



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

**Studier av opptak av fiskepatogene bakterier i keratocytter fra laks og «Atlantic salmon kidney» (ASK) celler**

Christiane Lovise Elde

Masteroppgave i biologi (BIO-3950), desember 2023

## Forord

Først vil jeg takke min hovedveileder Roy Ambli Dalmo for at jeg fikk tildelt denne oppgaven. Takk for meget god veiledning, støtte og tålmodighet underveis. Jeg vil også takke mine biveiledere Dhivya Borra Thiyagarajan og Tore Seternes. Takk Dhivya, for all hjelp og engasjement undervis, spesielt i forbindelse med laboratoriearbeidet. Takk til Tore for din vennlighet og for å være svært behjelpelig. Vil også rette en takk til Bilal som har stilt opp når jeg har trengt, og vært til god hjelp med blant annet redigeringsprogrammet Fiji. Takk til Deanna Wolfson som har svart på spørsmål angående Nanolive, og Marie for å stille opp ved behov. Vil også rette en takk til alle i Nanofish gruppa.

Takk til min familie og venner for all støtte underveis. Spesielt stor takk til min gode og snille Pappa, Leif Bjørnar for at du alltid stiller opp. Vil også få takke min venninne Ingrid Svihus Knutsen for mange gode stunder underveis i masterstudiet. Takk til min lille pelsdott Milli som alltid får meg i godt humør. I tillegg vil jeg rette en stor takk til alle de gode folkene på Sør-Tromsøya sykehjem, som har vært en god avveksling i studietiden, og betydd mye.

Tromsø, 1. desember 2023

Christiane Lovise Elde

## Sammendrag

Hudsår har blitt mer utbredt i norsk lakseoppdrett de senere år, hvor årsakene kan være flere og sammensatte. Vintersår regnes som en av de største helseutfordringene, der klassiske vintersår knyttes til bakterien *Moritella viscosa*. Hudsår hos oppdrettsfisk kan også skyldes sammensatt infeksjon med flere bakterier hvor bakteriene *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* og *Aeromonas salmonicida*, som forårsaker hhv. sykdommene vibriose, kaldt vannsvibriose og furunkulose, ofte er påvist. God effekt av vaksinasjon har ført til at det i dag er svært få kliniske utbrudd av dem – selv om hudsår likevel er utbredt.

Huden hos fisk fungerer som fiskens første forsvarsbarriere, og har blant annet som oppgave å hindre inntrenging av patogener. Huden er bygd opp av flere lag, epidermis, dermis og hypodermis, hvor et slimlag dekker epidermis. Epidermis består av bevegelige celler kalt keratocytter, som utgjør en viktig rolle i fiskens sårhelingsprosess. Dersom fisken får skader i huden, kan keratocytter migrere raskt og gjenskape et beskyttende cellelag.

ASK (Atlantic Salmon Kidney)-celler er en epitel-cellelinje derivert fra nyrene til en voksen atlantisk hunnlaks. Denne cellelinjen ble også benyttet i studiene hvor opptak av bakterier skulle observeres. Siden ASK cellene, i likhet med keratocytter, er epitelceller – var det interessant å se om de hadde lik evne til opptak av bakterier.

I denne oppgaven ble det gjort forsøk ved å tilsette fluorescens merkede («Sytox green») og formalin inaktiverede *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* og *A. salmonicida* til keratocytter og ASK-celler. I tillegg ble det tilsatt levende bakterier av de tre førstnevnte fluorescens merket med «BactoView» til keratocytter. Prøvene ble studert i Nanolive (holotomografi), og på slutten av studiet ble også noen prøver undersøkt i fluorescens mikroskop med DV applikasjon. Målet med oppgaven var å undersøke om bakterier assosiert med hudsår hos fisk kan bli internalisert av keratocytter og ASK-celler. Resultatet av studiet indikerte at inaktiverede bakterier ble internaliserte i begge celletypene. For ASK-celler var det kun forsøket med eksponering med *V. anguillarum* som ble vellykket. Forsøket hvor levende bakterier tilsatt keratocytter kulturene, viste resultatene mulig internalisering, med unntak av *M. viscosa* som ikke ble tatt opp.

Ut fra forsøkene og analysene er det rimelig å anta at bakterier var blitt tatt opp av cellene, noe som også støttes av tidligere studier. Det er imidlertid vanskelig å fastslå opptak med sikkerhet basert på analyser og billedtakning i Nanolive, samt ved DV-mikroskopering.

## Abstract

Skin wounds have become more widespread among Norwegian farmed salmon the last decade. Winter ulcers is considered as one of the greatest health challenges, where classic winter ulcers are related to the bacterium *Moritella viscosa*. Skin wounds of farmed fish can also be due to co-infections by several types of bacteria, where mixed infection by *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* may be present. These bacteria are known to induce vibriosis, cold water vibriosis and furunculosis, respectively. Good effects of vaccination strategies have translated into only a few clinical outbreaks of these diseases annually – although skin wounds are widespread and is a huge problem.

The skin is the first defense barrier among fish, preventing invasion of pathogens. The skin is composed by several layers, epidermis, dermis and hypodermis, with an outermost layer of mucus covering epidermis. Much of the epidermis consists of motile cells named keratocytes, which play an important role during the wound healing process. In the case of skin wounds, the keratocytes are highly capable to migrate rapidly to recover a protecting layer of cells. ASK (Atlantic Salmon Kidney) cells are an epithelial cell line derived from the kidneys from an adult Atlantic female salmon. This cell line was also included in the studies of uptake of bacteria, as this is also epithelial cells type maybe capable to ingest bacteria.

In this master thesis, fluorescens labelling by use of “Sytox green” of formalin inactivated *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* and *A. salmonicida* was performed. The bacteria were given to keratocytes and ASK cells *in vitro*. In addition, live bacteria dyed with “BactoView” were also added to the keratocytes. The cells were studied in Nanolive (holotomography), whereas some samples were investigated in fluorescens microscope using DV application. The aim of the master thesis work was to examine whether bacteria, associated with skin wounds of fishes, can be internalized by keratocytes and ASK cells. The results of the study indicated that inactivated bacteria were internalized in both the cell types. For ASK cells, *V. anguillarum* were shown to be taken up. In the experiments with live bacteria, the results suggested uptake of *M. viscosa*.

Based on the experiments and analyses it is assumed that the keratocytes and ASK cells have the capability to ingest bacteria, in line with some previous studies.

# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Norsk oppdrettsnæring .....	1
1.2	Fiskehelseproblematikk .....	1
1.3	Hudsårproblematikk .....	2
1.3.1	Vintersår .....	3
1.3.2	Kaldtvannsvibriose.....	5
1.3.3	Vibriose .....	6
1.3.4	Furunkulose .....	7
1.3.5	Tenacibaculose .....	7
1.3.6	Lakselus og skader som følge av avlusning .....	8
1.3.7	Skottelus .....	8
1.4	Fiskens hud .....	9
1.4.1	Slimlaget.....	10
1.4.2	Epidermis .....	10
1.4.3	Dermis .....	10
1.4.4	Fiskeskjell.....	11
1.5	Keratocytter .....	11
1.6	Atlantic salmon kidney cells (ASK-celler).....	13
1.7	Billedbehandling.....	14
1.8	Formålet med masteroppgaven.....	15
2	Materialer og metoder .....	16
2.1	Materialer.....	16
2.2	Keratocytter .....	16
2.1.1	Forsøksfisk .....	16
2.1.2	HBSS-miks .....	16
2.1.3	Prøvetaking av fiskeskjell .....	17

2.3	ASK-celler .....	17
2.3.1	L15 media med 8% FBS .....	18
2.3.2	Dyrking av ASK-celler.....	18
2.3.3	Splitting av ASK-celler .....	18
2.4	Bakterier .....	18
2.4.1	Media til dyrking av bakterier .....	19
2.4.2	Dyrking og fiksering av bakterier .....	20
2.4.3	Fortynning av fikserte bakterier .....	21
2.4.4	Farging .....	22
2.4.5	Tilsetting av fikserte bakterier til cellene .....	23
2.4.6	Infisering av keratocytter med levende bakterier .....	24
2.4.7	Agglutinasjonstest .....	24
2.5	Mikroskopering .....	25
2.5.1	Nanolive 3D Cell Explorer-Fluo mikroskop.....	25
2.5.2	GE DeltaVision Elite mikroskop.....	26
2.5.3	Bildebehandling .....	26
3	Resultater.....	28
3.1	Eksponering av celler for fikserte bakterier.....	28
3.1.1	Keratocytter eksponert for fikserte bakterier .....	28
3.1.2	ASK (Atlantic salmon kidney)-celler eksponert for fikserte bakterier .....	35
3.2	Infisering av celler for levende bakterier.....	37
3.2.1	Keratocytter infisert med levende bakterier .....	37
3.3	Keratocytter inkubert med fikserte bakterier – undersøkt i DV-mikroskop.....	40
4	Diskusjon.....	42
4.1	Dyrking av celler .....	42
4.1.1	Keratocytter og holotomografi .....	42
4.1.2	ASK-celler.....	43

4.2	Farging.....	43
4.3	Opptak av bakterier i cellene studert ved holotomografi.....	44
4.3.1	<i>Vibrio anguillarum</i> .....	45
4.3.2	<i>Moritella viscosa</i> .....	45
4.3.3	<i>Vibrio salmonicida</i> .....	46
4.3.4	<i>Aeromonas salmonicida</i> .....	47
4.4	Betydningen av resultatet.....	47
4.5	Forslag til videre forskning.....	47
5	Konklusjon.....	49
6	Referanseliste.....	50
	Appendiks A.....	56



# 1 Innledning

## 1.1 Norsk oppdrettsnæring

Oppdrettsnæringen har vokst betydelig i Norge siden 1980-tallet, og blitt den nest største eksportnæringen. Norge er den største produsenten og eksportøren av atlantisk laks (*Salmo salar*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) på verdensbasis (Regjeringen, 2021). I 2022 ble det solgt laks for over 100,8 milliarder og regnbueørret for 5,1 milliarder (Fiskeridirektoratet, 2022). Andre fiskearter det drives oppdrett på i Norge er blant annet torsk, kveite og røye, samt rensefisk som rognkjeks (Fiskeridirektoratet, 2022).

Oppdrettsnæringen har blitt en viktig og lønnsom næring, som har bidratt til mange arbeidsplasser, spesielt langs kysten og i distriktene (Regjeringen, 2021). Den økte mengden oppdrett har derimot også medført flere utfordringer, hvor fiskehelseproblematikken i norsk oppdrett er belyst i kapittel 1.2.

## 1.2 Fiskehelseproblematikk

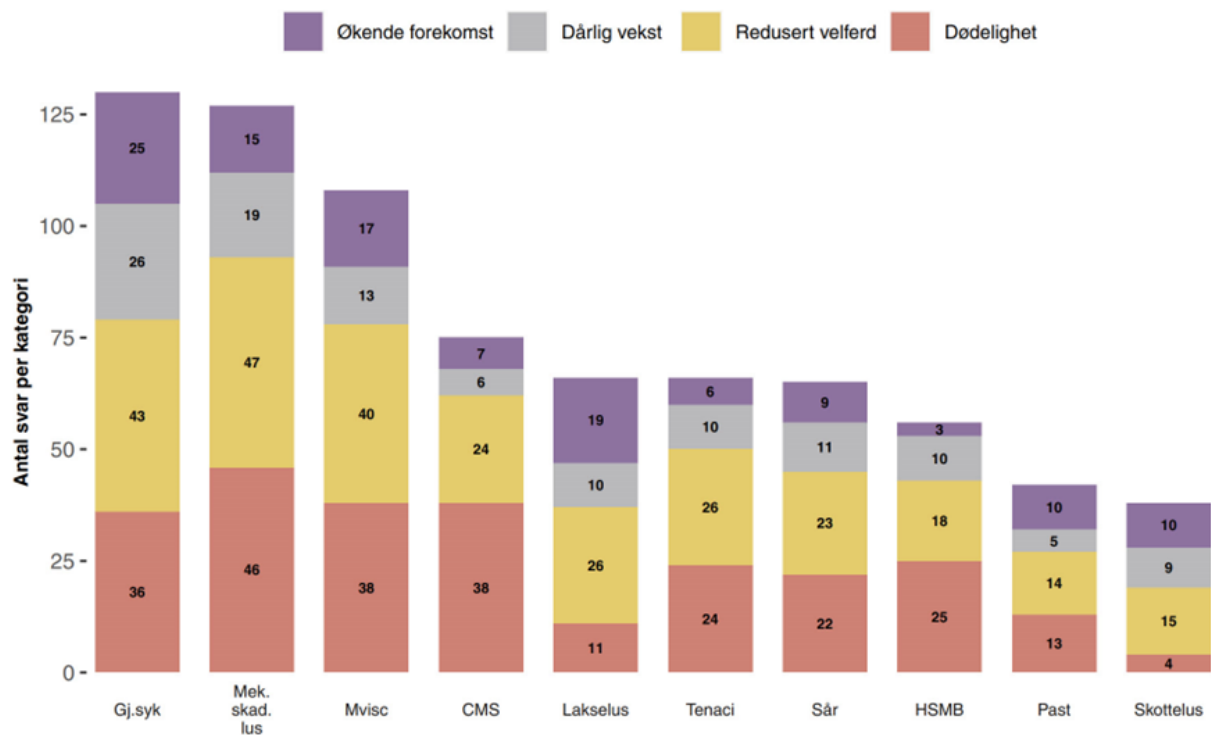
Sykdomsproblematikk er en stor utfordring i norsk oppdrettsnæring. Dette medfører ikke bare et stort fiskevelferdsmessig og miljømessig problem, men også store økonomiske kostnader. Kostnader knyttet til sykdom og behandling har doblet seg siden 2012, er i dag på nivå med førkostnadene (Sommerset et al., 2023).

I oppdrett er det høy konsentrasjon av biomasse av fisk innenfor et begrenset område, noe som gjør de mer utsatt for sykdommer (Afewerki et al., 2022). I tillegg er det stor dødelighet i oppdrettsnæringen, hvor trenden er økende. I 2022 døde hele 92,3 millioner laks og 5,6 millioner regnbueørret (Sommerset et al., 2023). Det inkluderte fisk i settefiskanlegg og i sjøfasen. Årsaken til dette kan være flere og sammensatte. Fiskehelse rapporten (2022) viser en oversikt over de ti største helseproblemene hos laks i matfiskanlegg (Figur 1).

Undersøkelsen er gjort av Mattilsynet og fiskehelsepersonell. Kompleks gjellesykdom, mekaniske skader i forbindelse med avlusning og vintersår er de tre største helseutfordringene for 2022. Andre vanlige helseproblemer er virussykdommene CMS (kardiomyopatisyndrom) og HSMB (hjerter- og skjelettmuskelbetennelse), bakteriesykdommene tenacibaculose og pasteurellose, samt parasittene lakselus og skottelus (Figur 1). Også sår av ukjent årsak er nevnt. De to siste årene har forekomsten av ILA (infeksiøs lakseanemi) hatt en nedgang, mens PD (pankreassykdom) har hatt en betydelig nedgang. Mens forekomsten av virussykdommer

er stabile, har bakteriesykdommer hatt en økende trend i løpet de siste årene (Sommerset et al., 2023).

Tidligere har antibiotika vært mye brukt for å bekjempe sykdomsproblemene knyttet til oppdrett. På 1980-tallet begynte vaksiner å utvikles, og bruken av antibiotika har avtatt drastisk siden. Rundt 1990 var bruken allerede redusert med 99% (Afewerki et al., 2022). Vaksinasjon er nå en av de viktigste tiltakene for å bekjempe sykdom i oppdrettsnæringen. Selv om vaksine ofte ikke gir full beskyttelse, kan de redusere sykdommens alvorlighetsgrad, kliniske tegn og dødelighet (Sommerset et al., 2023).

