *Artemia nauplii* (150 indiv. L⁻¹) ble tilsatt i hver glassflaske med rekelarvene, og deretter ble flaskene forseglet. Etter 6 timer ble rekelarvene forsiktig fjernet fra glassflaskene, og gjenværende *Artemia nauplii* ble telt. Fôringsrate ble så beregnet ved antall *Artemia* konsumert per rekelarve per tidsenhet (antall *Artemia* indiv⁻¹ time⁻¹).
- **Svømmetest:** 14 dager etter at larvene var blitt eksponert for kitinolytiske enzymer, ble det utført en svømmetest (Figur 6). Testen baserer seg på at rekelarver svømmer mot hvitt lys (phototaxy). Svømmeaktivitet blir automatisk registrert vha. detektorer når rekelarvene passerer en stråle med infrarødt lys. Metoden er nærmere beskrevet i Bechmann *et al.* (2020), og en modifikasjon i vårt forsøk var at loggingsfrekvensen var 0.5 sek istedenfor 0.2 sek. Fem larver i stadium II fra hvert akvarium ble testet i 1 time.



Figur 5: Fôringsforsøk ble gjennomført 14 dager etter at rekelarvene var blitt eksponert for kitinolytiske enzymer.



Figur 6: Svømmetest ble gjennomført 14 dager etter at rekelarvene var blitt eksponert for kitinolytiske enzymer.

In vivo forsøk av lakselus på fisk:

- *Godkjenning av forsøk:* Eksperimentet ble på forhånd godkjent i Dyreforsøksnemda (FOTS søknad gjennomført av Ilab) ettersom fisk tilhører virveldyr og er inkludert i «Forskrift om bruk av dyr i forsøk».
- *Eksposering med kitinolytiske enzymer:* Selve fiskeforsøket ble gjennomført som beskrevet under:
 - 15. mai: Pit tagging av fisk
 - 22. mai: 0-prøver og velferdsscore av 10 fisk
 - 23. mai: Smitte av fisk i ett kar med copepoditter (30 copepoditter per fisk)
 - 14. juni: Samle alle fisk, registrere vekt, velferdsscore, antall lus og deretter fordele fisk ut i 2 kar med hensyn til antall lus og vekt.
 - 15. juni: Behandle i 8 timer (volum under behandling var 100 liter sjøvann inkludert enzymer/buffer).
 - 29. juni: Patologisk undersøkelse av 5 fisk fra hvert kar (totalt 10 fisk) + lusetelling og plukke eggstrenger fra lus i hvert kar. De to gruppene av eggstrenger går videre til klekkesuksess.
 - Det ble tatt ut vannprøver 1) før tilsetning av enzym, 2) umiddelbart etter tilsetning av enzym og 3) etter 8-timers behandling. Disse vannprøvene ble senere undersøkt for enzymaktivitet.
 - Det ble også tatt vare på lakselus (i formalin) både fra 15. juni og fra 29. juni. Lusene ble senere undersøkt med scanning elektron mikroskopi (SEM).
- *Klekkesuksess:* 29. juni hadde alle hunnlus fått andre eggstrengpar. Det ble da tatt av en streng fra 9 forskjellige lus i både kontroll- og behandlingsgruppen. Alle eggstrengene ble klippet til lik lengde (1.2 cm) og inkubert i spesiallagde kopper med nett i bunnen med gjennomstrømmende vann ved 9°C mellom 09.06.2023 og 11.07.2023, deretter ved 6°C mellom 11.07.2023 og 19.07.2023. Når klekket naupli hadde utviklet seg til copepoditter ble disse talt gruppevis.
- *Enzymaktivitet i vannprøvene:* For å verifisere at enzymene var aktive i fiskeforsøket, ble vannprøver 1) Før tilsetning av enzym, 2) Umiddelbart etter tilsetning av enzym, og 3) Etter 8-timers enzym-behandling, undersøkt for kitinase-aktivitet. Aktivitet i vannprøvene ble testet med 100 µM 4MU-(NAG)₂ som substrat i reaksjonene ved 37°C i 10 minutter.
- *SEM:* For å undersøke om det var mulig å observere skader i lakselusens skall etter behandling, ble følgende lakselus undersøkt med SEM: 1) Lakselus i sjøvann fra *in vitro* forsøk (kontroll), 2) Lakselus behandlet med enzym fra *in vitro* forsøk, 3) Lakselus i sjøvann fra *in vivo* forsøk (kontroll), og 4) Lakselus behandlet med enzym fra *in vivo* forsøk.
 - *Dehydrering:* Prøvene var allerede fiksert i formalin. De ble først vasket i 0.05M PIPES buffer, pH 7 i 3 x 15 minutt. Deretter ble prøvene dehydrert ved å vaske i økende EtOH konsentrasjoner: 1) 30% EtOH i 15 min, 2) 50% EtOH i 15 min, 3) 70% EtOH i 15 min, 4) 90% EtOH i 15 min, 5) 96% EtOH i 15 min, og 6) 100% EtOH i 4 x 15 min.
 - *Kritisk punkt tørking:* Lakselusene i 100% EtOH ble overført til en beholder som også var senket ned i 100% EtOH. Hele beholderen ble satt ned i et kammer med 100% EtOH i BALTEC CPD030 Kritisk punkt tørker. Kammeret ble deretter stengt og temperaturen senket til 10°C. Deretter ble 100% EtOH byttet ut med flytende CO₂ i kammeret, før temperaturen ble økt til 40°C, og trykkventilen ble åpnet.
 - *Montering (preparatoppsett):* De tørkede lakselusene ble montert på runde stubs (prøveholdere) ved hjelp av dobbeltsidig svart tape.
 - *Sputtering (Platina coating):* Preparatene i prøveholderene ble plassert i et Leica EM ACE200 instrument, hvor lufta i vakuumkammeret ble fjernet, for så å bli fylt

med argongass. Den ioniserte gassen sørger for at platinaatomer *coater* prøvene på overflaten, såkalt *diffuse sputtering*. Tykkelsen på *coating* var 40 nm lag.

Gjennomføring av prosjektet:

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

AP1 (Identifisering, produksjon og karakterisering av kitinolytiske enzymer) har vært ledet av NMBU. Arbeidspakken ble delt inn i tre deler (A, B og C), med følgende innhold:

A) Identifisering og grundig vurdering av kitinolytiske enzymer som virker effektivt under miljøforholdene i havet (35‰ salinitet, lav temperatur og pH 8).

B) Karakterisering av aktuelle enzymkandidater ved å:

- bestemme enzymaktivitet for enkeltzymer under tilsvarende miljøbetingelser som i havet, samt bestemme hvor godt enzymene binder til kitin. Av substrater ble det brukt både standard kitinsubstrater, men også lakselus under mest mulig reelle betingelser.
- undersøke lagringsbetingelser, f. eks sjekke om enzymene tåler å fryses, frysetørkes og om det er nødvendig å bruke (vanlige) tilsetningsstoffer.
- undersøke stabilitet av enzymene i sjøvann.

C) Produksjon og rensing av utvalgte kitinolytiske enzymer i medium skala med påfølgende rensetrinn i form av fraksjonering og kromatografi. NMBU leverte enzymer til gjennomføring av *in vitro* forsøk på lakselus ved HVL, til *in vitro* forsøk på krepsdyr ved NORCE, og til *in vivo* forsøk av lakselus på fisk ved Ilab.

AP2 (Testing av kitinolytiske enzym på levende lakselus under laboratorieforhold og *in vivo* på fisk) har vært ledet av HVL. Denne arbeidspakken har vært delt i to deler (A og B), med følgende innhold:

A) Eksponeringsforsøk på lakselus for å finne lovende enzymer/enzymkombinasjoner, samt optimale reaksjonsbetingelser, har foregått ved HVL.

B) *In vivo* eksponeringsforsøk på levende fisk infisert med lakselus ble gjennomført ved Ilab. Her var målet å eventuelt bekrefte effekten av kitinolytiske enzymer.

I tillegg er det gjennomført undersøkelser av enzymaktivitet fra vannprøvene samt scanning elektron mikroskopi av lakselus fra *in vivo* forsøket.