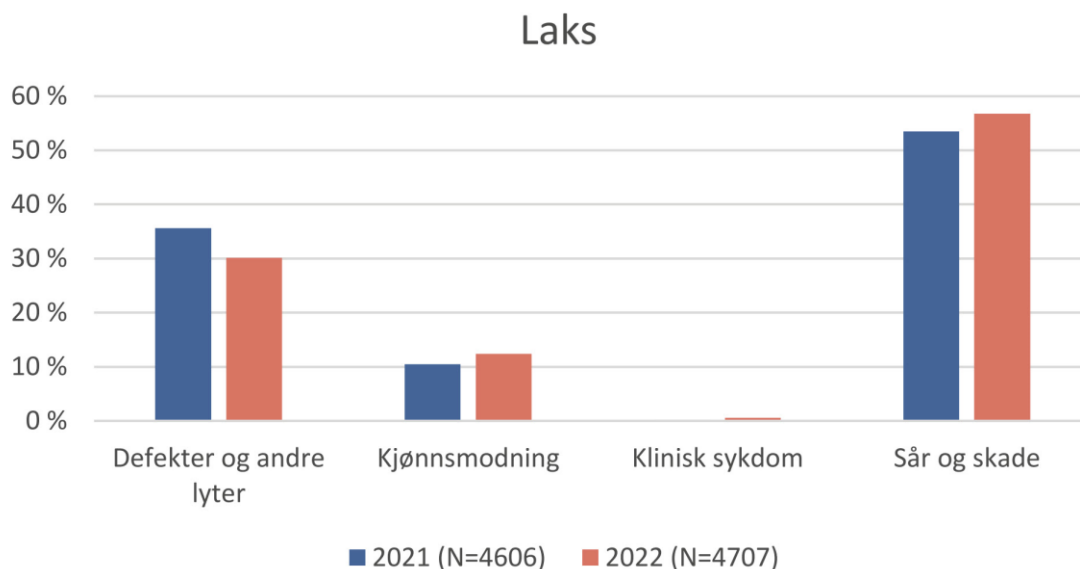


Figur 1: Histogrammet viser en oversikt over de viktigste helseproblemene hos laks i sjøfasen for 2022. Undersøkelsen er gjort av Mattilsynet og fiskehelsepersonell. De tre helseproblemene som tydelig skiller seg ut er gjellesykdom (Gj.syk), mekaniske skader forårsaket av avlusning (Mek.skad.lus) og vintersår forårsaket av *M. viscosa* (Mvisc). Andre helseproblemer er kardiomyopatisyndrom (CMS), infestasjon/beiteskader forårsaket av *Lakselus*, *Tenacibaculum* spp. (Tenaci), sår av ukjent årsak (sår), hjerte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), *Pasturella* sp (Past) og infestasjon/beiteskader som følge av *skottelus*. (Sommerset et al., 2023).

### 1.3 Hudsårproblematikk

Sårutvikling og sår hos fisk i oppdrett er et alvorlig velferdsproblem, og har blitt mer utbredt de senere år (Sommerset et al., 2023). Det medfører økt dødelighet, spesielt hos smolt som

nylig er sjøutsatt (Takle et al., 2015). I tillegg medfører hudsår hos fisk til at den nedklassifiseres ved slakting, noe som kan bidra til stort økonomisk tap (Sommerset et al., 2023). Ifølge rapporter er sår og skade den største årsaken til nedklassifisering av oppdrettslaks for 2021 og 2022 (Figur 2). Det kan være forskjellige årsaker til sår dannelse hos fisk i oppdrett, og er i mange tilfeller sammensatte (Takle et al., 2015). Det kan være på grunn av håndtering i forbindelse med arbeidsoperasjoner som ikke-medikamentelle avlusningsmetoder og/eller i kombinasjon med bakterielle sykdommer (vibriose, kaldtvannsvibriose eller furunkulose). I tillegg kan lakse- og skotteluspåslag forårsake erosjon av epidermis som igjen kan føre til hudsår (Sommerset et al., 2023), med lett inngang for patogener. Andre mulige årsaker som kan bidra til sår dannelse kan være knyttet til oppdrettsmiljøet. Ved lav sjøtemperatur er fisken mer utsatt for hudsår, i tillegg til at sårheling tar lengre tid (Takle et al., 2015).



Figur 2: Histogrammet viser hovedårsakene til nedklassifisering av laks, hvor sår og skader er den desidert største årsaken. Nedklassifisering av fisken fører til store økonomiske tap for produsentene (Sommerset et al., 2023).

### 1.3.1 Vintersår

Som nevnt, av bakterielle sykdommer utgjør vintersår muligens den største utfordringen knyttet til fiskevelferd i norsk oppdrett (Sommerset et al., 2023) – selv om vintersår først ble beskrevet på 1980-tallet (Lunder et al., 1995). Sykdommen kan forekomme langs hele norskekysten hos arter som laks og regnbueørret. I løpet av 2022 ble vintersår diagnostisert ved hele 433 oppdrettsanlegg (Sommerset et al., 2023). Siden sykdommen ikke er en listeført

sykdom og dermed ikke er meldepliktig, kan det være vanskelig å vite omfanget av problemet til enhver tid (Sommerset et al., 2023).

Utbrudd av vintersår forekommer ofte når sjøtemperaturen synker under 8-10°C (Karlsen et al., 2017) og er derfor mest utbredt fra sent høst til tidlig vår. Utbrudd kan likevel skje hele året, spesielt i den nordlige delen av Norge (Olsen et al., 2017). Det skiller ofte mellom klassiske og ikke-klassiske (atypiske) vintersår, hvor *Moritella viscosa* knyttes til klassiske vintersår. *M. viscosa* er en bevegelig gram negativ, psykrofil bakterie. Den er i tillegg flagellert og har en «curved rod» form (Bruno et al., 2013). Genetiske analyser viser at det finnes flere subpopulasjoner (klonalkompleks) av bakterien, hvor KK1 og KK3 oftest er knyttes til vintersår hos laks (Sommerset et al., 2023). Klassiske vintersår utvikles hovedsakelig på sidene til fisken, og er ofte runde/ovale i fasongen (Veterinærinstituttet, 2022) (Figur 3). Sårene kan variere i alvorlighetsgrad, fra små overfladiske til å være gjennomtrengende med eksponert muskel (Lunder et al., 1995). Fisken kan også få sepsis med blødninger, sirkulasjonssvikt i de indre organer og infeksjon i øyne (Veterinærinstituttet, u.å.). Problemer med osmoregulering kan oppstå, i tillegg til at fisken er mer utsatt for sekundære infeksjoner. (Bruno et al., 2013). Har fisken sår på grunn av andre årsaker (f.eks. ved håndtering), er den mer utsatt for å utvikle vintersår (Sommerset et al., 2023). Vintersår-bakterier kan smitte via vannet, fra fisk til fisk.

Selv om mesteparten av fisk i oppdrett er vaksinert mot infeksjon med *M. viscosa*, gir ikke vaksinen full beskyttelse (Veterinærinstituttet, u.å.). I mange tilfeller forårsakes vintersår av andre genotyper enn det som er i vaksinen, noe som kan ha en innvirkning på effektiviteten til vaksinene (Sommerset et al., 2023). Klassisk vintersår kan i alvorlige tilfeller behandles med antibiotika, men om det har en effekt er usikkert. For å forhindre framtidige utbrudd, er det viktig med god profylaktisk tilnærming, samt unngå sår dannelse pga. mekanisk slitasje av hud hos fisken (Veterinærinstituttet, u.å.). Forebyggende tiltak kan innebære å redusere belastningen av en ikke-medikamentell avlusning vinterstid, samt fjerne fisk med hudsår. I tillegg er kvaliteten på smolten viktig, og sjøsetting bør foregå på et tidspunkt hvor forholdene er best mulige (Sommerset et al., 2023). I de følgende kapitler er mulige årsaker til hudsår hos laks beskrevet, hvor noen av disse bakteriene er valgt ut for å studere opptak i keratocytter og i ASK-celler.



Figur 3: Bildene viser vintersår hos oppdrettslaks forårsaket av *M. viscosa*, A) sår dannelse på sidene til fisken, B) blødning i buken (Bruno et al., 2013).

### 1.3.2 Kaldtvannsvibriose

*Vibrio salmonicida* forårsaker sykdommen kaldtvannsvibriose, tidligere kalt hitrasyke (Veterinærinstituttet, u.å.). *V. salmonicida* er en motil, gram negativ, moderat halofil og psykrofil bakterie. Den har en buet eller rett form og kan ha opptil 9 flageller (Bruno et al., 2013). Sykdommen ble først oppdaget i Norge i 1977 (Bruno et al., 2013), og sykdommen var den mest forekommende hos laks på 1980-tallet. Etter utvikling av effektiv vaksine har antall tilfeller av sykdommen gradvis avtatt. I løpet av de siste årene har det vært svært få tilfeller av kaldtvannsvibriose (Johansen et al., 2012). Det er hovedsakelig stor fisk opp mot slakting som har uttalt kaldtvannsvibriose. Muligens kan det skyldes lang tid siden vaksinerings, noe som kan medføre lavere spesifikk immunitet.

Kaldtvannsvibriose rammer hovedsakelig laks, men blir smittepresset stort kan også torsk og regnbueørret smittes av bakterien og gi sykdom. Utbrudd forekommer oftest i vintermånedene

ved lav sjøtemperatur (Bruno et al., 2013). I mange tilfeller har sykdommen en subakutt utvikling, hvor første tegn kan være dårlig matlyst og at fisken svimer. Dødeligheten er ofte lav i starten av et utbrudd og øker gjerne gradvis (Veterinærinstituttet, u.å.). Symptomer på sykdommen er blødninger i huden, spesielt ved finnene og på buken. Det kan oppstå blødninger i fettvevet og svømmeblæra, samt dannelse av en blodfarget væske i bukshulen (ascites). I tillegg kan fisken få lys lever og bleke gjeller, pga. blodmangel. Syk fisk med kaldtvannsvibriose kan bli behandlet med antibiotika, men bakterien kan lett utvikle resistens. Nødslakt vurderes når det gjelder stor fisk (Veterinærinstituttet, u.å.).

### 1.3.3 Vibriose

*Vibrio anguillarum* er også kjent som *Listonella anguillarum* (Frans et al., 2011), og er en bakterie som er vanlig å finne i sjøvann og brakkvann (Veterinærinstituttet, 2022). *V. anguillarum* er en gram negativ, halofil, bevegelig bakterie med flagell. Den har en svak buet form og har en bipolar farging (Bruno et al., 2013). Den kan forårsake den alvorlige sykdommen vibriose hos mange ulike fiskearter i oppdrett- og også hos villfisk. Den kan i tillegg infisere krepsdyr og muslinger (Frans et al., 2011). Oppdrettet laks, regnbueørret, torsk og rognkjeks er arter som kan rammes, samt villfisk som sei. I norsk oppdrett er mesteparten av fisken vaksinert mot sykdommen, hvor vaksinasjon viser en god effekt (Veterinærinstituttet, 2022). I 2022 ble vibriose påvist på tre lokaliteter med laks, mens det ble påvist på en lokalitet med regnbueørret (Sommerset et al., 2023).

Ytre kliniske tegn på sykdommen vibriose er røde flekker på fiskens ventrale og laterale områder, sår hud, sløvhet og vekttap. Øynene kan også infiseres, noe som resulterer i opasitet og videre sår dannelse samt utstående øyne (eksoftalmus). Tarmene kan fylles med en viskøs og klar væske. I akutte tilfeller kan fisken dø raskt uten å vise noen kliniske symptomer. (Frans et al., 2011).

Fisk infiseres med *V. anguillarum* hovedsakelig gjennom huden, men forskning viser at infeksjon også kan skje ved oralt opptak (Grisez et al., 1996). Fisk som har skader i hud eller slimlag er mer disponert for infeksjon, siden bakteriene lettere kan nå subdermis. Andre faktorer som kan påvirke infeksjon med *V. anguillarum* er stress, temperatur, høy tetthet av fisk og tilstedeværelsen av andre patogener. Også forurensning og vannkvalitet kan ha en innvirkning (Frans et al., 2011). Utbrudd av vibriose forekommer hovedsakelig om sommeren, når vanntemperaturen overstiger 10°C (Bruno et al., 2013).

### 1.3.4 Furunkulose

Bakterien *Aeromonas salmonicida* er det eldste kjente fiskepatogenet og finnes i store deler av verden, både i ferskvann og marine miljøet (Menanteau-Ledouble et al., 2016). *A. salmonicida* kan forårsake sykdommen furunkulose hos laksefisk, men også hos andre marine arter som rognkjeks og piggvar. *A. salmonicida* er en gram negativ, fakultativ anaerob bakterie som ikke er bevegelig (Bruno et al., 2013). Dens patogenitet avhenger av bakteriens ytre overflatelag. Dette består hovedsakelig av protein A, som er en kompleks proteinstruktur (Bruno et al., 2013). I 2022 ble sykdommen (Klassisk F.) påvist i to oppdrettsanlegg i Nord-Trøndelag, hos laks på 4-5 kg. Det ble i tillegg påvist furunkulose hos rognkjeks på et av anleggene (Sommerset et al., 2023). Vaksinasjon mot sykdommen viser en god effekt siden det er få utbrudd av sykdommen.

Det skilles ofte mellom klassisk og atypisk furunkulose. Klassisk furunkulose er infeksjon forårsaket med bakterien *A. salmonicida*, mens atypisk skyldes infeksjon med subarter av *A. salmonicida*. I tillegg til *salmonicida*, er det beskrevet underartene *masoucida*, *smithia*, *achromogenes* og *pectinolytica* (Sommerset et al., 2023).

Furunkulose hos laksefisk kan deles inn i perakutt, akutt og kronisk. I tillegg kan latente infeksjoner forekomme (Veterinærinstituttet, 2023). Perakutte infeksjoner er mest utbredt hos yngre fisk, og det er knyttet få kliniske tegn. Mørkere hud, oppblåst abdomen og eksoftalmus (utstående øyne) kan forekomme (Menanteau-Ledouble et al., 2016). Ved akutt form kan fisken bli avmagret, samt vise de tidligere nevnte kliniske tegnene. Ytre- og indre blødninger, samt en forstørret milt kan i tillegg forekomme. Ved kroniske infeksjoner av furunkulose oppstår det ofte “furunkler” og blødninger langs fordøyelseskanalen og i hud (Cipriano & Austin, 2011; Roberts, 2012). Smitte av sykdommen skjer vanligvis fra fisk til fisk (Veterinærinstituttet, 2023). Sykdommen er listeført i Norge (kategori F), og det skal ved mistanke eller forekomst av furunkulose meldes ifra til Mattilsynet. Atypisk furunkulose er ikke meldepliktig (Veterinærinstituttet, 2023).

### 1.3.5 Tenacibaculose

I tillegg til de nevnte bakteriene er også *Tenacibaculum* spp. assosiert til utvikling av hudsår. Tenacibaculose regnes som ikke-klassiske vintersår. Den blir ansett som en av de største helseproblemene for norsk oppdrettslaks (Tabell 1) (Sommerset et al., 2023), og forekommer hovedsakelig ved kaldere temperaturer. *Tenacibaculum* spp. er en gruppe bakterier som finnes i sjøen naturlig, og som dermed kan infisere fisk i sjøfasen. Sykdommen assosieres ved

utvikling av alvorlige lesjoner i hudoverflaten, i form av sår, erodert munn, nekrose, samt «frynsete» finner og hale. Nekrose på øyne og gjeller kan også oppstå ved enkelte tilfeller (Avendaño-Herrera et al., 2006). Fisk som har en svekket hudbarriere, er mer utsatt for infeksjon. Det finnes i dag ingen vaksine mot tenacibaculose, og sykdommen er ikke-listeført. (Veterinærinstituttet u.å.).

### **1.3.6 Lakselus og skader som følge av avlusning**

Siden oppdrettslaks tilbringer mesteparten av tiden i sjøen, er den også utsatt for parasitter som lakselus og skottelus. Lakselus er et parasittisk krepsdyr som infiserer laksefisk. Livssyklusen består av åtte livsstadier, hvor det er i de siste mobile faser at den kan gjøre størst skade. Lakselusa livnærer seg av slimet, huden og blodet til fisken. Store mengder lakselus kan føre til erosjon av epidermis som forårsaker sår. Det kan også føre til anemi, immunsuppresjon, problemer med osmoregulering, kronisk stress og sekundære infeksjoner (Overton et al., 2019; Sommerset et al., 2023). Et strengt regelverk er utarbeidet for å bedre fiskevelferden for oppdrettsfisk. Overskrider antall lakselus grensene for hva som er tillatt, er oppdretterne pålagt å gjennomføre avlusning. På grunn av økt resistens av medikamentelle legemidler, har bruken av ikke-medikamentelle avlusningsmetoder økt. Dette har bidratt til en stor velferdsutfordring (Sommerset et al., 2023). Felles for de ikke-medikamentelle avlusningsmetodene, er at de alle innebærer mye håndtering av fisken. Først må fisken trenes, før den videre blir pumpet inn i et avlusningssystem. Dette resulterer i at fisken blir stresset og kan få mekaniske skader og sår på for eksempel hud, gjeller, finner eller øyne, og i tillegg miste mye fiskeskjell (som gir mikrosår) (Overton et al., 2019). Laks som er svekket på forhånd er spesielt utsatt for skade under slike avlusningsoperasjoner. Skadene kan bli så store at de i verste fall dør. Ikke-medikamentell mekanisk avlusning innbefatter bruk av børsting og/eller spyling, og det fins ulike typer teknologisk tilnærming: SkaMik (spyling og børsting), og Hydrolicer (spyling med turbulens) (Overton et al., 2019).

### **1.3.7 Skottelus**

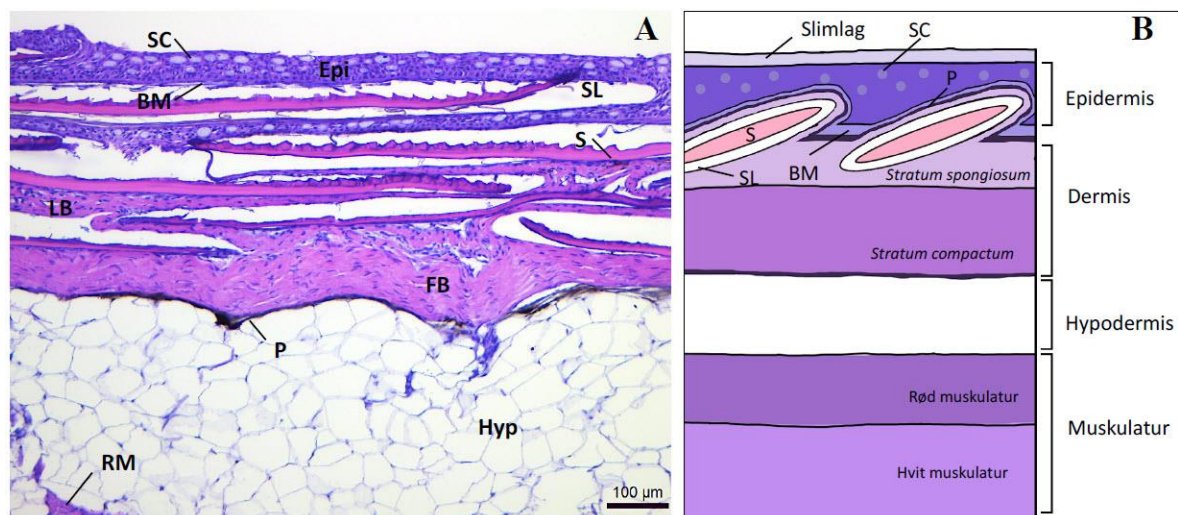
Skottelus (*Caligus elongatus*) er i likhet med lakselus et parasittisk krepsdyr, og tilhører også samme familie. Den kan sette seg på mange marine fiskearter, inkludert arter innenfor laksefisk, flyndrefisk og torskefisk, i tillegg til arter som rognkjeks og sild (Sommerset et al., 2023). Den har en livssyklus med 8 stadier, hvor de adulte stadiene er svært bevegelige, noe som gjør de i stand til å bytte vert. Oppdrettsfisk kan smittes via annen fisk i merden eller fra villfisk. Skottelus kan forårsake skader på fiskens hud, men gir som oftest ikke like store



skader som lakselus (Sommerset et al., 2023). I noen tilfeller har det blitt iverksatt behandlinger mot skottelus på grunn av store forekomster, men er derimot ikke vanlig. Ved avlusninger mot lakselus, reduseres også mengden skottelus. Ifølge Sommerset et al. (2023) antas det at skottelus i oppdrett har blitt et økende problem de siste årene, spesielt i nordlige områder.

## 1.4 Fiskens hud

Huden til fisken fungerer som en beskyttende barriere mellom det indre- og ytre miljø. Den har som oppgave å hindre lekkasje av vann, næringsstoffer og oppløste stoffer, samt hindre inntrenging av patogener (Esteban, 2012). Huden kan også ha en viktig funksjon i forhold til bevegelse, sensorisk persepsjon, respirasjon, termisk regulering og kommunikasjon. Siden det akvatiske miljøet kan inneholde mye patogener (Magnadottir et al., 2010), er fiskens hud dermed svært viktig som første forsvarsbarriere, og fungerer både som en fysisk og kjemisk beskyttelse (Takle et al., 2015). Hudsykdommer er mer vanlig hos fisk sammenlignet med terrestriske vertebrater, siden de lever i direkte kontakt med miljøet (Groff, 2001). Fiskens hud er bygd opp av flere lag, epidermis, dermis og hypodermis, hvor et slimlag dekker epidermis (Figur 4). I motsetning til pattedyr, består det ytterste laget hos fisk av levende celler (Kryvi & Poppe, 2016).



Figur 4: A) Bildet viser oppbygningen av huden til atlantisk laks (*S. salar*), som består av epidermis, dermis og hypodermis (Epi: epidermis og SC: slimceller). Epidermis skilles fra dermis av en basalmembran (BM). Dermis består av løst bindevev (LB), fast bindevev (FB), skjell (S) og skjellommer (SL). Et pigmentlag (P) ligger mellom dermis og hypodermis (Hyp). Rød muskulatur (RM) ligger under hypodermis. B) Viser en illustrasjon av de ulike hudlagene (Møllerstuen, 2020).

### **1.4.1 Slimlaget**

Slimet hos fisk utgjør den første forsvarsbarrieren mot sykdomsfremkallende organismer. Den gjør også huden mindre permeabel, og har blant annet betydning for fiskens osmoregulering. Slimets bestanddeler kan inaktivere patogener før den kommer i kontakt med fiskens epitel (Rottmann et al., 1992). Det beskytter også fisken mot skader (Kryvi & Poppe, 2016). Dersom fisken får mekaniske skader kan slimlaget (og epidermis) ødelegges, noe som kan resultere i redusert beskyttelse. Slimlaget hos fisk kan bestå av antistoffer (IgM), glykoproteiner, sialinsyre, i tillegg til enzymer som lysozym og proteaser (Kryvi & Poppe, 2016).

### **1.4.2 Epidermis**

Epidermis er det ytterste laget i huden, og er vanligvis tynnere enn subdermis. Tykkelsen på epidermis er ulik på fiskens kropp, i tillegg vil det avhenge av reproduksjonssyklus og art. Hos flere fiskearter, f.eks. laksefisk, er epidermis tykkere i områder hvor skjell mangler, som ved finnene og hodet (Elliot, 2011).

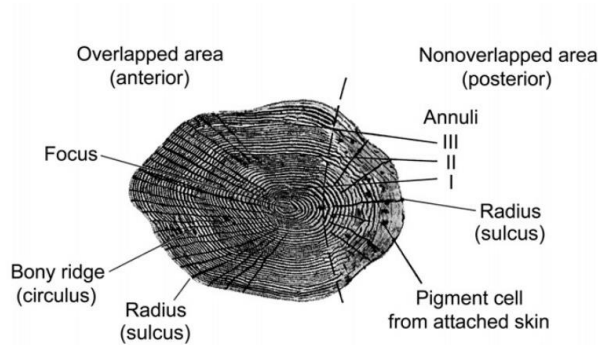
Epidermis hos fisk består av tre lag: stratum superficiale, stratum spinosum og stratum basale. Stratum superficiale er det ytterste laget og består av mucusceller og kubiske epitelceller. Desmosomer binder sammen de kubiske epitelcellene (Brown & Wellings, 1970). De inneholder intermediære filamenter, som danner cytoskjelettet. Stratum spinosum som er det neste laget, består hovedsakelig av mucusceller, klubbceller, nerveceller, ionocytter, samt udifferensierte celler. Mellom epidermis og dermis ligger stratum basale som er en basalmembran bestående av et lag med basalceller. Epidermis har noen bevegelige celler som kalles keratocytter (Takle et al., 2015). Dersom fisken får skader i huden, kan keratocytter migrere raskt og regenerere huden med beskyttende cellelag.

### **1.4.3 Dermis**

Under epidermis ligger dermis, som er fiskens underhud (Figur 4). Tykkelsen av dermis varierer på fiskens kropp i tillegg til at det vil være forskjeller innenfor artene. Hos de fleste fiskearter inndeles dermis i to lag, stratum spongiosum og stratum compactum (Elliot, 2011). Stratum spongiosum er det øverste laget og består av bindevevsceller, skjell, pigmentceller (kromatoforer), blodkar, nerver og collagenfibre. Det nederste laget av dermis, stratum compactum, er mer kompakt og omfatter lag med collagenfibre. Siden collagenfibre ligger skrått, bidrar dette til fleksibilitet, elastisitet og strekkstyrke. Under dermis ligger hypodermis, som består av fettceller og løst bindevev (Kryvi & Poppe, 2016).

#### 1.4.4 Fiskeskjell

Fiskeskjell har en beskyttende funksjon for fiskens underhud. De ligger skrått i dermis, og består av lamellært benvev som dekkes av epidermis. Det finnes ulike typer fiskeskjell. Laksefisk har sykloide skjell, som kjennetegnes ved en oval form og circuli (Figur 5). Hos for eksempel laks er fiskeskjellene blank, noe som skyldes krystaller med guanin (Kryvi & Poppe, 2016). Dersom fisken mister fiskeskjell forårsaket av f.eks. en mekanisk skade, vil det dannes nye skjell.



Figur 5: Illustrasjon av et sykloid fiskeskjell hos en beinfisk (Elliot, 2011)

#### 1.5 Keratocytter

Keratocytter er bevegelige epidermale celler som utgjør en viktig rolle i fiskens sårhelingsprosess (Sveen et al., 2019). Dersom fisken får skader i huden kan keratocytter migrere fra sårkantene, inn i såret og dekke såret med et nytt lag epitel (Bullock et al., 1978; Okimura et al., 2018). Dette kan dannes i løpet av timer etter sårdannelsen (Bullock et al., 1978), avhengig av ulike faktorer som temperatur, sårdimensjon, stress og tilgang til næring (Jensen et al., 2015). Hver keratocyt består av en spindelformet cellekropp og en frontal halvmåneformet lamellipodium (Keren et al., 2008) (Figur 6). Lamellipodium er viktig for cellens mobilitet og består av et nettverk med tynne aktinfilamenter. Cellekroppen er sammensatt av tykke fibre av actomyosin (stressfibre) (Okimura et al., 2018). Rotasjon av stressfibrene fungerer som et «hjul» for migrasjonen av keratocytter. Keratocytter er svært mobile celler, hvor deres hastighet er blitt målt til omkring 10  $\mu\text{m}/\text{min}$ . (Okimura et al., 2018). Til sammenligning målte Åsbakk & Dalmo (1998) en hastighet til 30-40  $\mu\text{m}/\text{min}$ . hos «malpighian» celler, senere omtalt som keratocytter. Keratocytene kan bevege seg kollektivt eller uavhengige av hverandre (Rapanan et al., 2015).

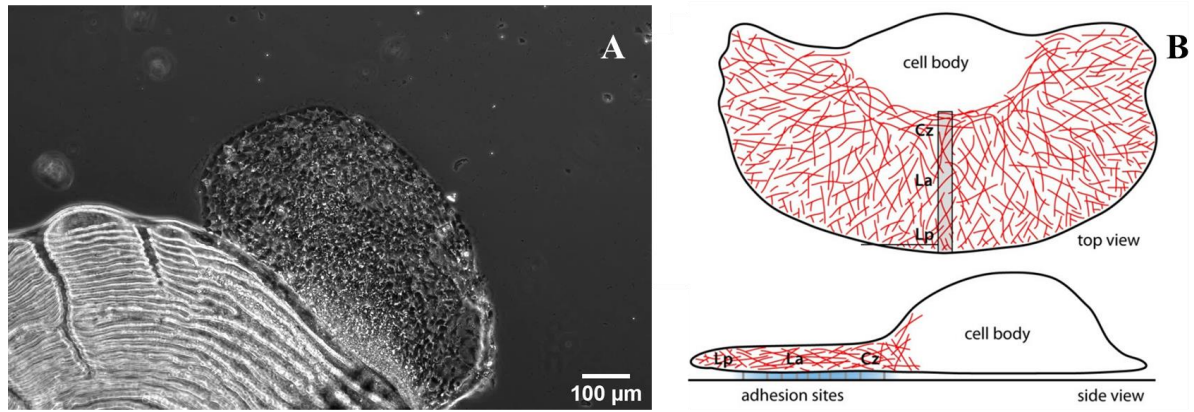
Keratocytter kan muligens kommunisere med hverandre ved bruk av såkalte «tunnelling nanotube» (TNT), i likhet med mange andre celletyper (Okimura et al., 2018). Dette er dynamiske tunnellingende strukturer mellom cellene (Dupont et al., 2018). TNT kan ha en størrelse på 50-200 nm i diameter, mens lengden kan tilsvare flere celledengder.

Cellekomponenter som mitokondrier og vesikler har tidligere blitt funnet i TNT, og transport av disse har i tillegg blitt påvist. Det samme gjelder også for bakterier og virus (Omsland et al., 2017). Det har imidlertid ikke blitt observert transport gjennom TNT hos keratocytter i fisk. Kjølstad & Svartaas (2020) observerte i sitt mastergradarbeid mitokondrier i TNT hos keratocytter *in vitro*. De observerte ingen utveksling, men de antyder at det likevel ikke kan utelukkes.

Hos atlantisk laks har tidligere studier vist at keratocytter kan være fagocytiske. Åsbakk & Dalmo (1998) demonstrerte gjennom forsøk at latekspartikler ble internalisert. Imidlertid så det ut til at keratocytene var delvis spesifikke i hva de tar opp, ettersom gjærceller ikke ble tatt opp. Forsøk av Åsbakk (2001) viste at «malpighian» celler hos atlantisk laks også tok opp bakterier, bl.a. *Aeromonas salmonicida*, men ikke *Streptococcus intermedius*. Dermed ser det ut til at keratocytene kan være spesifikke når det gjelder opptak av bakterier.

Forsøk utført av Karlsen et al. (2012) på overflater uten fiskeskjell hos atlantisk laks (*Salmo salar*) som ble eksponert for *M. viscosa*, viste at keratocyttenes evne til å ta opp denne bakterien syntes å være ineffektiv. Det medførte at evnen til re-epitaliseringen av overflatesår ble nedsatt, og dermed også evnen til sårheling.

Svendsen & Bøgwald (1997) gjorde forsøk med atlantisk laks infisert med bakteriene *V. anguillarum* og *A. salmonicida*, kombinert med fjerning av slimlaget og påføring av sår. Fjerning av slimlaget viste en forhøyet mortalitet med *V. anguillarum*, mens det med *A. salmonicida* ble en forhøyet mortalitet i kombinasjon med dype sår. Det viser kanskje at keratocyttenes og slimlaget har en betydelig infeksjonshemmende funksjon.