AP3 (Vurdering av effekter på miljø, villfisk og krepsdyr) har vært ledet av HVL. For studier av effekt på krepsdyr var den opprinnelige planen å bruke sjøkreps som forsøksorganisme. Pilotforsøket viste at denne organismen var uegnet til formålet, og denne delen av prosjektet ble derfor søkt endret. Ved NORCE i Mekjarvik ble i stedet larver av dypvannsreke brukt som forsøksorganisme. Hensikten med forsøket var å undersøke om en kort eksponering for kitinolytiske enzymer kan gi signifikante negative effekter på overlevelse, larveutvikling, spiserate og svømmeaktivitet for rekelarver.

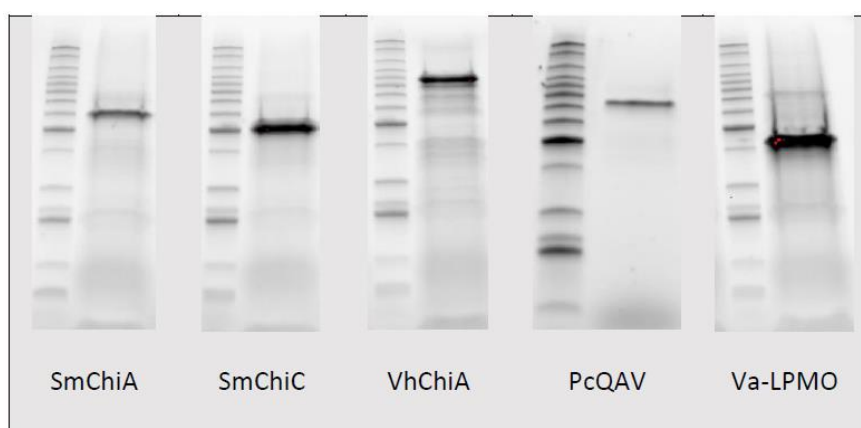
AP4 (Prosjektledelse og administrasjon) har vært ledet av HVL, og inkluderer kommunikasjon og samordning mellom de samarbeidende fagmiljøene, rapportering til FHF, og formidling og kommunikasjon med øvrige fagmiljø, næringen, myndigheter og allmennheten. Ved behov ble det arrangert digitale møter for fagmiljøene for å sikre god kommunikasjon og framdrift, og ellers foregikk mye av kommunikasjonen via e-post. Jevnlige møter med referansegruppen oppnevnt av FHF var viktig for fremdrift i prosjektet og sørget for innspill og råd fra næringen underveis.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

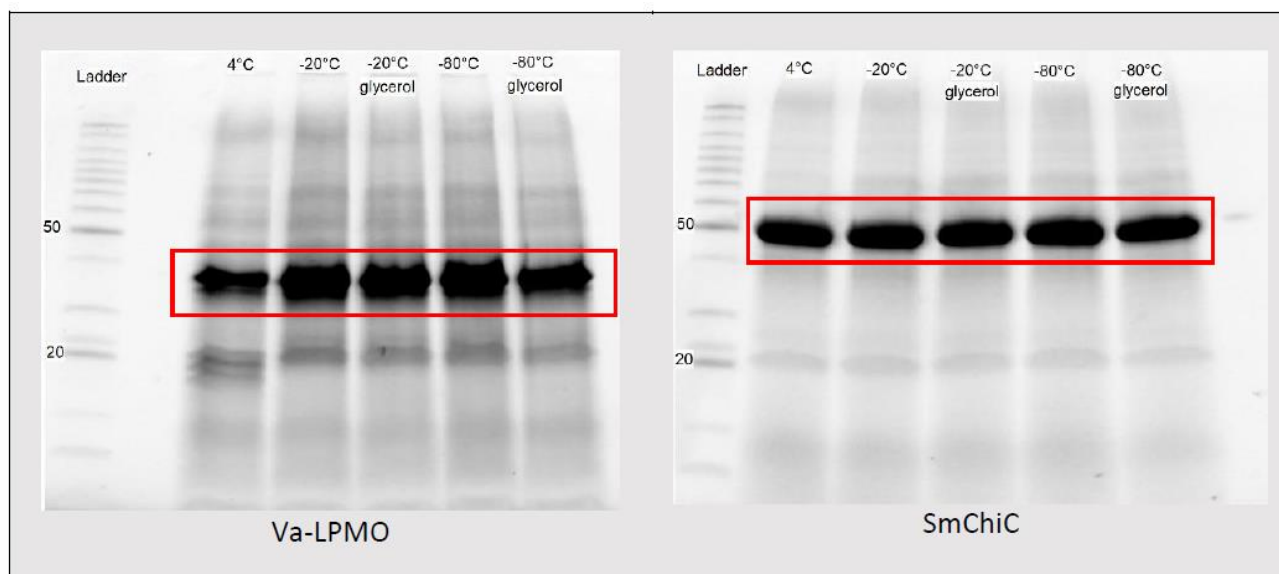
Oppnådde resultater:

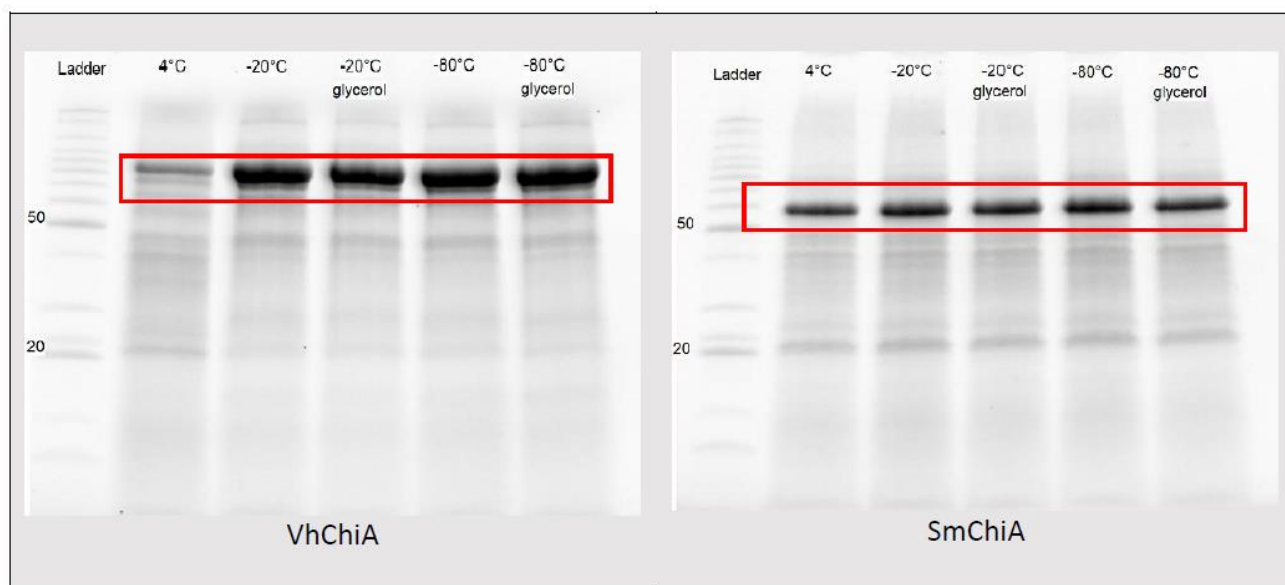
Enzymproduksjon:

Flere gode enzymkandidater med aktivitet ved marine forhold (pH ~8, temperatur ~12°C og ~0.6M NaCl) ble identifisert, klonet og overuttrykt. Effektive produksjons- og rensete metoder ble utviklet for disse kandidatenzymene. Proteinproduksjon gav et utbytte på mellom 150-450 mg rent enzym per liter kultur (for renhet se figur 7). Ved karakterisering viste de rensede proteinene høy stabilitet under langtidslagring ved -20 og -80°C, noe som var av stor betydning for sikker lagring av enzymene (se figur 8 og 9).