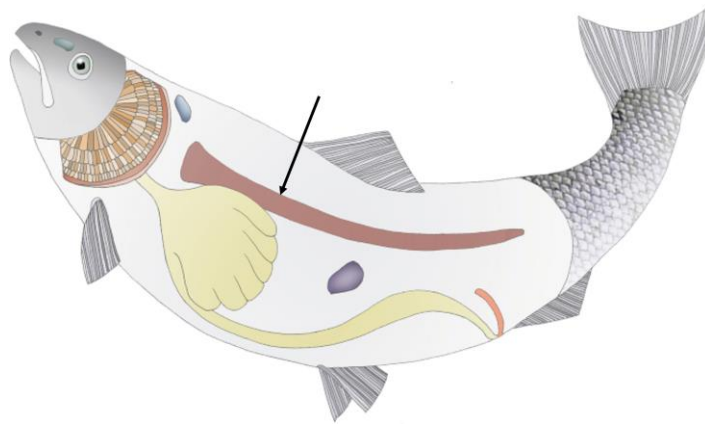
Figur 6: A) Bildet viser keratocytter som migrerer ut fra et fiskeskjellet in vitro (Chakraborty et al., 2022). B) Illustrasjon av en keratocyt fra fisk, hvor en tydelig ser dens frontale halvmåneformede lamellipodium. Illustrasjonen nederst viser et tverrsnitt gjennom keratocytten, der selve cellekroppen har en forhøyning (Huber, 2012).

## 1.6 Atlantic salmon kidney cells (ASK-celler)

ASK (Atlantic Salmon Kidney)-celler ble også brukt i dette studiet, og er en epitel-cellelinje derivert fra nyrene til en voksen atlantisk hunnlaks. De ble første gang isolert av Rolland et al. (1998), og brukes i forskning (ATCC, 2023).

Nyrene hos fisk er et langstrakt, mørkt organ som ligger dorsalt for bukhulen (Kryvi & Poppe, 2016) (Figur 7). I motsetning til pattedyr, mangler fisk benmarg og lymfeknuter. Derfor utgjør nyrene det viktigste immunorganet hos fisk, sammen med thymus, milt og slimhinne-assosiert lymfevev (Press & Evensen, 1999).

Nyren kan deles inn i en hematopoetisk (bloddannende), en ekskretorisk (urinutskillende) og en endokrin (hormonproduserende) del (Kryvi & Poppe, 2016). Fra hvilke nyreepitelceller ASK cellelinjen er frembrakt fra er ukjent.



Figur 7: Illustrasjon av nyrene til laks (pil) (Bjørngen & Koppang, 2022).

## 1.7 Billedbehandling

De fleste cellene mangler kontraster, noe som skyldes at de er relativt transparente og i tillegg har et høyt vanninnhold, hvilket gjør at vanlig lysmikroskop ikke er særlig egnet for studie av disse. Høyoppløselig avbildning av levende celler, samt fikserte og levende bakterier, krever at riktig type mikroskop og teknikk brukes. Det kan være avgjørende for å bestemme om bakteriene som ble observert var intracellulære i keratocytter og ASK-celler. I dette studiet ble det anvendt mikroskop med et høyoppløselig, «label-free» avbildningssystem som tar holotomografiske (HT) bilder. Kontrastene ble forsterket ved å bruke fluorescerende farger som binder seg til bakterienes DNA (se kap.2.4.4).

Ved hjelp av en laserstråle ble det samlet inn kvantitativ 3D informasjon av cellene.

Holotomografi (HT) anvender to teknikker, holografi og tomografi. Holografi omhandler generering av 3D avbildning (Ambs et al., 2005), og tomografi avbildning av seksjoner («slices») ved bruk av en penetrerende kilde (Cho, 2003). I dette studiet ble en laserstråle brukt i forbindelse med mikroskopering (se kap. 2.5.1).

HT-bildene som ble tatt i dette studiet gjenspeiler lysbrytningen i ulike medier, dvs. refraktiv indeks (RI), hvilket er en optisk parameter som endrer seg med tettheten. Endringen skjer på overgangen mellom to medier med ulik tetthet, og RI bestemmes av hvor mye lyset brytes. Ettersom cellens organeller har ulik tetthet, kan de identifiseres ved hjelp av denne teknologien (Liu et al., 2016).

Ved fotografering i forbindelse med mikroskopering er lyset viktig for å få bilder med god oppløsning, men det kan samtidig føre til fototoksitet, dvs. skader på levende celler. Det kan dermed være utfordrende å unngå skader på cellene på grunn av lysbestrålingen særlig når god bildekvalitet ønskes. Ultrafiolett lys med kortere bølgelengde kan være spesielt skadelig. Det samme gjelder når lys eksiteres, ettersom det dannes skadelige frie radikaler som kan føre til skade på cellene (Tosheva et al., 2020). Flere faktorer påvirker effekten av disse, bl.a. lysstyrken og eksponeringstiden, noe som vil være viktig å ta hensyn til ved bildeinnsamlingen. Effekten av fototoksitet kan ikke fjernes, men ulike tiltak kan gjøres for å begrense den (Laissue et al., 2017). Et viktig tiltak vil være å redusere lysstyrken og heller øke eksponeringstiden for å ivareta god bildekvalitet, til tross for at det kan gå på bekostning av oppløsningen. Siden keratocytter er migrerende vil lang eksponeringstid gi et utydelig bilde. Et annet tiltak er å endre til svakere hvitt lys som er mindre skadelig for cellene, særlig når bildeinnsamling ikke foregår.

Problemer ved avbildning av levende celler kan også forekomme ved fotobleking. Det skjer ved at fluorescensfargen blir «bleket» på grunn av lyspåvirkning. Ved sterk lysintensitet, f.eks. ved bruk av laserstråler, skjer bleking raskere, noe som vil variere med ulike fluoroforer (Hoebe et al., 2007). Også autofluorescens (naturlig fluorescens) kan påvirke avbildningen, noe som skyldes emisjon av spesifikke lysbølger fra cellens organeller eller strukturer i cellen (Fred, 2017). Dette er et fenomen som kan forekomme når cellen eksponeres for ulike bølgelengder, f.eks. i forbindelse med mikroskopering. Autofluorescens kan noen ganger forveksles med spesifikk fluorescens.

## **1.8 Formålet med masteroppgaven**

Formålet med masteroppgaven var å undersøke hvordan keratocytter og ASK-celler fra laks håndterer bakterier assosiert ved hudsårproblematikk *in vitro* (i dyrkningsskåler på lab). I dette prosjektet ønsket jeg finne ut om disse cellene var i stand til å ta opp fiskepatogene bakterier.

Cellene benyttet til forsøkene ble dyrket og videre tilsatt inaktiverte bakterier av typen *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* og *A. salmonicida*. I tillegg ble keratocytter forsøkt eksponert for levende bakterier - *V. anguillarum*, *M. viscosa* og *V. salmonicida*. Protokoller var stort sett etablerte ved NFH. Ved bruk av avanserte mikroskopiske metoder ble opptak av bakterier i cellene studert, samt dokumentert i form av billedtaking.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

Kjemikalier som er brukt under laboratoriearbeidet er listet opp i Appendiks A, mens utstyr omtales i hvert delkapittel.

### 2.2 Keratocytter

#### 2.1.1 Forsøksfisk

Fisken som ble benyttet til forsøkene kom fra Havbruksstasjon i Tromsø som ligger i Kårvika (Figur 8) Som oftest ble det hentet to fisk av gangen, hvor flesteparten hadde en vekt på 0,5-2 kg. Fisken oppholdt seg i kar med sjøvann, og var dermed ferdig smoltifisert. Ved bruk av en aluminiumshåv med nett av tau/tråd ble fisken tatt ut av karene. Håven hadde på forhånd blitt desinfisert med «Virkon». Fisken ble avlivet ved slag mot hodet, dette ved bruk av en trekubbe. Det ble så tatt lengde og vekt av fisken, før den ble lagt i en isoporeske med is og videre transportert til NFH. Kjøreturen tok ca. 40 minutter.



Figur 8: Bilde av en forsøksfisk (*Salmo s.*) hentet fra havbruksstasjon i Kårvika.

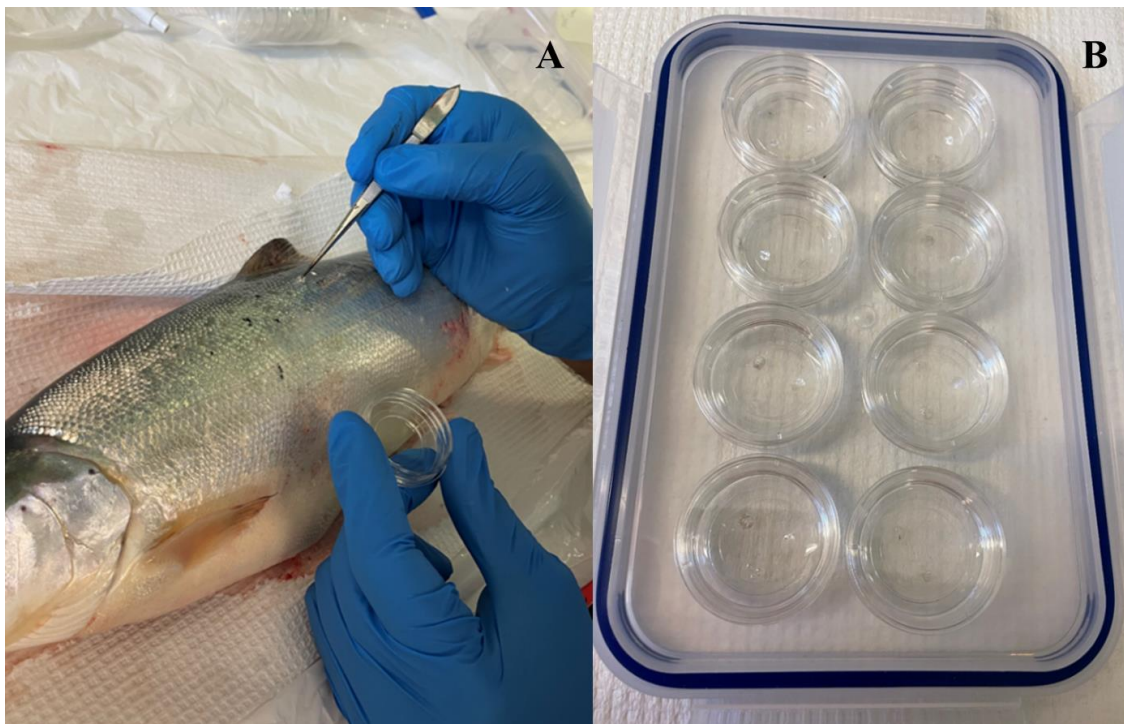
#### 2.1.2 HBSS-miks

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)-miks ble brukt som media til dyrking av keratocytter fra fiskeskjell. HBSS-miks er et sterilt medium som inneholder antibiotika: Penicillin, streptomycin og amphotericin. Dette for å forhindre vekst av mikroorganismer i prøvene. I en liter HBSS-miks var det tilsatt 10 ml av en alikvot som inneholder 100 µg/ml streptomycin og 10 ml av en alikvot med 100 IU/ml penicillin, samt 4 ml alikvot av 1 µg/ml Amphotericin B. Media var fordelt i 50 ml Falcon rør og oppbevart i fryseren (-20°C), og tint i kjøleskapet før bruk.



### 2.1.3 Prøvetaking av fiskeskjell

Fiskeskjell ble tatt fra sidene til fisken. Ved bruk av en desinfisert pinsett ble fiskeskjell nappet ut og videre lagt i en petriskål med glassbunn (Figur 9). Det ble lagt tre fiskeskjell i hver petriskål, og det ble ofte laget mellom 10-20 skåler. HBSS-miks (2 ml) ble tilsatt etter ca. 10 minutter, slik at fiskeskjellene skulle få tid til å feste seg ordentlig til underlaget. Deretter ble petriskålene med fiskeskjell lagt i desinfiserte plastbokser. Boksene ble så plassert i kjøleskap (4°C) og/eller inkubasjonsskap (12°C), avhengig av hvor raskt prøvene skulle brukes. Prøvene ble sjekket omtrent daglig, og media ble byttet dersom det var mye døde celler. Media ble ofte byttet dagen etter at platene ble laget, og deretter gikk det som oftest to-tre dager mellom mediabytte.



Figur 9: A) Bildet viser prøvetaking av fiskeskjell, mens B) viser ferdige prøver i petriskåler med glassbunn. Hver prøve består av tre fiskeskjell og 2 ml HBSS-miks.

### 2.3 ASK-celler

ASK-celler er en cellelinje fra atlantisk laks. ASK-cellene ble gitt av forskningsgruppen fiskeimmunologi og vaksineutvikling ved NFH. ASK-cellene var opprinnelig fryst og lagret i en nitrogendunk med en temperatur på om lag -196°C inntil cellene ble tint og klare for første kultivering. Dyrking og splitting av ASK-celler foregikk på cellelaben i «laminar air flow»

(LAF) kabinett under sterile forhold. De var adherente, og festet seg til celledyrkningbrønner (plast) eller på dekkglass plassert i brønnene.

### **2.3.1 L15 media med 8% FBS**

ASK-celler ble dyrket i Leibovitz's L15 (L15) medium tilsatt 8% «Fetal Bovine Serum» (FBS). L15 medium inneholder galaktose, fenolrødt, L-glutamin og natriumpyruvat. Siden L15 media ikke inneholder proteiner, lipider eller vekstfaktorer ble FBS tilsatt (ThermoFisher). L15 media uten fenolrødt ble oftest brukt ved mikroskopering.

### **2.3.2 Dyrking av ASK-celler**

ASK-cellene i cryorør ble tint med bruk av hendene. L15 medium med 8% FBS (6 ml) ble først tilsatt en liten celleflaske. Deretter ble ASK-celler (1 ml) tilsatt celleflasken ( $10^6$  celler pr/ml), og flasken ble rystet forsiktig. Prøven ble plassert i inkubatoren ( $20^{\circ}\text{C}$ ). L15 medium ble byttet dagen etter siden det var en del døde celler, noe som var forventet. Prøven ble sjekket omtrent daglig, og cellene var klar til splitting etter 6 dager.

### **2.3.3 Splitting av ASK-celler**

Splitting av ASK-celler ble utført når cellene var ca. 90% konfluente. Det gamle L15 mediet ble først fjernet fra celleflaska. Deretter ble 10 ml PBS tilsatt for vask av cellene, og flaska ble forsiktig rystet. PBS ble så fjernet fra flasken, hvorefter 2,5 ml trypsin (sluttkonsentrasjon var 0.1%) ble tilsatt flasken for at cellene skulle løsne fra underlaget. Cellene ble trypsinbehandlet i ca. 2-3 minutter. I mellomtiden ble prøven studert i mikroskop, for å sjekke om cellene hadde løsnet fra underlaget. Deretter ble en del av celleduspensjonen overført til en tom celleflaske sammen med L15 media. Som oftest ble det laget en 1:3 fortyning. Det ble laget ASK-celler med fortyning 1:2 til petriskåler med glassbunn som skulle benyttes til forsøkene. Celleflaska og petriskålene ble deretter satt i inkubatoren ( $20^{\circ}\text{C}$ ).

## **2.4 Bakterier**

Bakterieisolater av *V. anguillarum*, *A. salmonicida* og *M. viscosa* var fra Tore Seternes ved NFH, mens *V. salmonicida* var en gave fra Nofima. I dette arbeidet ble de to sistnevnte dyrket og formalinfikserte (se kap.2.4.2), før tilsetning til cellekulturene. De formalinfikserte bakteriene ble oppbevart i fryseren ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), mens alikvoter av levende bakterier ble lagret ved  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4.1 Media til dyrking av bakterier

Til dyrking av bakterier ble det benyttet ulike typer vekstmedier. Først et agarbasert vekstmedium (blodagar 2% NaCl) som var produsert av Veterinærinstituttet, så et flytende vekstmedium laget ved NFH. «Marine broth» og FMAP media ble laget i forbindelse med dette studiet, mens «Tryptic Soy Broth» (TSB)- og «Mueller Hinton» (MH)-media var laget på forhånd og klar til bruk. Tabell 1 viser sammensetning av mediene som ble brukt (pr. liter). Siden «Marine broth» og FMAP media fulgte samme fremgangsmåte under tillaging, blir kun «Marine broth» beskrevet her. Mediene ble oppbevart på kjølelab (4°C).