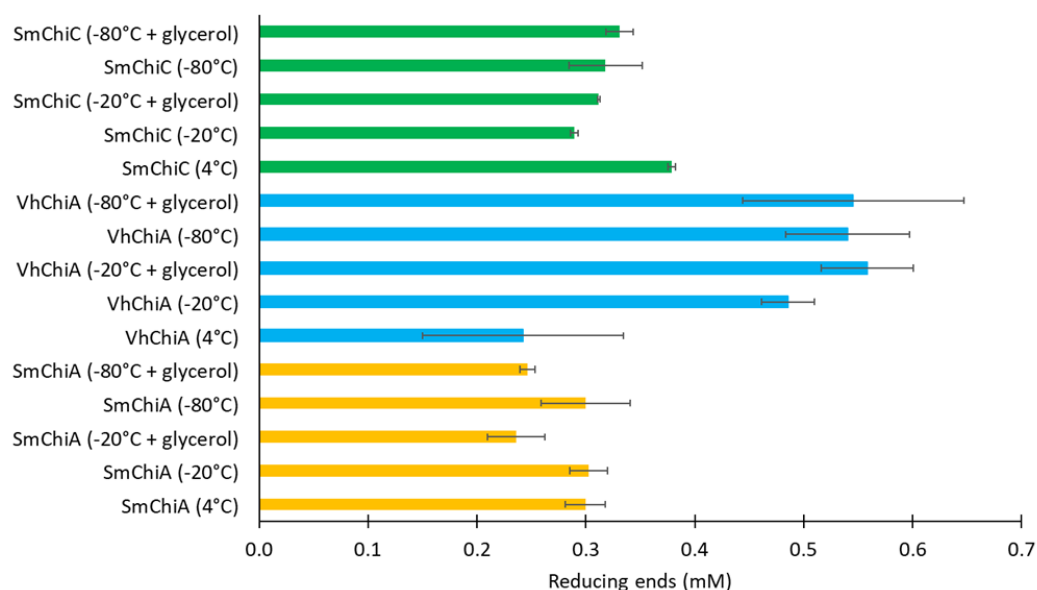


Figur 7. SDS-PAGE analyse av rensede enzymer. Molekylvektstandard vises til venstre for hvert enzym. Båndene i standarden øker med 10 kDA, og de to båndene med høyest intensitet representerer molekylvekter på hhv. 20 (nederst) og 50 kDA (øverst).





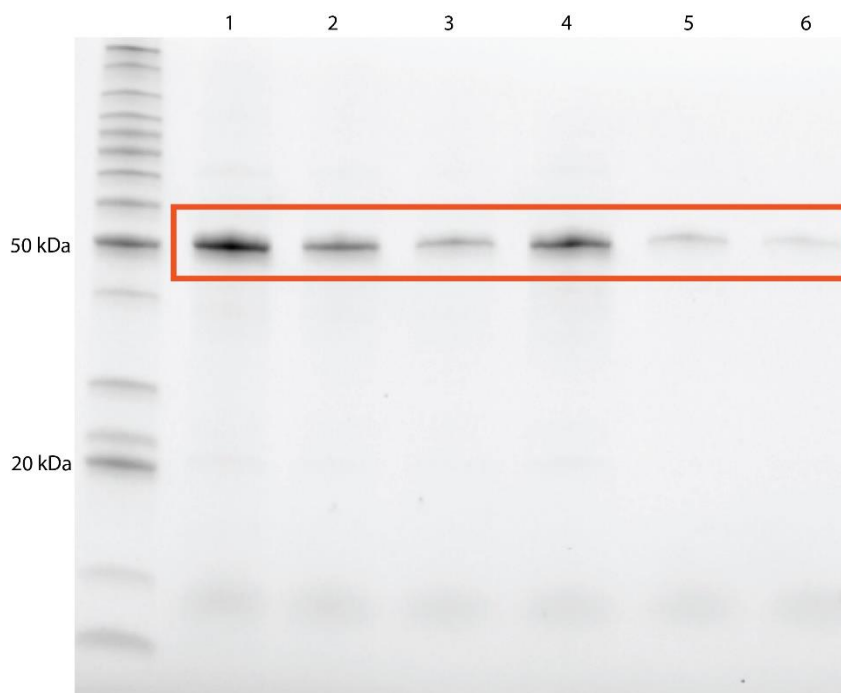
Figur 8. SDS-page viser integritet til enzymene etter lagring i mer enn 4 uker ved hhv. 4°C, -20° og -80°C, med og uten 10% glycerol. Enzymene er markert i de røde boksene.



Figur 9. Sammenligning av aktivitet mellom ulike enzymer etter lagring i mer enn 4 uker ved hhv. 4°C, -20° og -80°C, med og uten 10% glycerol. Hver av reaksjonene ble tilsatt 1 µM Va-LPMO (lagret ved 4°C). Duplikater av hver reaksjonene ble inkubert ved 12°C i 3 timer ved 700 rpm.

Produksjon av SmChiC i 30 liters fermentor, inklusive frysetørking:

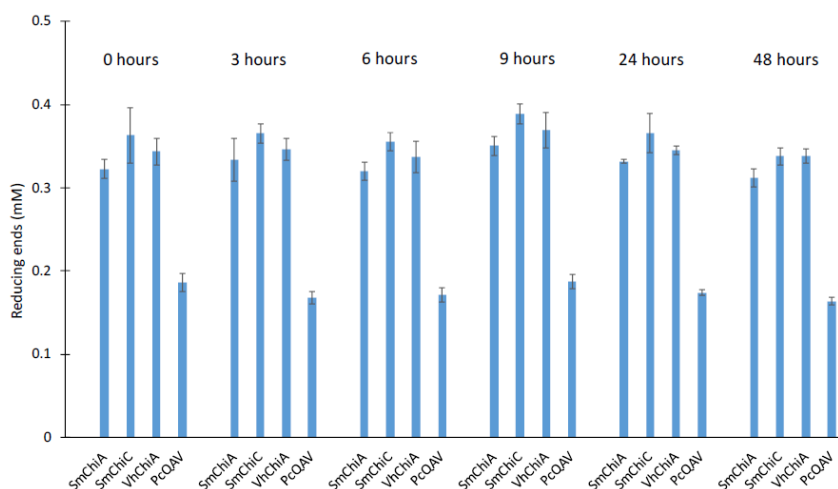
SmChiC ble produsert ved dyrking av 30 L 2xYT med 20 g/L Na₂SO₄. Etter høsting og tofaseseparering ble den SmChiC-inneholdene supernatanten ultrafiltrert og konsentrert til 11.8 L retentat, da justert til 50 mM ammonium biokarbonat. Analyse av konduktivitet indikerte minimale mengder gjenværende Na₂SO₄. Frysetørking av retentatet ga 16.4 g SmChiC som viste renhet sammenliknbart med SmChiC rensset fra småskalaproduksjon (Figur 10). Aktivitetsanalyse viste at enzymet var omtrent like aktivt som SmChiC rensset i liten skala (0.5 L).



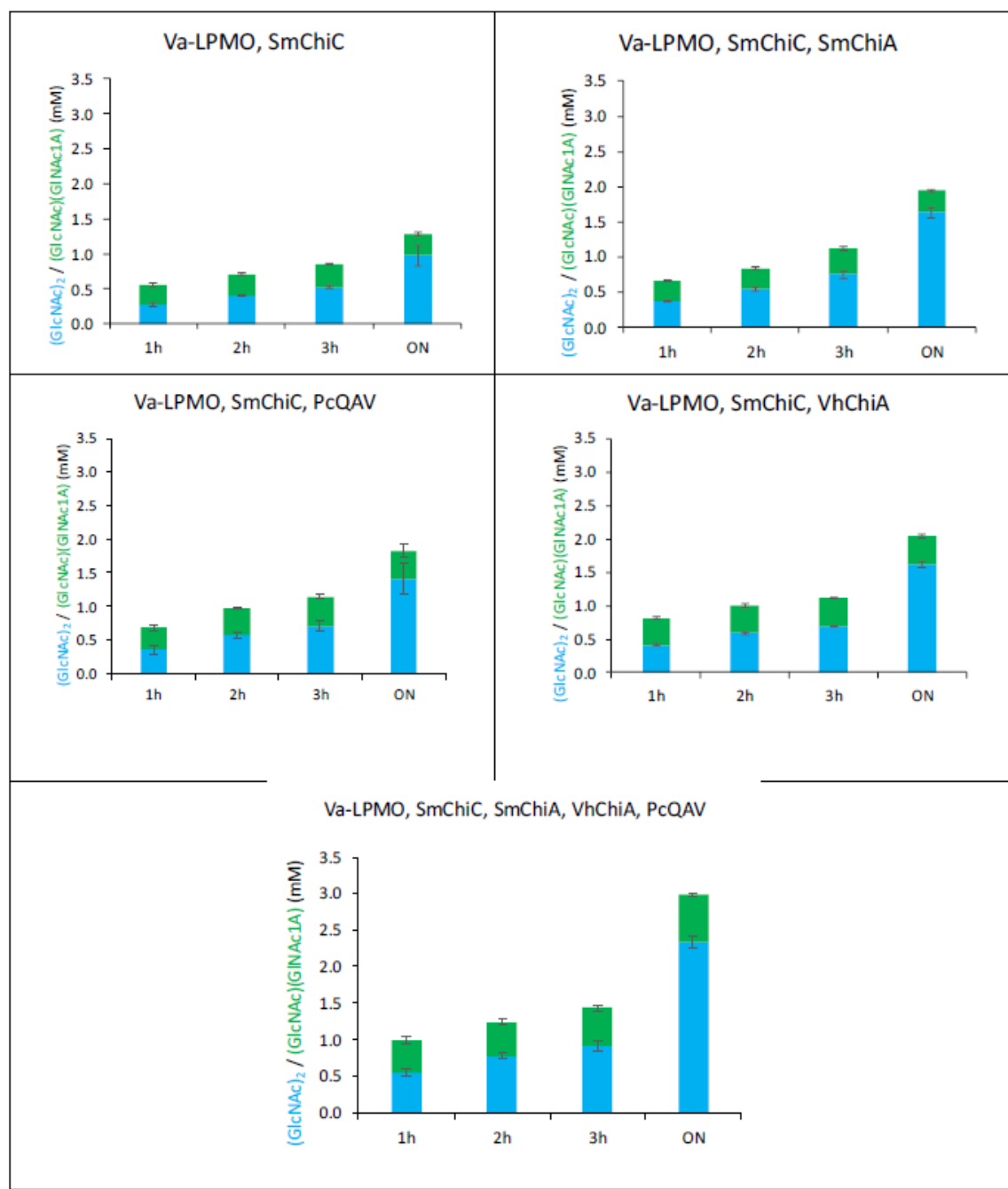
Figur 10. SDS-PAGE analyse av SmChiC produksjon. Brønnene 1-3 og 4-6 viser 1/5, 1/10 og 1/20 fortynninger av SmChiC henholdsvis renset fra småskala (0.5 L) og storskala (30 L) produksjon. Molekylvektstandard vises til venstre. Båndene i standarden øker med 10 kDa, og de to båndene med høyest intensitet representerer molekylvekter på hhv. 20 (nederst) og 50 kDa (øverst).

Enzymkarakterisering:

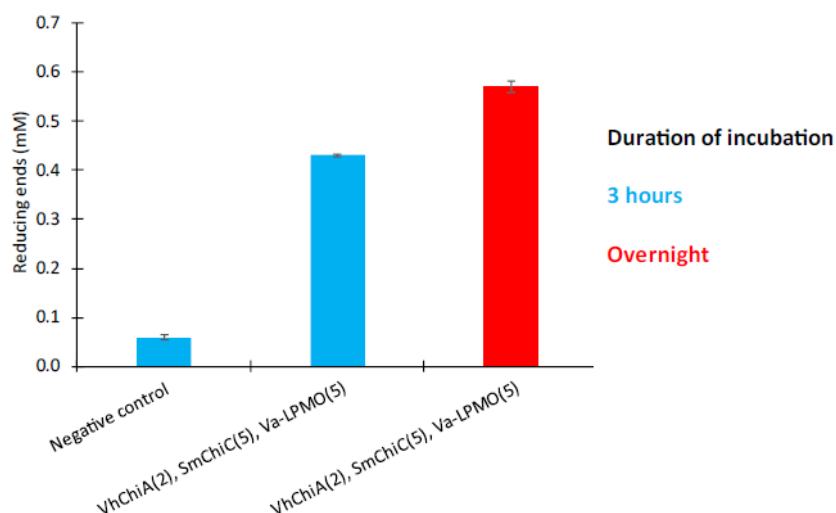
Enzymene viste stabilitet under relevante betingelser og inkubasjonstider (1-3 timer ved 12°C i sjøvann) (figur 11). Enzymene viste affinitet mot kitin (resultater ikke inkludert), og aktivitetsassay med α -kitin som substrat viste at det ble dannet nedbrytningsprodukter både i buffer og i sjøvann (figur 12). Av stor betydning var det at i reaksjoner med lakselus som substrat ble det dannet nedbrytningsprodukter av kitin (figur 13 og 14).



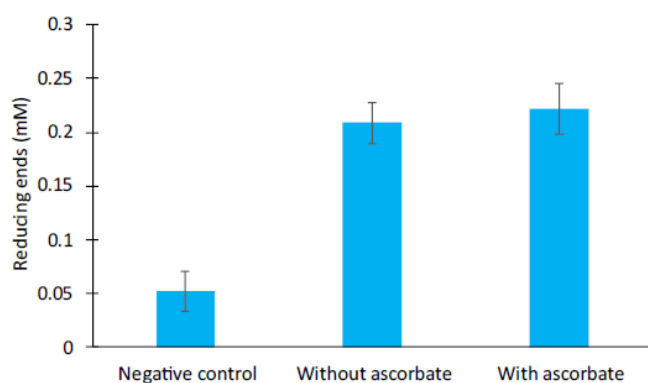
Figur 11. Enzymstabilitet over 48 timer i 12°C sjøvann. Hver søyle viser mengden reduserende ender som dannes ved å inkubere 3 μ M enzym med 20 mg/mL α -kitin i sjøvann i 1 time. Forsøkene er gjennomført med triplikater.



Figur 12. Resultater fra HPLC analyser av aktivitetsassay hvor kitinaser og Va-LPMO er inkubert med 20 g/L α -kitin i 20 mM Tris buffer pH 8.0. Forsøkene er gjennomført med triplikater. Mengden GlcNAc₂ (kitobiose) og GlcNAcGlcNAc1A (chitobionic acid) vises med hhv. blå og grønn farge.



Figur 13. Aktivitets assay med lakselus tilsatt VhChiA, SmChiC og Va-LPMO. Prøvene ble tatt etter hhv. 3 timer og overnatt inkubasjon. Resultatene er basert på duplicate reaksjoner. Tallene i parentes angir μM av enzyme som er tilsatt i reaksjonene.