Til 1 liter «Marine broth» media ble det benyttet 37,4 g «Marine broth» og 1 liter Milli-Q vann, som nevnt i Tabell 1. I en steril flaske med magnet, ble «Marine broth» løst i Milli-Q vann ved en omrøring (300 rpm) og en temperatur på 100°C. Etter noen minutter var pulveret løst opp, og flasken ble så autoklavert i 1,5 time ved 121°C. I autoklaven ble korken satt løst på for å forhindre en trykkøkning. I tillegg ble det satt en flaske med vann med tilsvarende vekt som balanse, og hvor en temperatursensor ble satt oppi. Det ble benyttet program P05 på autoklaven. Media ble deretter plassert på kjølelaben (4°C).

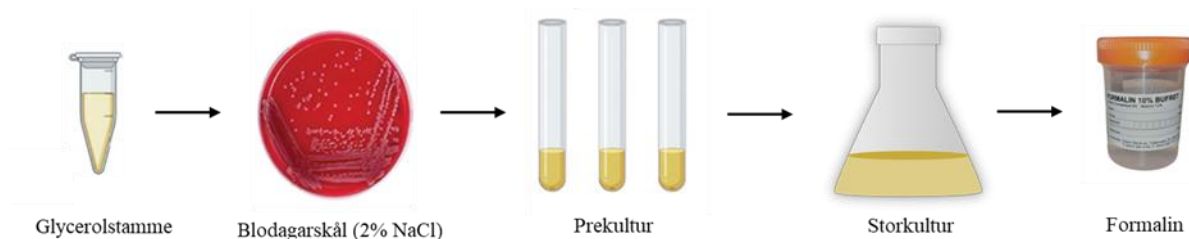
Tabell 1: Oversikt over sammensetningen (pr. liter) av de ulike mediene som ble brukt til dyrking av bakteriene (Blodagar 2% NaCl, «Marine broth», FMAP, «Tryptic Soy Broth» (TSB) og «Mueller Hinton» (MH)).

Agarbasert vekstmedium	Sammensetning (pr. liter)
Blodagar 2% NaCl	40 g blodagar base nr 2 15 g NaCl 1 liter destillert vann 40 ml konsentrat av røde blodceller fra mennesker/sau
Flytende media	Sammensetning (pr. liter)
Marine broth	37,4 g Marine broth 1 liter Milli-Q vann
FMAP	5 g trypton 15 g Marine broth 700 ml Milli-Q vann 300 ml sjøvann
MH (Mueller Hinton)	21 g Mueller Hinton Broth-Difco 1 liter Milli-Q vann

TSB (Tryptic Soy Broth)	1 liter destillert vann 17 g trypton 3 g soytone 2,5 g glukose 5 g natriumklorid 2,5 g dikaliumfosfat
-------------------------	--

## 2.4.2 Dyrking og fiksering av bakterier

Dyrking og fiksering av bakterier foregikk på bakterielaben under LAF-benken ved sterile forhold. De ulike stegene er illustrert i Figur 10, og beskrevet i de neste underkapitlene.



Figur 10: Illustrasjon som viser de ulike stegene under vekst og fiksering av bakterier. Bakterier (glycerolstamme) ble strøket på en blodagarskål (2% NaCl) for videre å lage en prekultur og storkultur, samt tilsetning av formalin (Zhu et al., 2021; Chemi-Teknik, u.å.).

### 2.4.2.1 Vekst av bakterier på blodagarskål (2% NaCl)

Glycerolstammer ble hentet fra biofryseren og tint. Ved bruk av en steril «loope» ble det hentet ut bakterier og strøket på en blodagarskål (2% NaCl). Platene ble plassert i inkubator (12°C) (Tabell 2). Etter en uke ble kolonier overført til en ny blodagarskål.

### 2.4.2.2 Vekst av bakterier i flytende kultur

**Prekultur:** Prekultur ble laget ved å tilsette noen kolonier av bakterien fra blodagarskålene ved bruk av «loope», til 3 ml av et flytende medium. Hvilket medium som ble brukt var avhengig av type bakterie (Tabell 2). Prekulturen ble plassert på en «shaker» i 1-3 dager, med en speed på 200 rpm og en temperatur på 12°C. Bakteriene var klar til videre dyrking når OD ble målt til minst 0,6.

**Storkultur:** Prekulturen ble deretter tilsatt en større kultur med medium (100-200 ml).

Medium i den «store» kulturen var av samme type som i prekulturen (Tabell 2). Kulturen ble

satt på shakeren ved en temperatur på 12°C og med et spinn på 200 rpm inntil OD verdi på mellom 0,6-1.

### 2.4.2.3 Fiksering av bakteriene

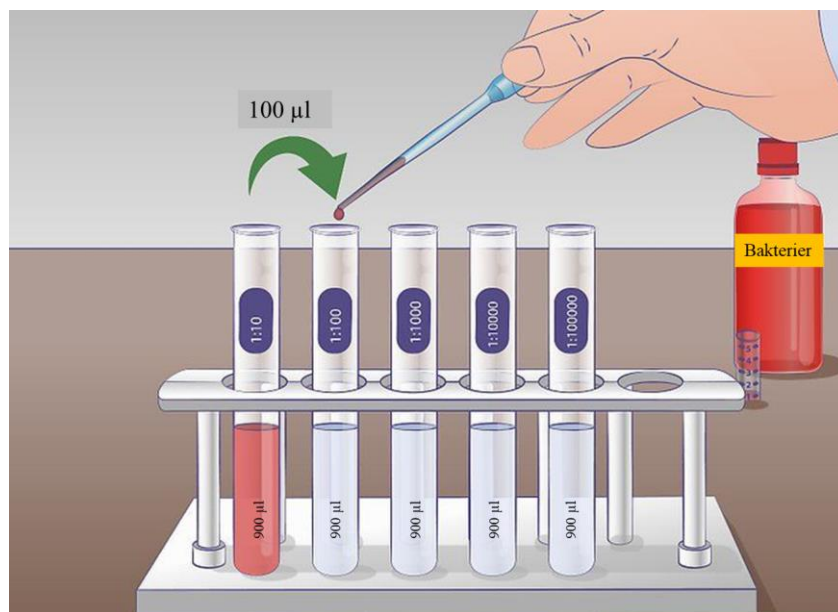
Bakteriekulturene ble formalininaktiverte (4% sluttkonsentrasjon av formalin). Kulturene med formalin ble plassert på rysting over natta ved en lav hastighet (ca. 100 rpm), og en temperatur på 12°C. Den formalinaktiverte bakteriekulturen ble så sentrifugert i 30 minutter ved 800 x g. Prøven ble vasket to ganger med 0,9% NaCl og ble videre alikvotert og fryst ned.

Tabell 2: Viser en oversikt over medier brukt til dyrking og fiksering av bakterier.

Bakterie	Sykdom	Agarplate	Flytende medium	Temperatur
<i>Vibrio anguillarum</i>	Vibriose	Blodagar 2% NaCl	MH	12°C
<i>Vibrio salmonicida</i>	Kaldtvannsvibriose	Blodagar 2% NaCl	FMAP	12°C
<i>Moritella viscosa</i>	Vintersår	Blodagar 2% NaCl	Marine broth	12°C
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Furunkulose	Blodagar 2 % NaCl	TSB	12°C

### 2.4.3 Fortynning av fikserte bakterier

For alle fikserte bakterier ble det utført seriefortynninger (Figur 11). Formålet var å finne en passende mengde med bakterier å tilsette cellene. Først ble det tilsatt 900 µl fortynningsvæske (PBS) i hvert Eppendorf rør. Så ble 100 µl fra bakterieprøven tilsatt prøve 1, som nå hadde en fortynning på  $10^{-1}$ . Deretter ble det tatt 100 µl fra prøve 1 og tilsatt prøve 2 ( $10^{-2}$ ), og videre til høyere fortynninger. Basert på en visuell sjekk i mikroskop, ble det gjort en vurdering av hvilken fortynning som skulle tilsettes cellene (Tabell 3).



Figur 11: Illustrasjon av seriefortynning med bakterier. Hver Eppendorf tube ble først tilsatt 900 µl fortynningsvæske (PBS), før 100 µl fra bakterieprøven ble tilsatt prøve 1, som nå hadde en fortynning på  $10^{-1}$ . 100 µl fra prøve nr.1 ble tilsatt prøve nr.2, som fikk en fortynning på  $10^{-2}$ . Fortynningen fortsatte til prøve nr.8 ( $10^{-8}$ ). Kilde: Wikipedia (Hentet den 25.09.23).

Tabell 3: Oversikt over fortynninger for de ulike fikserte bakteriene som ble tilsatt cellene.

Bakterie	Fortynning
<i>Vibrio anguillarum</i>	$10^{-2}$
<i>Vibrio salmonicida</i>	$10^{-4}$
<i>Moritella viscosa</i>	$10^{-3}$
<i>Aeromonas salmonicida</i>	$10^{-3}$

#### 2.4.4 Farging

For fikserte bakterier ble «Sytox green» brukt for å visualisere internalisering. Senere ble cellene infisert med levende bakterier med «BactoView». For undersøkelser i DV-mikroskop ble «Sytox green» benyttet til å farge fikserte bakterier, og «CellMask» til farging av keratocytter. Tabell 4 viser en oversikt over ulike fluorescensfarger som ble testet.

Tabell 4: Viser en oversikt over de fluoriserende fargene som ble testet i Nanolive. «Sytox green» ble brukt til fikserte bakterier, mens «BactoView» ble brukt til levende bakterier (ThermoFisher).

Navn på farge	Farge	Fargemål	Levende/døde celler	Kanal med bølgelengde
Hoechst	Blå	Nucleus	Levende og døde	DAPI (358 nm)
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Blå	DNA	Døde	DAPI (358 nm)
Sytox™ green	Grønn	Nukleus, nukleinsyrer	Døde	FITC (488 nm)
Sytox™ orange	Orange	Nukleinsyrer	Døde	TRITC (547 nm)
BactoView™ Live Fluorescent Bacterial Stains	Rød	DNA	Levende og døde	Cy5 (651 nm)
CellMask™ Plasma Membrane Stains	Rød	Plasmamembran	Levende og døde	TRITC (547 nm)

## 2.4.5 Tilsetting av fikserte bakterier til cellene

### 2.4.5.1 Tilsetting av fikserte bakterier til keratocytter

Det ble tilsatt formalinfikserte bakterier av *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* og *A. salmonicida* til keratocytter og inkubert fra 24-96 timer. Siden *V. anguillarum* var den første bakterien som ble brukt, ble det i tillegg forsøkt kortere tidspunkter for denne bakterien (3-16 timer). Før studie i Nanolive ble prøven vasket tre ganger med 2 ml HBSS-miks, og studert i 1,5 ml medium.

Først ble det gjort fortyninger av bakteriene (Tabell 3) i HBSS-media. Deretter ble 10 µm «Sytox green» tilsatt og mikset (Vortex), før den ble lagt på is i 15 minutter. De fikserte bakteriene ble så tilsatt keratocytene. Videre ble de plassert i en plastboks med aluminiumsfolie, og satt på inkubasjonslaben (4°C) i ulike tidspunkter.

#### **2.4.5.2 Tilsetning av fikserte bakterier til ASK-celler**

ASK-celler ble forsøkt eksponert for fikserte bakterier av *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* og *A. salmonicida* (24-96 timer). I denne oppgaven legges det kun ved bilder av ASK-celler eksponert for *V. anguillarum*. Før studiet i Nanolive ble prøven vasket tre ganger med 2 ml PBS, og studert i 1,5 ml L15 media med 8% FBS (uten fenolrødt).

Fortynninger ble først gjort i L15 medium med 8% FBS (uten fenolrødt) (Tabell 3). Så ble 10 µl «Sytox green» tilsatt og mikset (Vortex), før den ble lagt på is i 15 minutter. De fikserte bakteriene ble så tilsatt ASK-cellene. Hver skål med ASK-celler var anslått til å ha omkring 200 000 celler. Prøvene ble plassert i en plastboks med aluminiumsfolie og plassert på inkubasjonslaben (4°C) i ulike tidspunkter.

#### **2.4.6 Infisering av keratocytter med levende bakterier**

Det ble gjort forsøk med å infisere keratocytter med levende bakterier av *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* i ulike tidspunkter (1-24 timer). Før billedtaking ble kulturene vasket.

En prekultur (3 ml) bestående av bakterier og medium (Tabell 2) ble laget 1-2 dager før infisering av cellene. Før infisering ble OD målt mellom 0.5-1, og prøven ble sentrifugert (800 x g) i 10 minutter for å stoppe veksten av bakterier. Væsken ble tatt ut, og HBSS-miks (2 ml) ble tilsatt og blandet. Deretter ble bakteriene telt i mikroskop, og det ble laget en fortykning på  $10^{-1}$ . «BactoView» (2 µl) ble så tilsatt prøven, med en virketid på 30 minutter. Prøven ble lagt i aluminiumsfolie og oppbevart i romtemperatur. Den ble deretter sentrifugert i 5 minutter (800 x g) og HBSS-miks (4 ml) ble tilsatt. 2 ml ble så tilsatt hver sin petriskål med keratocytter. Prøvene ble plassert i en plastboks med aluminiumsfolie rundt.

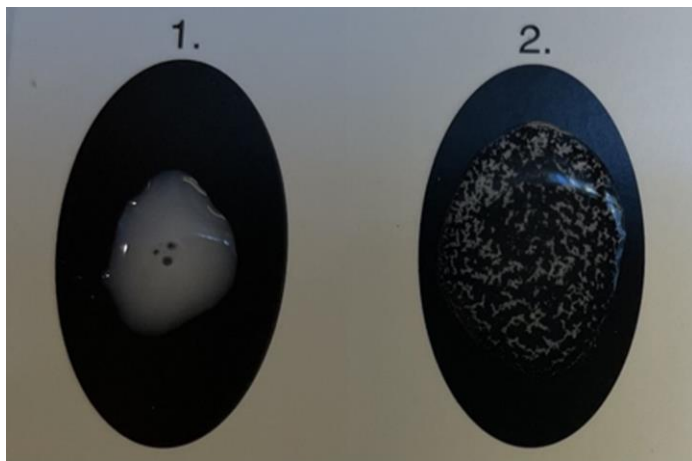
#### **2.4.7 Agglutinasjonstest**

Det ble gjort ulike agglutinasjonstester for å undersøke om det var riktig bakterie som ble dyrket i blodagarskålene (2% NaCl). Agglutinasjonstestene MONO-Vs, MONO-Mv og MONO-Va, ble brukt for hhv. *V. salmonicida*, *M. viscosa* og *V. anguillarum*. Siden alle testene viste et agglutinasjonsmønster i testreagenset ved tilsetning av den bestemte bakterien, viste dette tilstedeværelse av den ønskede bakterien (positiv test).

Testreagens består av monodisperse partikler dekket med spesifikke antistoffer. Testreagens vil, sammen med bakteriene, danne et presipitat bestående av partikler med antistoff og bakterier, og kan sees som hvitt og kornete. Kontrollreagens inneholder monodisperse partikler koblet til uspesifikt protein, og brukes for å oppnå et mer pålitelig resultat.