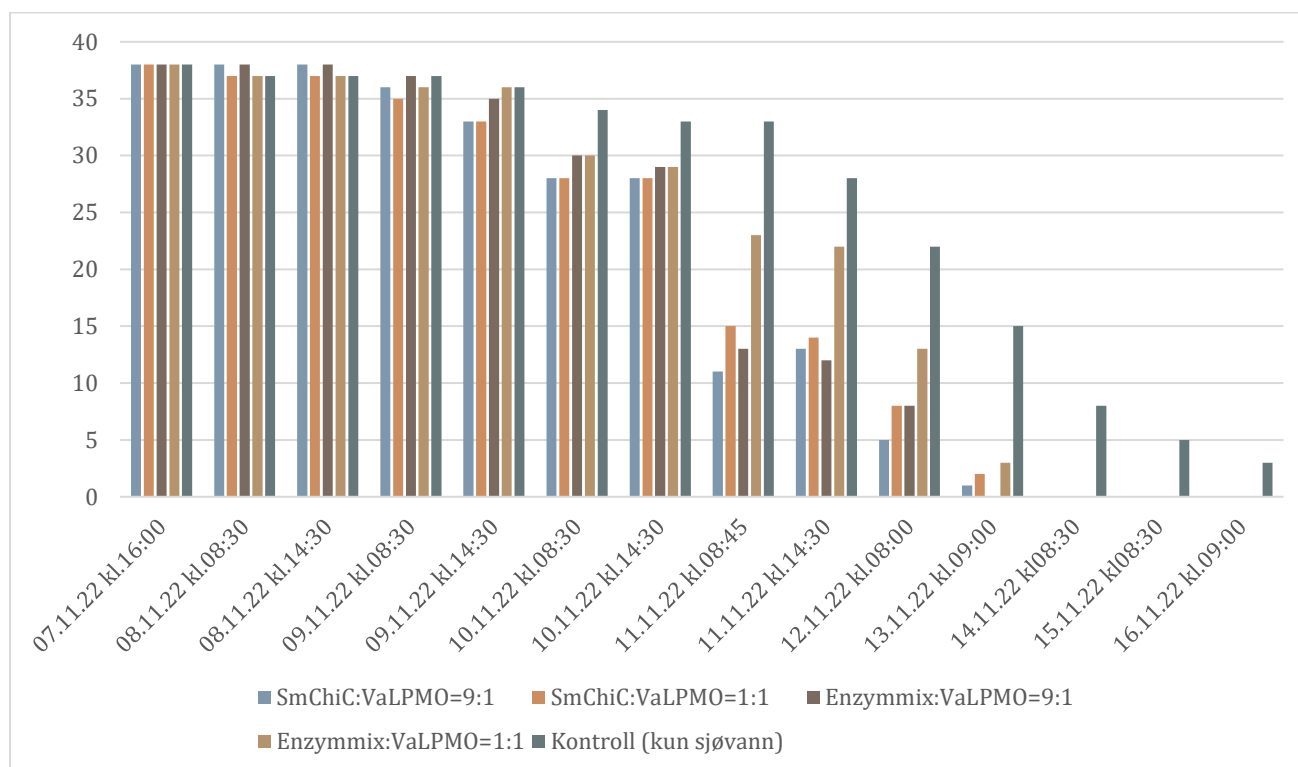


Figur 14. Aktivitets assay med lakselus tilsatt 1 μM VhChiA, 3 μM SmChiC og 1 μM Va-LPMO. Prøvene er analysert etter 3 timers inkubasjon ved 12°C og 700 rpm. Negativ kontrol inneholder kun sjøvann og lakselus. Resultatene er basert på triplikate reaksjoner.

In vitro forsøk på lakselus:

Eksponeringsforsøk 1 in vitro forsøk på lakselus: Finne beste enzymkombinasjon

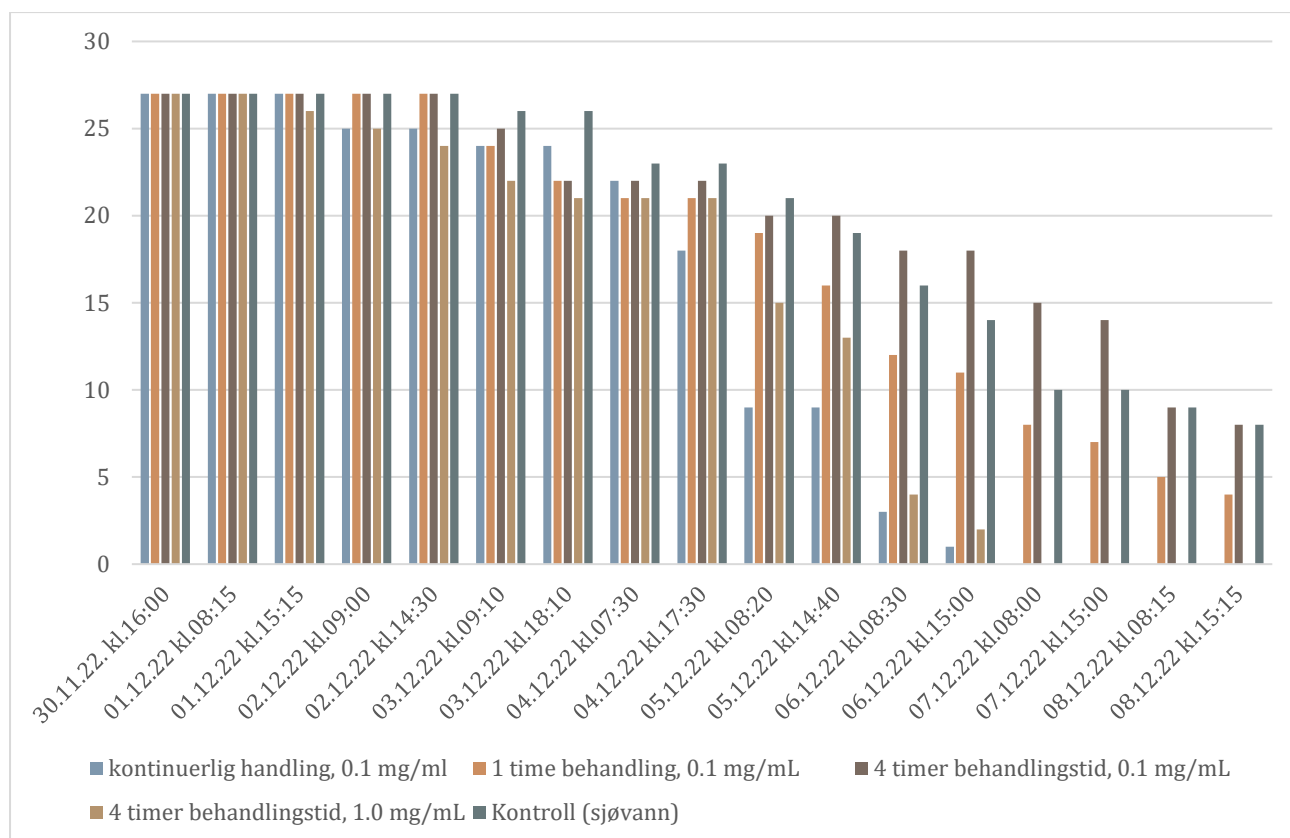
Resultatene fra eksperimenteringsforsøket vises i figur 15, hvor antall levende lakselus i hver av de fire ulike behandlingene og kontrollen er registret over tid. Det er naturlig at lakselus som fjernes fra verten sin etter hvert vil dø under laboratorieforhold, dette fordi de ikke lenger får næring fra verten og dermed sultet. Lakselus i kontrollen viser bedre overlevelse over tid sammenlignet med lakselus eksponert for de fire ulike behandlingene. Når det gjelder sammenligning mellom de fire ulike behandlingene, så er det ikke observert store forskjeller. Det er en tendens til at behandlingene med 9:1 forhold mellom kitinaser og LPMO er mer effektiv sammenlignet med 1:1 forhold. Vi ser ikke tydelige tegn til synergieffekter når vi kombinerer flere kitinaser sammenlignet med *SmChiC* alene.



Figur 15. Resultater fra eksperimenteringsforsøk med levende lakselus mellom 07.11.22 og 16.11.22. 38 lakselus i 5 begerglass ble eksponert for ulike behandlinger, hhv. **1)** 0,09 mg/mL *SmChiC* + 0,01 mg/mL *VaLPMO*; **2)** 0,05 mg/mL *SmChiC* + 0,05 mg/mL *VaLPMO*; **3)** 0,0225 mg/mL *SmChiC* + 0,0225 mg/mL *SmChiA* + 0,0225 mg/mL *VhChiA* + 0,0225 mg/mL *PcQAV* + 0,01 mg/mL *VaLPMO*; **4)** 0,0125 mg/mL *SmChiC* + 0,0125 mg/mL *SmChiA* + 0,0125 mg/mL *VhChiA* + 0,0125 mg/mL *PcQAV* + 0,05 mg/mL *VaLPMO* og **5)** Kontroll (kun sjøvann). Søylen viser nedgangen i antall levende lakselus over tid.