Testreagens og kontrollreagens ble tatt ut fra kjøleskapet og plassert i romtemperatur, og ble deretter ristet godt for å få en homogen blanding. En dråpe fra hver reagens ble så dryppet på hver sin analyseplate, dvs. kontrollreagens på plate 1 og testreagens på plate 2. Ved bruk av en øse ble noen kolonier av den bestemte bakterien fra blodagarskålen overført til hver av reagensene, og blandet i noen sekunder. Videre ble analyseplatene beveget forsiktig. Etter noen minutter ble agglutinasjon synlig i prøven med testreagens og dermed positiv for den aktuelle bakterien. I kontrollreagensen ble det ikke dannet noen agglutinasjon. Figur 12 viser agglutinasjon av testreagensen med *M. viscosa* (MONO-Mv).



Figur 12: Bildet viser agglutinasjon av testreagensen med *Moritella viscosa* til høyre (2), og en kontrollagens til venstre som ikke har en agglutinasjon (1).

## 2.5 Mikroskopering

I dette studiet ble mikroskopering og datainnsamlingen hovedsakelig gjort ved bruk av Nanolive 3D Cell Explorer-Fluo mikroskop. Det ble i tillegg benyttet GE DeltaVision Elite-mikroskop til noen få analyser helt på slutten av studiet.

### 2.5.1 Nanolive 3D Cell Explorer-Fluo mikroskop

Med mikroskopet Nanolive 3D Cell Explorer-Fluo ble det samlet inn holotomografiske bilder (HT) av keratocytter og ASK-celler eksponert for fluoriserende fikserte og levende bakterier. Bildene ble tatt i 3D med en forstørrelse på 60x og et synsfelt på 85x85x35 mm (Nanolive Manual, u.å.). Mikroskopet mangler okular og det benytter et CMOS kamera (165 fps, 1024x1024 piksler) med direktevisning av bildene på en dataskjerm. Det foregikk ved bruk av mikroskopets kompatible software STEVE. Før bildeinnsamlingen kunne starte, ble det utført optisk fokusering ved justering av objektivbordet langs z-aksen, og screening av prøven i xy-planet etter interessante områder. Selve bildeinnsamlingen startet ved å velge «single time

point» 3D. Laserstrålen ble reflektert fra et speil orientert 45° i forhold til z-aksen, og deretter ble denne rotert 360° rundt prøven og kameraets akse, slik at bildene ble innsamlet fra ulike vinkler. Det ga en serie av hologrammer rundt prøven. Ved bruk av STEVE ble de innsamlete bildene automatisk prosessert, og RI for alle komponentene i prøven kunne dermed bestemmes. “Overlay”-funksjonen ble brukt for å visualisere bakterienes fluorescens-signaler, ved bruk av FITC-kanalen. RI for HBSS-løsningen som ble benyttet var 1.3344, mens RI for L15 media med 8% FBS (uten fenolrødt) var 1.3352. Disse verdiene ble brukt til å kalibrere Nanolive for hvert eksperiment.

Ved bruk av FITC-kanalen (Nanolive Manual, u.å.) ble prøven eksponert for et sterkt og fokusert lys for å fremme fluoressens-utstrålingen fra bakteriene. Det var imidlertid viktig å begrense bruken av denne intense belysningen, slik at de levende cellene og levende bakteriene ikke ble skadet som følge av fototoksitet.

### **2.5.2 GE DeltaVision Elite mikroskop**

GE DeltaVision Elite (DV)-mikroskopet er et integrert og fleksibelt lys- og fluorescens-mikroskop optimalisert for studie av levende celler (Imsol Image Solutions, 2022; GE-Healthcare, 2014). Samtidig med høy bildekvalitet ivaretar mikroskopet levedyktigheten til cellene. Mikroskopet er utstyrt med et PCO Edge sCMOS kamera. Softwaren «DeltaVisionSoftWoRx™» ble benyttet til innsamling og analyse av 3D bilder, samt visualisering i forbindelse med lys- og fluorescensmikroskopi.

DV-mikroskopet ble benyttet til innsamling av noen «brightfield images» av keratocytter eksponert for fikserte bakterier (*M. viscosa*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*) i 72 timer, og hvor de fikserte bakteriene var farget med «Sytox green» på forhånd. FITC-kanalen ble brukt for å få fram den grønne fluoriserende fargen (bølgelengde 464-489 nm) som ble emittert fra bakteriene.

### **2.5.3 Bildebehandling**

Bildene som ble tatt i Nanolive og DV-mikroskop ble redigert i bilderedigeringsprogrammet Fiji. Dette er tilgjengelig gjennom ImageJ software (Ferreira & Rasband, 2012), og er designet for redigering av multi-dimensjonale bilder i forbindelse med vitenskapelige prosjekter. Programvaren oppdateres jevnlig med nye funksjoner kontinuerlig (Collins, 2007).

Det ble produsert tiff-format av RI-dataene, og deretter ble de eksportert som 32-bit «tiff float» filer, hvilket gjorde de automatisk lesbare i Fiji. Visualiseringen av fluoriserende bakterier ble gjort med «overlay» sammen med RI. Undersøkelsene av RI-dataene ble gjort i tomogrammene ved å «skrolle» gjennom disse i Z-planet. Målestokken angitt i bildene innsamlet i Nanolive er basert på at pikselstørrelsen ble satt til 0.2020  $\mu\text{m}$  (pikselhøyde/bredde) og 0.360  $\mu\text{m}$  (voxel dybde). Etter redigering og analyse av bildene i Fiji ble disse lagret i png-format.

## 3 Resultater

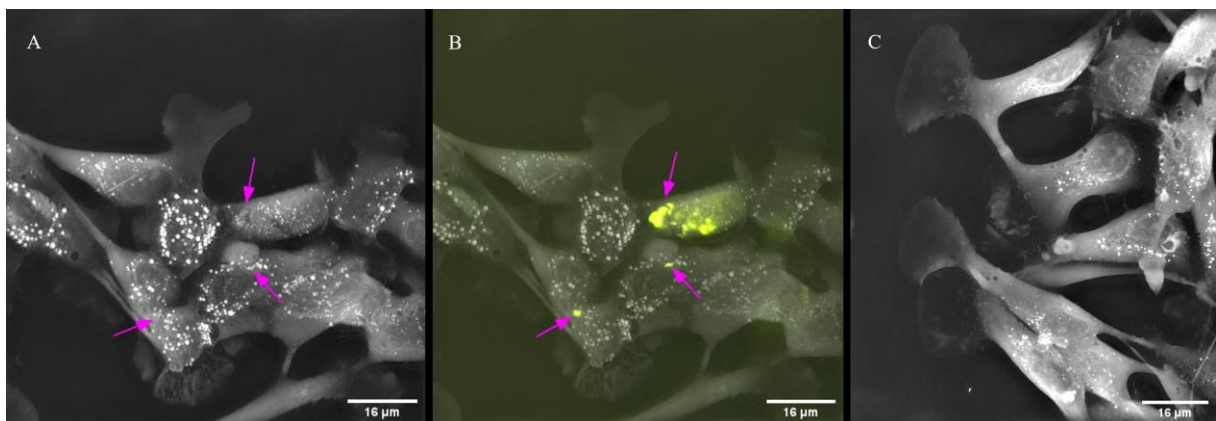
### 3.1 Eksponering av celler for fikserte bakterier

#### 3.1.1 Keratocytter eksponert for fikserte bakterier

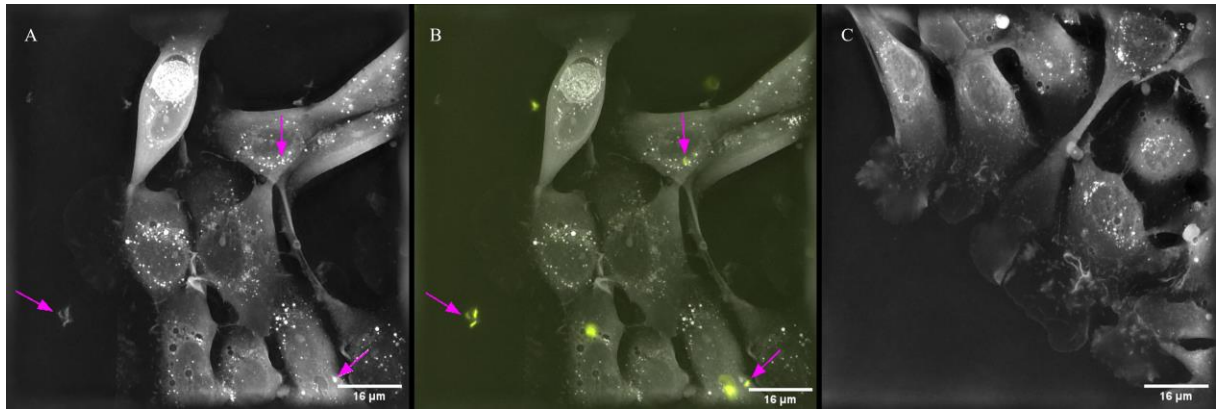
Keratocytter fra huden til atlantisk laks og ASK-celler ble eksponerte for fikserte bakterier. Cellene ble inkubert i 24, 48, 72 og 96 timer. I tillegg ble keratocytter inkubert med inaktiverte *V. anguillarum* i 3, 6 og 9 timer. Det ble innsamlet en serie med bilder for hvert tidspunkt i Nanolive, hvor ett bilde ble valgt ut for dokumentasjon i oppgaven. Ved bruk av «Sytox green»-merkede bakterier ble de identifisert i Nanolive. Til hvert tidspunkt ble det lagt ved en kontrollplate, der cellene ikke hadde vært eksponert for bakterier.

##### 3.1.1.1 *Vibrio anguillarum*

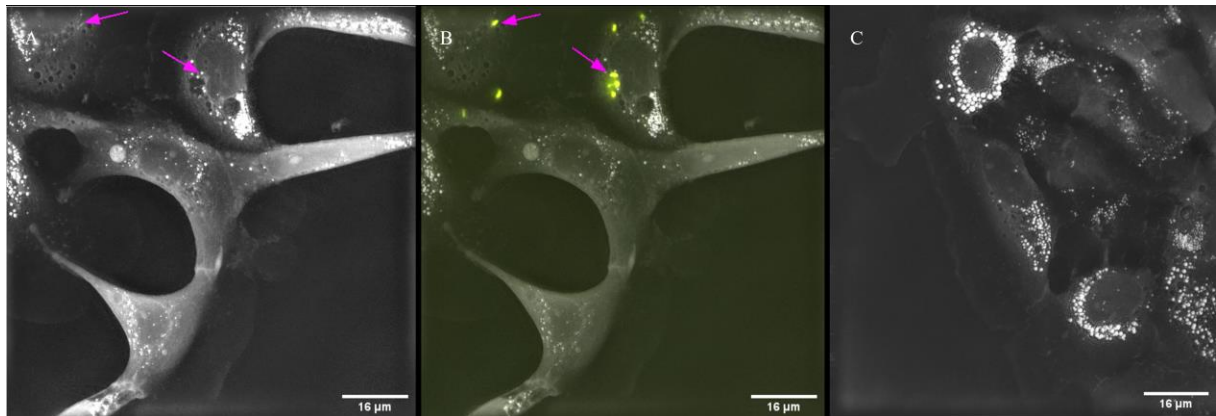
Figur 13, Figur 14 og Figur 15 viser keratocytter eksponert for fikserte *V. anguillarum* i hhv. 3, 6 og 16 timer. Intracellulære bakterier ble observert ved alle tidspunktene. Figur 13 viser en ansamling av bakterier ved cellekjernen i en av cellene, samt to enkeltbakterier – antagelig også i cytoplasma. Figur 14 viser også bakterier ekstracellulært og intracellulært, sannsynligvis som enkeltbakterier. Figur 15 (A og B) viser flere bakterier samlet i cytoplasma i tillegg til noen enkeltbakterier som også ser ut til å være i cytoplasma.



Figur 13: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fikserte *V. anguillarum* i 3 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene indikerer intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde tomogram med «overlay» som får fram bakteriernes fluorescens («Sytox green»). Bilde B viser intracellulære bakterier fordelt på tre celler (piler), hvor den ene cellen ser ut til å ha en ansamling av bakterier oppå cellekjernen. C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

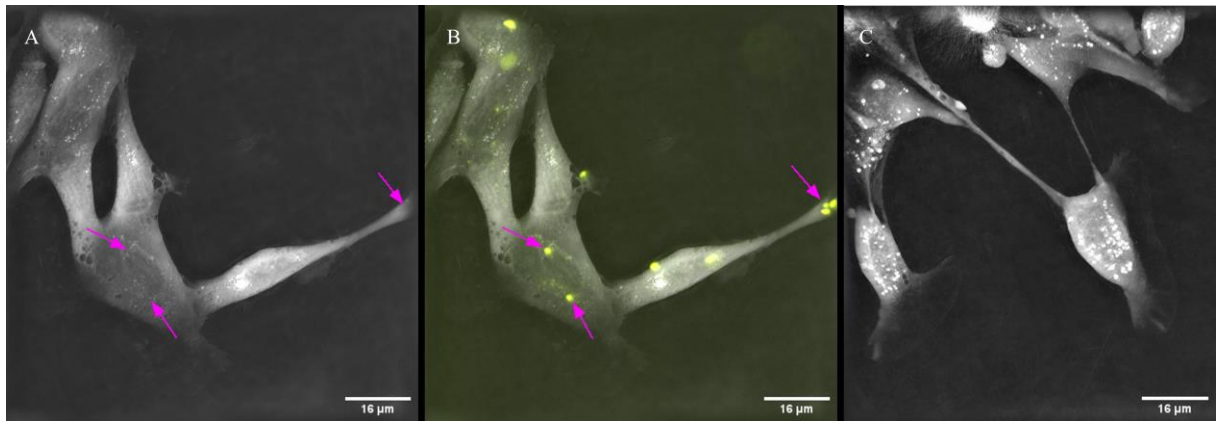


Figur 14: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. anguillarum* i 6 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene peker på bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay» får tydelig fram bakterienes fluorescens («Sytox green»). Bildet viser intracellulære bakterier i cytoplasma samt ekstracellulære bakterier (pil). C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

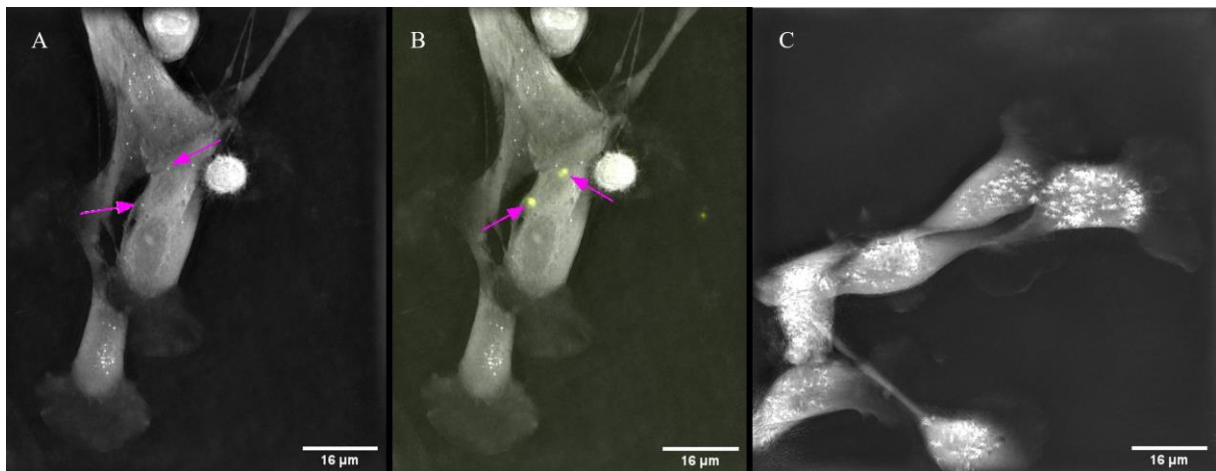


Figur 15: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. anguillarum* i 16 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene viser intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay» som får fram bakterienes grønne fluorescens («Sytox green»). Hos flere bakterier ses den karakteristiske stavformen til *V. anguillarum*. Bildet viser intracellulære bakterier, hvor flere bakterier ligger samlet innenfor en celle (pil til høyre). C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