Eksponeringsforsøk 2 in vitro forsøk på lakselus: finne optimal behandlingstid

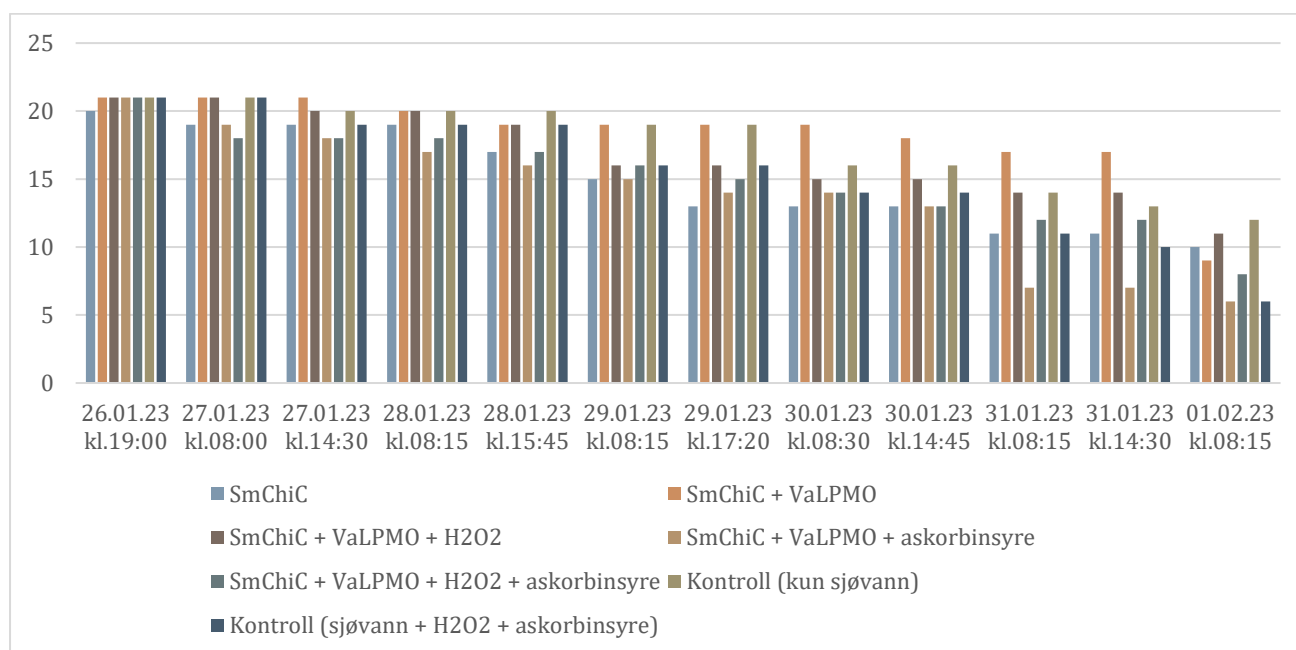
Resultatene fra eksperimenteringsforsøket vises i figur 16, hvor antall levende lakselus i hver av de fire ulike behandlingene og kontrollen er registrert over tid. Vi ser en effekt på dødeligheten til lakselus 1) ved kontinuerlig behandling med 0.1 mg/ml enzym og 2) ved 4 timers behandling med 1.0 mg/ml enzym. Behandling med 0.1 mg/ml enzym i 1 time og 4 timer er vanskeligere å trekke konklusjoner med fordi det ser ut til at 1 times behandling virker bedre enn fire timers behandling, noe som ikke forventes i et dose-respons forsøk. Her kan det være et problem at vi ikke har utført replikater av forsøkene.



Figur 16. Resultater fra eksperimenteringsforsøk av levende lakselus mellom 30.11.22 og 08.12.22. 27 lakselus ble fordelt i hvert begerglass og eksponert for 0,09 mg/mL *SmChiC* + 0,01 mg/mL *VaLPMO* hhv. kontinuerlig, i 1 time og 4 timer. I tillegg ble lusene i ett begerglass eksponert for 0,9 mg/mL *SmChiC* + 0,1 mg/mL *VaLPMO* i fire timer. Lusene i kontrollen ble ikke eksponert for enzymer. Søylene viser nedgangen i antall levende lakselus over tid.

Eksponeringsforsøk 3 in vitro forsøk på lakselus: Vurdering av nytteverdi av LPMO, samt optimalisering av enzymaktivitet.

Resultatene fra eksponeringsforsøket vises i figur 17, hvor antall levende lakselus i hver av de seks ulike behandlingene og kontrollen er registret over tid. Lakselusene ble eksponert for totalt 0.2 mg/ml kitinolytiske enzymer i 4 timer, og i tillegg ble H₂O₂ og eller askorbinsyre tilsatt for å undersøke om de kunne ha en *boosting* effekt på LPMO. Vi kunne imidlertid ikke se en tydelig forskjell i dødelighet mellom de behandlede lakselusene og kontrollene. Det ble også observert stor forskjell i dødelighet mellom de to kontrollene, noe som er vanskelig å forklare. Et problem kan være at vi startet med et lavere antall lakselus i dette forsøket (n=21) sammenlignet med eksponeringsforsøk 1 (n=38) og eksponeringsforsøk 2 (n=27), og at det dermed blir vanskeligere å observere effekter. Det største problemet er imidlertid at vi ser etter langsiktige effekter, men lakselus vil uansett naturlig dø under laboratorieforhold ettersom de er fjernet fra verten sin. Vi kan konkludere med at *in vitro* metoden rett og slett er bedre egnet til å observere akutt toksisitet enn langsiktige effekter.



Figur 17. Resultater fra eksponeringsforsøk av levende lakselus mellom 26.01.23 og 01.02.23. 21 lakselus ble fordelt i hvert begerglass og eksponert for 0,09 mg/mL SmChiC + 0,01 mg/mL VaLPMO. I tillegg ble lusene eksponert for 1 mM H₂O₂ og/eller 0.1 mM askorbinsyre. Lusene i kontrollen ble ikke eksponert for enzymer. Søylen viser nedgangen i antall levende lakselus over tid.

In vitro forsøk på krepsdyr:

Krepsdyrforsøkene viser at overlevelsen hos rekelarvene var høy (>90%) ved slutten av eksperimentet for alle behandlinger (tabell 1). I tillegg var det lav prosent svake larver (<3%) i alle behandlinger og ved alle prøvetakingstidspunkter (tabell 1). Alle larvene gjennomgikk første skallskifte (utvikling fra stadium I til stadium II) mellom dag 6 (da alle var i stadium I) og dag 12 (da alle var i stadium II). På dag 9 var det en blanding av stadium I og II ved alle behandlinger (tabell 1). På dag 9 var i gjennomsnitt 73% av larvene kommet til stadium II i kontrollkar og i behandling C (1 dag gamle rekelarver eksponert for 0.5 mg/L enzym i 1 time), mens tilsvarende 61% for behandling A og B (hhv. 1 og 6 dager gamle rekelarver eksponert for 10 mg/L enzym i 1 time). Konklusjonen er at det var liten til ingen forskjell i utvikling som kan knyttes til behandling med kitinolytiske enzymer.

Rekelarver fra alle behandlinger spiste *Artemia* i spisetesten (1-2 *Artemia* spist per rekelarve per time). Det kan se ut til at rekelarver eksponert for kitinolytiske enzymer (behandling A og B) hadde en litt høyere spiserate enn larver i kontrollgruppen og behandling C (tabell 1).

Rekelarver fra alle behandlinger svømte aktivt mot lys i svømmetesten (tabell 1).

Tabell 1. Oversikt over effekt på rekelarver etter å ha blitt eksponert for kitinolytiske enzymer.

	Kontroll	Behandling C	Behandling A	Behandling B
	Gjennomsnitt (standardavvik)			
Prosent overlevelse (dag 14)	95.7 (2.6)	90.4 (11.0)	94.3 (3.1)	96.1 (1.8)
Prosent svake larver (dag 14)	2.3 (2.0)	2.5 (2.1)	2.7 (3.6)	1.9 (2.8)
Prosent stadium II larver (dag 9)	72.9 (20.3)	72.8 (12.5)	60.5 (18.8)	61.9 (21.4)
Spiserate (antall <i>Artemia</i> spist pr. reke pr. time) (dag 14)	1.0 (0.1)	1.1 (0.5)	1.9 (0.6)	1.6 (0.4)
Svømmeaktivitet (gjennomsnitt lyspassering pr. time) (dag 14)	685 (335)	935 (778)	547 (117)	863 (673)

In vivo forsøk av lakselus på fisk:

Inndeling av fisk i behandlingsgruppe og kontrollgruppe:

Det er viktig at behandlingsgruppa og observasjonsgruppa er like. Da kan eventuelle effekter lettere knyttes til behandlingen alene. Vekt ble brukt som parameter for å at gruppene er like, med tanke på utvikling gjennom observasjonsperioden. I tabell 2 vises gjennomsnittlig vekt i de to gruppene ved de ulike datoene for måling.

Tabell 2: Oversikt over gjennomsnittsvekt (gram) for fisk i kontrollgruppa (n=22) og behandlingsgruppa (n=22).

	Oppstart 15.05.2023	Dagen før behandling 14.06.2023	Avslutning 29.06.2023
	Gjennomsnitt (standardavvik)		
Kontrollgruppe:	156.1 (16.9)	249.8 (29.7)	305.5 (40.9)
Behandlingsgruppe:	155.5 (14.8)	232.2 (26.5)	288.4 (38.8)

Lusedata:

Ved behandlingstidspunktet ble antall lus pr. fisk registrert. Laveste antall lus pr. fisk var 2, mens høyeste var 15. I gjennomsnitt var det 7,5 lus i kontrollgruppen, mens det var 7,55 lus i gjennomsnitt i behandlingsgruppen. Ved avslutning var det i kontrollgruppen gjennomsnittlig 5,68 lus i gjennomsnitt. I behandlingsgruppen var det ved avslutning gjennomsnittlig 5,58 lus. Se tabell 3 for endring i lusetall mellom de to gruppene. Resultatene viser at det er ingen forskjell i antall lus pr. fisk i behandlingsgruppen sammenlignet med kontrollgruppen i dette forsøket.

Tabell 3: Oversikt over antall lus i behandlingsgruppen (n=22) og kontrollgruppen (n=22) ved start av behandling og ved avslutning.

	Ved start av behandling:	Ved avslutning:	Endring:
Kontrollgruppe:			
Antall lus:	165	108	57
Gj.snitt antall lus pr fisk:	7.5	5.68	1.82
Behandlingsgruppe:	Ved start av behandling:	Ved avslutning:	Endring:
Antall lus:	166	106	60
Gj.snitt antall lus pr fisk:	7.55	5.58	1.97

Når det gjelder klekkesuksess fra 2. eggstrengpar ble resultatene som følger:

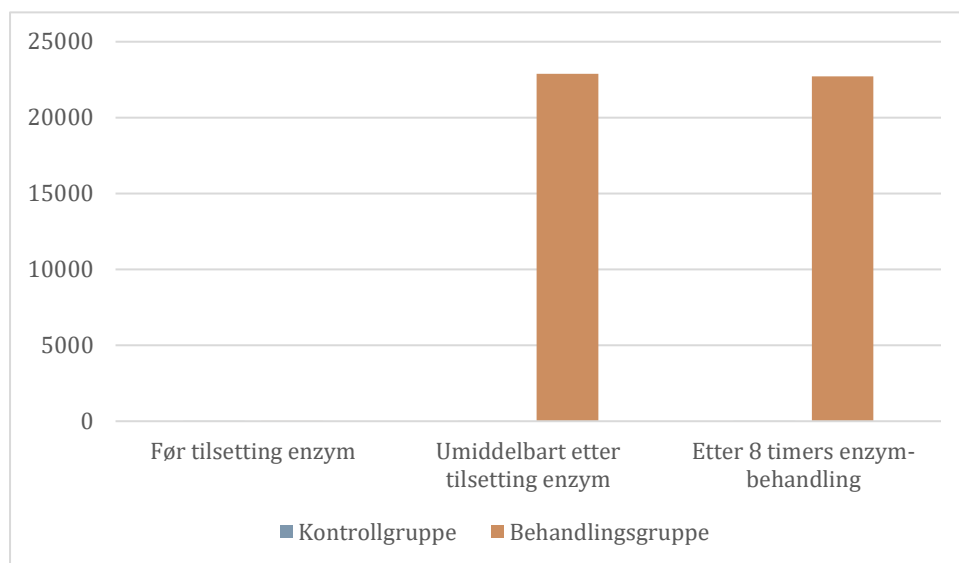
Kontrollgruppe: 880 copepoditter

Behandlingsgruppe: 752 copepoditter

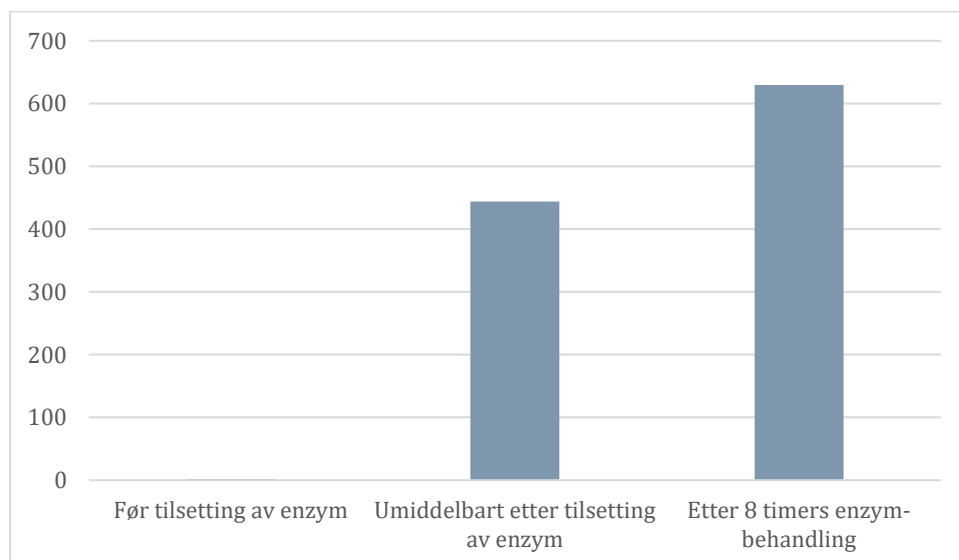
Totalt 9 strenger fra hver gruppe ble inkubert.

Analysen av vannprøver fra *in vivo* forsøk:

Resultatene fra vannprøver som ble tatt ut den 15.06.2023 1) før tilsetning av enzym, 2) direkte etter tilsetning av enzym og 3) ved endt 8 timers behandling, viser at enzymene var aktive både ved tilsetning av enzym og ved slutten av behandlingstiden (figur 18). Ved å fortynne vannprøvene var det også mulig å se en økning i enzymaktivitet i prøvene tatt ved endt behandling sammenlignet med umiddelbart etter tilsetning (figur 19), noe som kan tyde på at tilsetning av 0.1 mM askorbinsyre har hatt en liten *boosting*-effekt på enzymene.