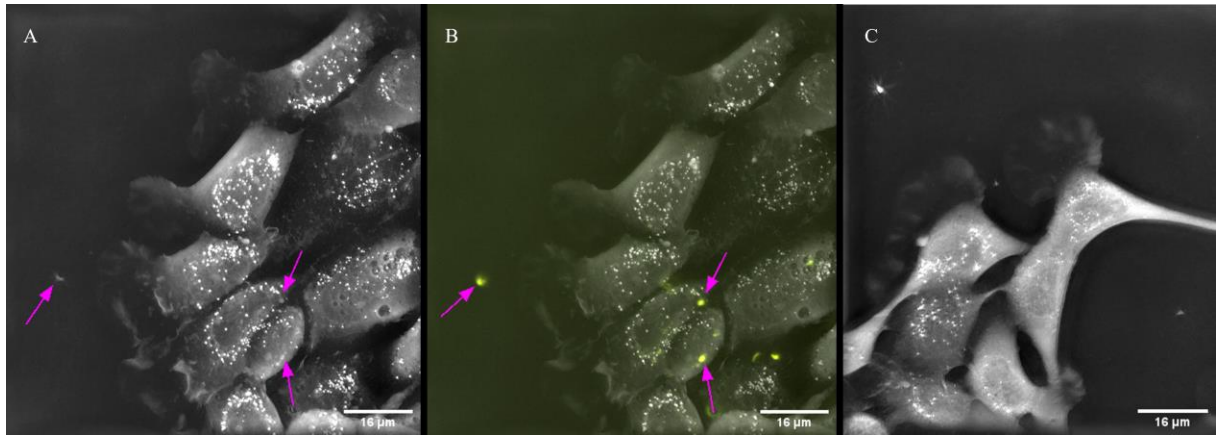
Figur 16, Figur 17, Figur 18 og Figur 19 viser keratocytter eksponert for fikserte *V. anguillarum* i henholdsvis 24, 48, 72 og 96 timer. Mest sannsynlig intracellulære bakterier ble også her observert ved alle tidspunktene. I Figur 16 vises en ansamling av tre bakterier, som så ut til å ligge i ytterkanten i en av cellene, mest trolig cellemembranassosiert. Figur 17 viser enkeltbakterier i cellens cytosol, der lamellipodium (viftekanthodet på den nederste cellen) også kom tydelig fram. Figur 18 viser i tillegg til to intracellulære bakterier, også en ekstracellulær bakterie. Figur 19 viser intra- og ekstracellulære bakterier, samt tunnelligende strukturer mellom celler.



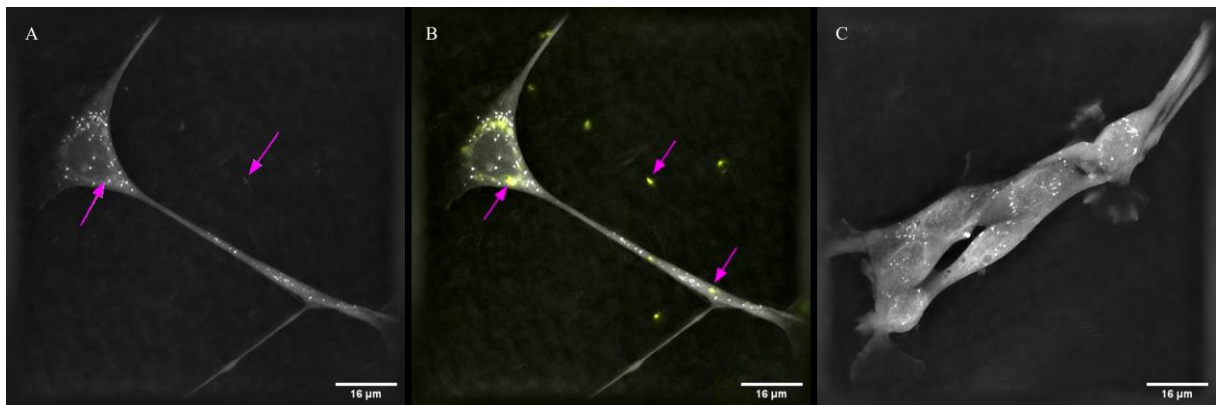
Figur 16: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. anguillarum* i 24 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene peker på intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay» som får fram bakterienes grønne fluorescens («Sytox green»), der flesteparten av bakteriene ser ut til å være intracellulære. C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



Figur 17: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. anguillarum* i 48 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt) A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor de to pilene indikerer intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay», der bakterienes grønne fluorescens («Sytox green») tyder på at de ligger i cytosol. Her vises også cellenes lamellipodium tydelig. C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



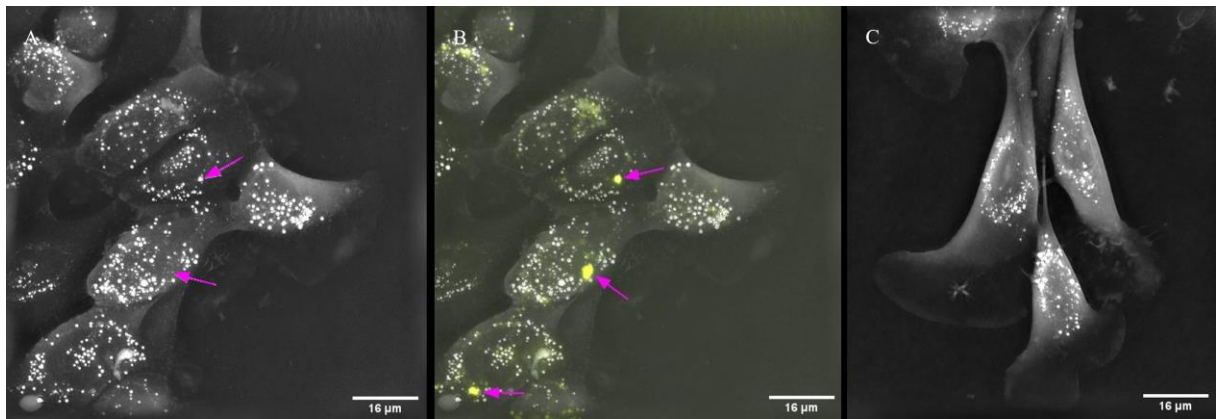
Figur 18: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. anguillarum* i 72 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, og B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay», der bakteriene farget med «Sytox green» viser grønn fluorescens. To av pilene indikerer intracellulære bakterier, mens en peker på en ekstracellulær. C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



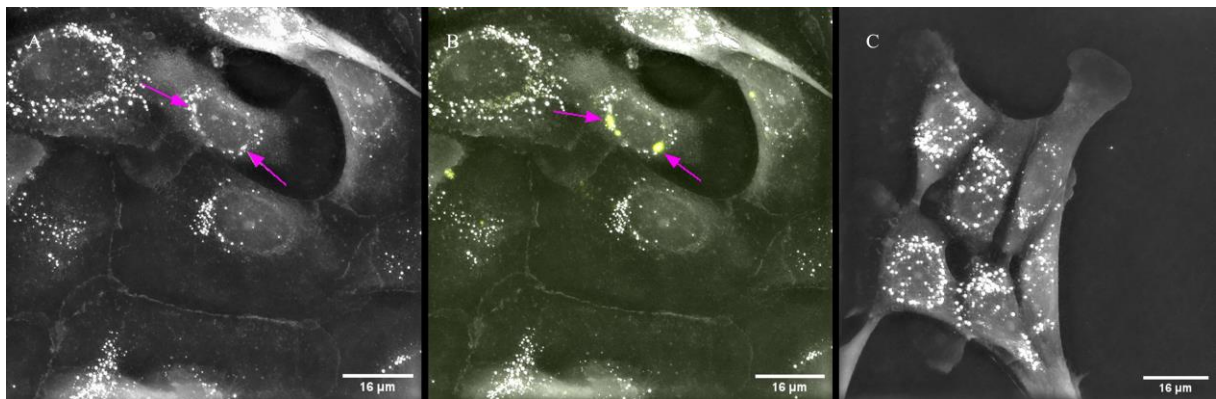
Figur 19: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. anguillarum* i 96 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde der pilene peker på bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay», som viser den grønne fluorescensen («Sytox green») fra de fikserte bakteriene (pil). Flere bakterier er intracellulære, mens noen er ekstracellulære. Bildet viser også tunnellignende strukturer mellom cellene. C) Kontrollplate av keratocytter (uten tilsatt bakterier). Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

### 3.1.1.2 *Moritella viscosa*

Figur 20, Figur 21, Figur 22 og Figur 23 viser keratocytter eksponert for fiksert *M. viscosa* i henholdsvis 24, 48, 72 og 96 timer. For alle tidspunktene ble celleassosierte bakterier observert – trolig både membranassosierte og intracellulære. Figur 20 viser tre bakterier lokalisert nært cellekjernen i ulike celler. Figur 21 viser noen bakterier rundt cellekjernen i en av cellene, mens Figur 22 viser bakterier inni to keratocytter. I Figur 23 ble det observert en tett ansamling av bakterier i en av cellene.

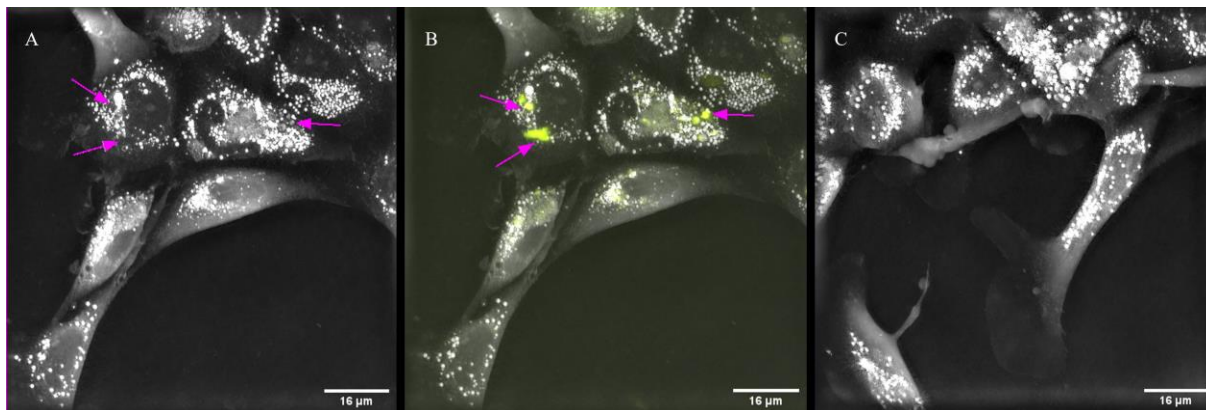


Figur 20: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *M. viscosa* i 24 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene peker på intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Bakteriene med grønn fluorescens («Sytox green») viser at disse er lokalisert utenfor cellekjernen i 3 ulike keratocytter (pil). C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

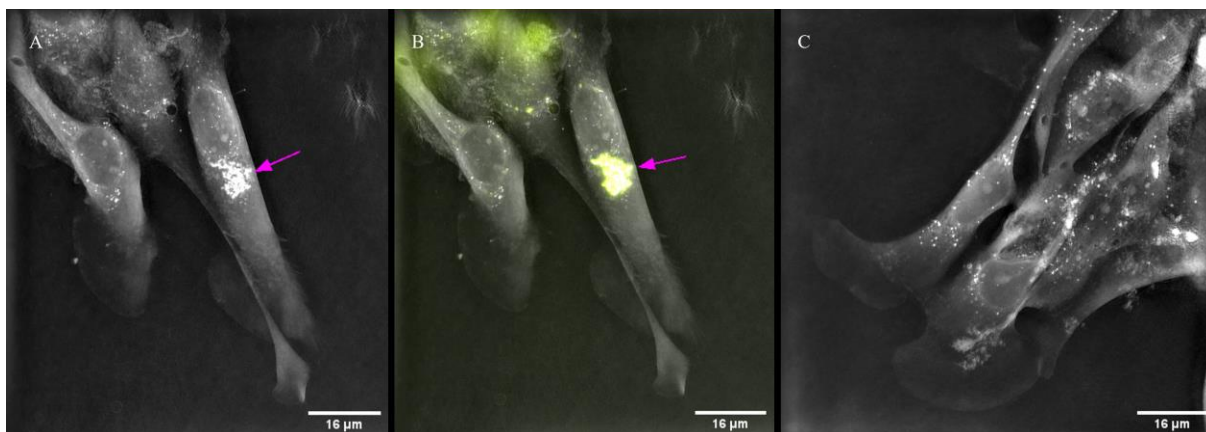


Figur 21: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *M. viscosa* i 48 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene peker på intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay», hvor bakteriernes fluorescens gjør at de blir synlige. Her ser vi noen intracellulære bakterier, som ligger rundt cellekjernen i en av cellene (pil). C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.





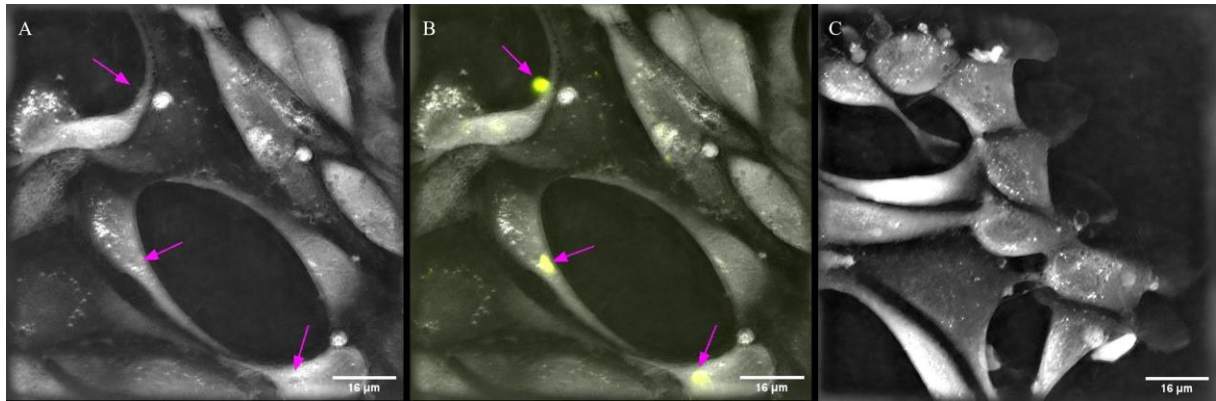
Figur 22: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *M. viscosa* i 72 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde hvor pilene peker på intracellulære bakterier i to av cellene. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Bakterier med grønn fluorescens ses innenfor to av cellene (pil). C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



Figur 23: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *M. viscosa* i 96 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, der pilen peker på intracellulære bakterier, der disse ligger tett samlet (pil). B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Her ser vi intracellulære bakterier tett samlet med fluorescens («Sytox green») i en av keratocytene (pil). C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

### 3.1.1.3 *Vibrio salmonicida*

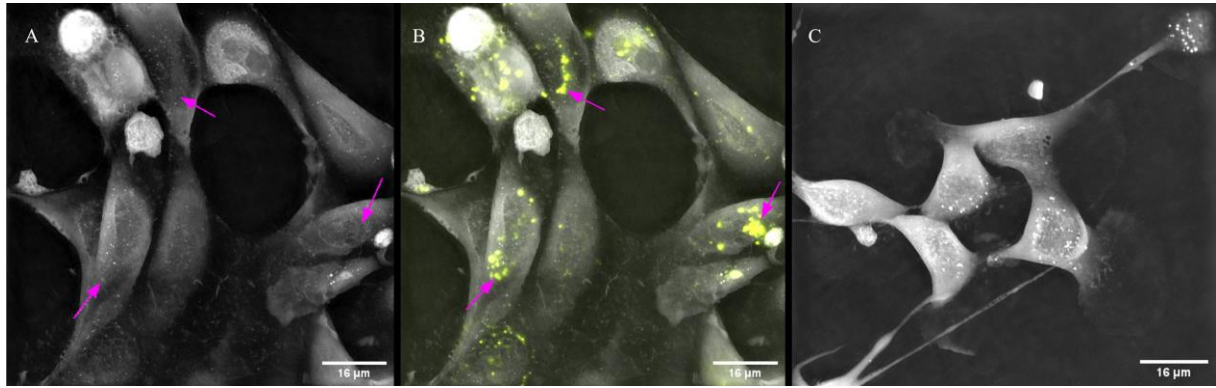
Keratocytter eksponert for fiksert *V. salmonicida* i 24, 48, 72 og 96 timer er vist i hhv. Figur 24, Figur 25, Figur 26 og Figur 27. Alle bildene tyder på at det forekommer intracellulære bakterier. Figur 24 indikerer intracellulære bakterier, samt noen ekstracellulært. Figur 25 vises bakterier innenfor en av cellene. Her sees også tunnellignende strukturer mellom cellene. Intracellulære bakterier der noen opptrer i ansamlinger fordelt på flere celler vises i Figur 26. I Figur 27 ser vi flere bakterier tett samlet, hvor de ligger nært cellekjernen.