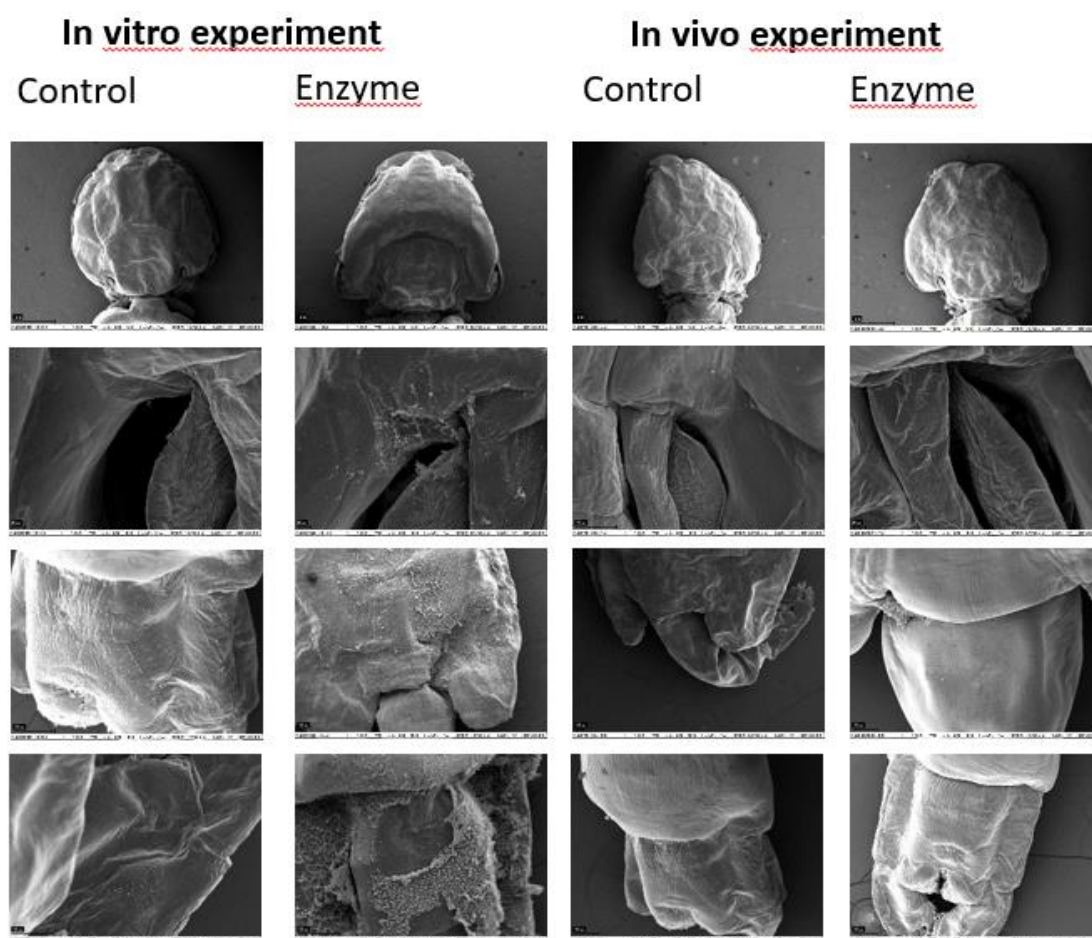
Figur 18. Enzymaktivitetsmålinger av vannprøver fra *in vivo* forsøket 1) før tilsetning av enzym, 2) umiddelbart etter tilsetning av enzym, og 3) ved endt 8 timers enzymbehandling. Aktivitet i vannprøvene ble testet med 100 μM 4MU-(NAG)₂ som substrat i reaksjonene ved 37°C i 10 minutter.



Figur 19. Enzymaktivitetsmålinger av 100xfortynnete vannprøver fra behandlingsgruppen 1) før tilsetning av enzym, 2) umiddelbart etter tilsetning av enzym, og 3) ved endt 8 timers enzymbehandling. Aktivitet i vannprøvene ble testet med 100 μM 4MU-(NAG)₂ som substrat i reaksjonene ved 37°C i 10 minutter.

Scanning Elektron Mikroskopi (SEM):

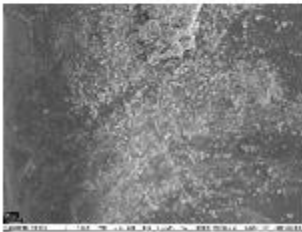
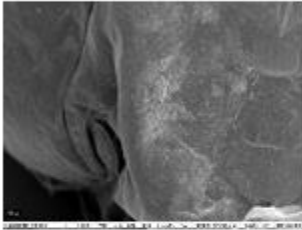
Resultater fra SEM er vist i figur 20, hvor bildene er tatt fra samme område av lakselusen for å kunne sammenligne behandlet lus med kontrollgruppa både i *in vitro* og *in vivo* forsøk. Det var ikke mulig å identifisere entydige skader eller endringer i skallet hos lakselus som var behandlet med kitinolytiske enzymer. Hos lakselus fra *in vitro* forsøket kunne vi observere et slags belegg (se figur 20 og 21) som kan være proteiner, for eksempel fra enzymer som er bundet fast til overflaten av lakselusen. Vi kunne imidlertid også se samme type belegg hos lakselus fra kontrollgruppen som ikke er tilsatt enzymer, men det var betydelig mindre av dette belegget der. Et tilsvarende belegg kunne ikke sees i det hele tatt hos lakselus fra *in vivo* forsøket (se figur 20). Figur 21 viser i tillegg enkeltskader som ble observert hos behandlede lakselus fra *in vitro* forsøket, men det var så få skader at dette kan være tilfeldigheter.



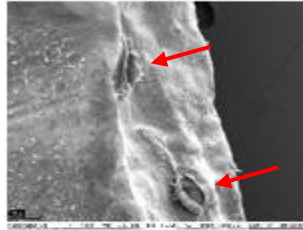
Figur 20. Scanning elektron mikroskopi av lakselus fra *in vitro* og *in vivo* forsøk. Bildene er tatt av samme område på lakselusen for å kunne sammenligne.

In vitro experiment

Control



Enzyme



Figur 21. Scanning elektron mikroskopi av lakselus fra *in vitro* forsøk. Bildene viser enkeltskader (markert med rød pil) observert hos lakselus behandlet med kitinolytiske enzymer. Til sammenligning er bilder fra kontrollgruppa også tatt med.

6. Hovedfunn

- SmChiC og VaLPMO ble valgt ut som de best egnede enzymkandidatene for marine forhold (pH 8, 0.6M NaCl og 12°C). Enzymproduksjon ble oppskalert til 30L fermentor med påfølgende frysetørking.
- Når lakselus inkuberes med kitinolytiske enzymer frigis kitooligosakkarider.
- *In vitro* forsøk hvor levende lakselus eksponeres for kitinolytiske enzymer viser en tendens til at lakselus dør raskere. Det er imidlertid viktig å merke seg at metoden er ikke godt egnet for å se på langtidsvirkninger av enzymene.
- *In vitro* forsøk på levende rekellarver viser at 10 mg/L kitinolytiske enzymer ikke påvirker overlevelse, utvikling, spiserate eller svømming hos rekellarvene.
- *In vivo* forsøk hvor lakselus på fisk ble eksponert for kitinolytiske enzymer viste ingen forskjell mellom kontroll- og behandlingsgruppa.

7. Leveranser

Detaljert oversikt over leveranser i prosjekt:

- **HL1:** Fagrapport med oversikt over aktuelle kitinolytiske enzymer for videre karakterisering. Ansvarlig institusjon: NMBU. *Fagrapport er sendt til FHF 03.01.2022*
- **HL2:** Fagrapport med resultater fra enzymkarakterisering, inklusive konklusjon enzymproduksjon. Ansvarlig institusjon: NMBU. *Fagrapport er sendt til FHF 02.07.2022*
- **HL3:** Leveranse av kitinolytiske enzymer til AP2 og AP3 Ansvarlig institusjon: NMBU. *Gjennomført som planlagt, juni 2023.*

- **HL4:** Fagrapport fra eksponeringsforsøk av lakselus på ulike utviklingsstadier. Ansvarlig institusjon: HVL. *Fagrapport er sendt til FHF 12.01.2023.*
- **HL5:** Søknad om fiskeforsøk til dyreforsøksnemda godkjent. Ansvarlig institusjon: HVL/Ilab *FOTS-søknad godkjent, mai 2023.*
- **HL6:** Fagrapport fra fiskeforsøk. Ansvarlig institusjon: HVL. *Fagrapport er sendt til FHF, 15.08.2023.*
- **HL7:** Søknad om krepsdyrforsøk til dyreforsøksnemda godkjent. Ansvarlig institusjon: HVL/NORCE. *FOTS-søknad godkjent, januar 2023.*
- **HL8:** Fagrapport om effekter på miljø, villfisk og krepsdyr. Ansvarlig institusjon: HVL. *Denne fagrapport ble erstattet med enzymaktivitetsassay av vannprøvene og scanning elektron mikroskopi (SEM) av lakselus fra fiskeforsøket fordi det var viktig å få mest mulig informasjon om hvorfor fiskeforsøket ikke viste forskjeller mellom behandlingsgruppa og kontrollgruppa.*
- **HL9:** Vitenskapelig publikasjon som sammenfatter oppnådde resultater. *Manuskript vil bli sendt inn så snart det er ferdigstilt.*