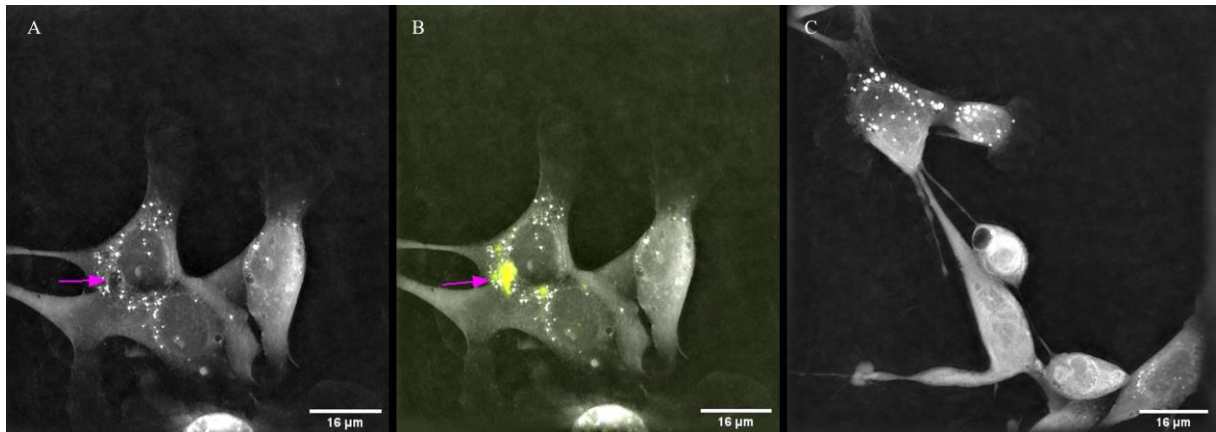
Figur 24: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. salmonicida* i 24 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, hvor de to nederste pilene indikerer intracellulære bakterier nært cellekjerna. Den øverste pilen indikerer bakterier utenfor cella. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Grønn fluorescens («Sytox green») viser intracellulære bakterier nært cellekjernen (de to nederste pilene), mens den øverste pilen peker på bakterier ekstracellulært. C) Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



Figur 25: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. salmonicida* i 48 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, hvor pilen peker på intracellulære bakterier. B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Ved bruk av grønn fluorescens («Sytox green») blir de intracellulære bakteriene synliggjort (pil). Tunnellignende strukturer mellom cellene er synlig i A og B. Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



Figur 26: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. salmonicida* i 72 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, hvor pilene peker på intracellulære bakterier (piler). B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Her ser vi fluoriserende intracellulære bakterier («Sytox green») fordelt på flere celler, hvor noen opptrer i ansamlinger. Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



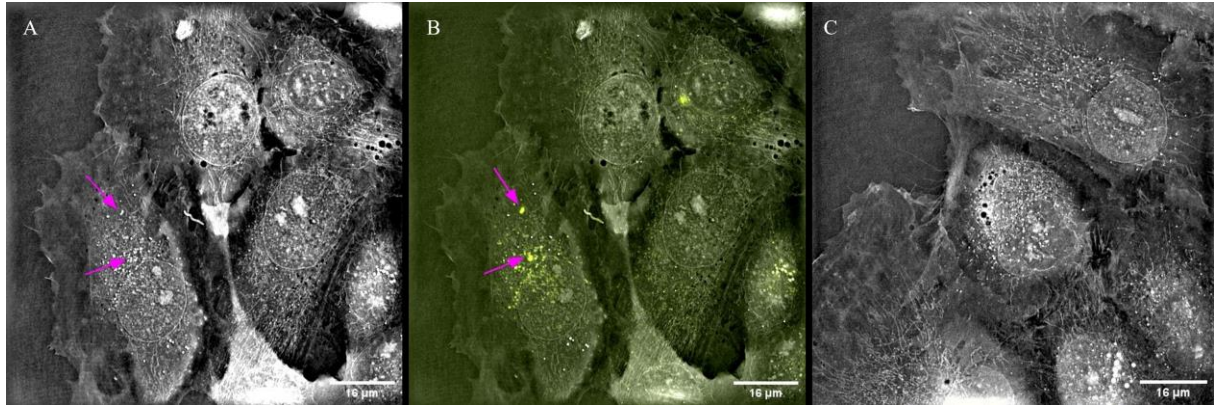
Figur 27: Keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fiksert *V. salmonicida* i 96 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, der intracellulære bakterier ligger tett samlet (pil). B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Her ses intracellulære bakterier med fluorescens («Sytox green») som er tett samlet nært cellekjerna (pil). Kontrollplate uten tilsatt bakterier. Alle bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

### 3.1.2 ASK (Atlantic salmon kidney)-celler eksponert for fikserte bakterier

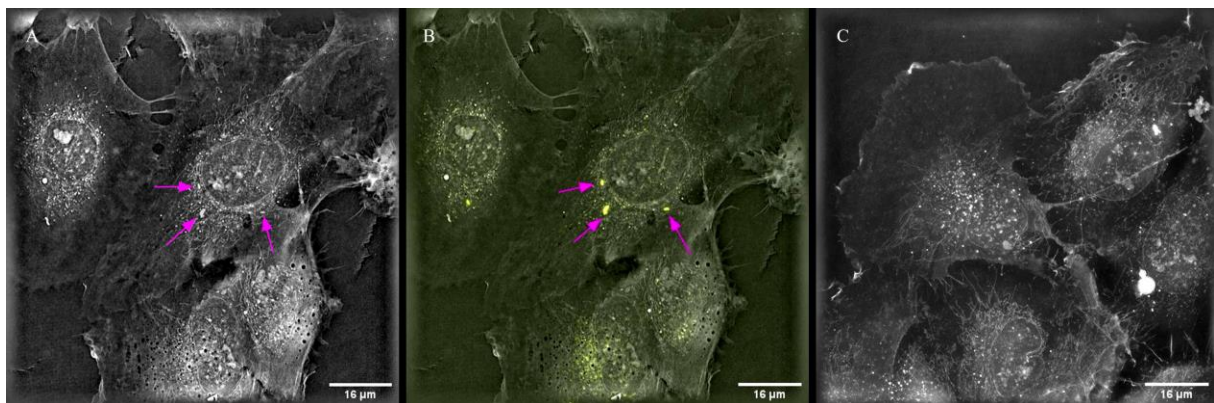
#### 3.1.2.1 *Vibrio anguillarum*

ASK celler ble inkuberte med fikserte *V. anguillarum* i hhv. 24, 48, 72 og 96 timer, og mikroskopibildene er vist i hhv. Figur 28, Figur 29, Figur 30 og Figur 31. Alle tidspunktene viste opptak av bakterier, eller som cellemembranassosierte. Figur 28 viser tydelig to intracellulære bakterier innenfor en av cellene. I Figur 29 sees bakterier nært cellekjernen, mens i Figur 30 vises flere bakterier relativt tett samlet i cytoplasma. Ved 96 timer så vi i tillegg til noen bakterier intracellulært, samt prikkede fluorescerende områder rundt

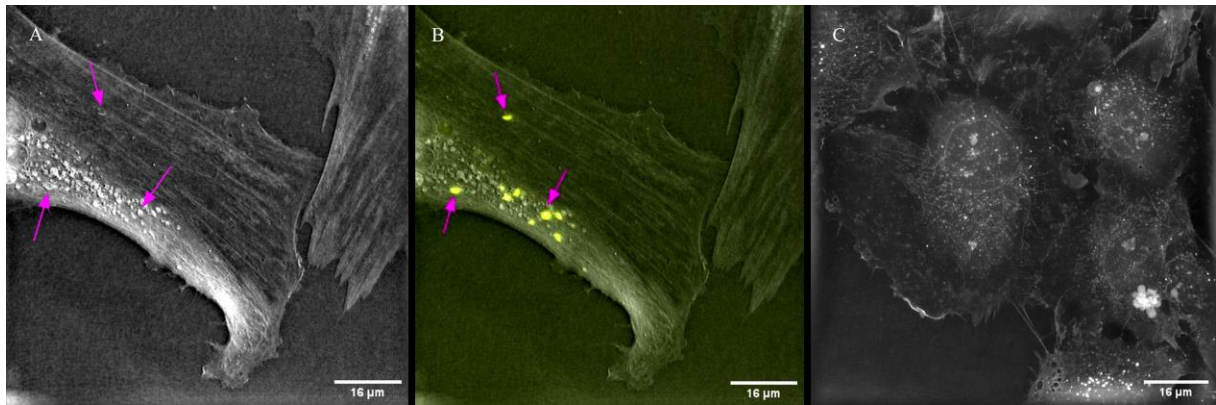
cellekjernene (Figur 31). Dette kan være organeller i ASK-cellene som har blitt fluorescensmerket av «Sytox green» – lekket fra bakterier eller viser tilstedeværelse av degraderte/fragmenterte bakterier.



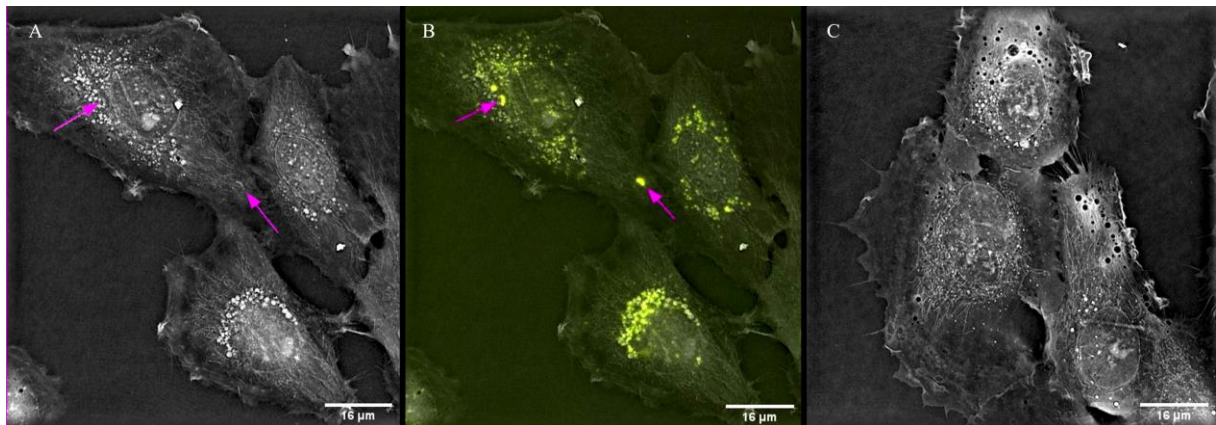
Figur 28: ASK celler eksponert for fikserte *V. anguillarum* i 24 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Singelplan HT-bilde viser hvor pilene peker på to intracellulære bakterier. B) Singelplan HT-bilde med «overlay», der pilene indikerer to intracellulære bakterier som har blitt farget med grønn fluoriserende («Sytox green»). Bakteriene ser ut til å ligge i cytoplasma. C) Kontrollplate av ASK-celler (uten tilsatt bakterier). Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og videre redigert i Fiji.



Figur 29: ASK celler eksponert for fikserte *V. anguillarum* i 48 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Singelplan HT-bilde viser intracellulære bakterier (pil). B) Singelplan HT-bilde med «overlay», som får fram den grønne fluorescensen («Sytox green») fra de fikserte bakteriene. Pilene peker på bakterier i en av cellene, hvor de ligger nært cellekjerna. C) Kontrollplate av ASK-celler (uten tilsatt bakterier). Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og videre redigert i Fiji.



Figur 30: ASK celler eksponert for fikserte *V. anguillarum* i 72 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Singelplan HT-bilde viser intracellulære bakterier (pil). B) Singelplan HT-bilde med «overlay», som får fram den grønne fluorescensen fra de «Sytox green»-fargete, fikserte bakteriene. Flesteparten av bakteriene er intracellulære og ligger relativt tett samlet. C) Kontrollplate av ASK-celler uten tilsatt bakterier. Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



Figur 31: ASK celler eksponert for fikserte *V. anguillarum* i 96 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Singelplan HT-bilde viser intracellulære bakterier (pil). B) Singelplan HT-bilde med «overlay», hvor pilene indikerer to intracellulære bakterier. Ved bruk av «Sytox green» farging, ble bakteriene fluorisert, noe som dermed synliggjør bakterier. Områdene i cellene med mye fluorescens kan skyldes at organeller også har blitt fluorisert. C) Kontrollplate av ASK-celler uten tilsatt bakterier. Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.

## 3.2 Infisering av celler for levende bakterier

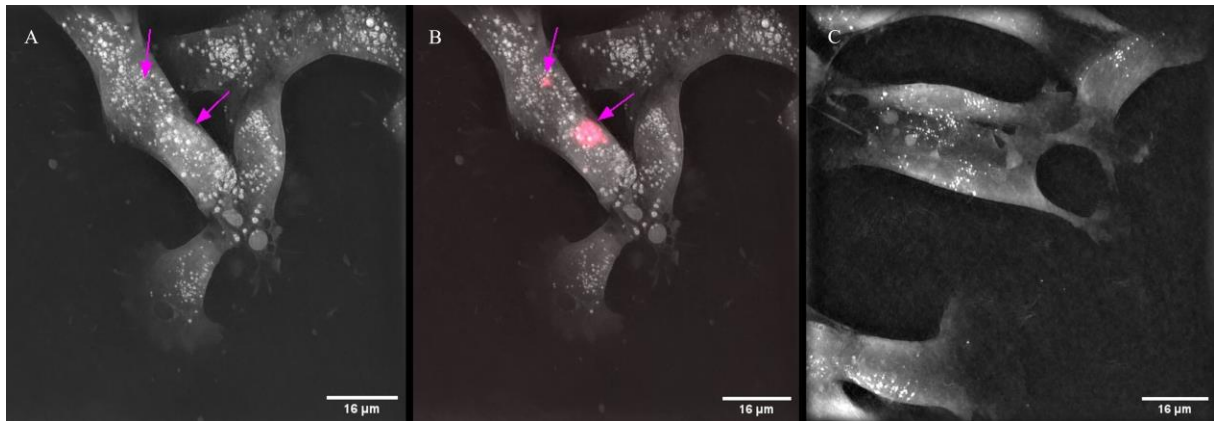
### 3.2.1 Keratocytter infisert med levende bakterier

Keratocytter fra huden til atlantisk laks ble inkubert med levende bakterier (*V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida*), og cellene ble analysert i holomikroskop ved ulike tidspunkt. Cellene ble inkuberte med *M. viscosa* kun en time. For *V. anguillarum* var inkubasjonstiden hhv. 3 timer og 24 timer, mens det for *V. salmonicida* var 24 timer. I likhet med celler som ble eksponerte for fikserte bakterier, ble det innhentet en rekke bilder for hvert tidspunkt i

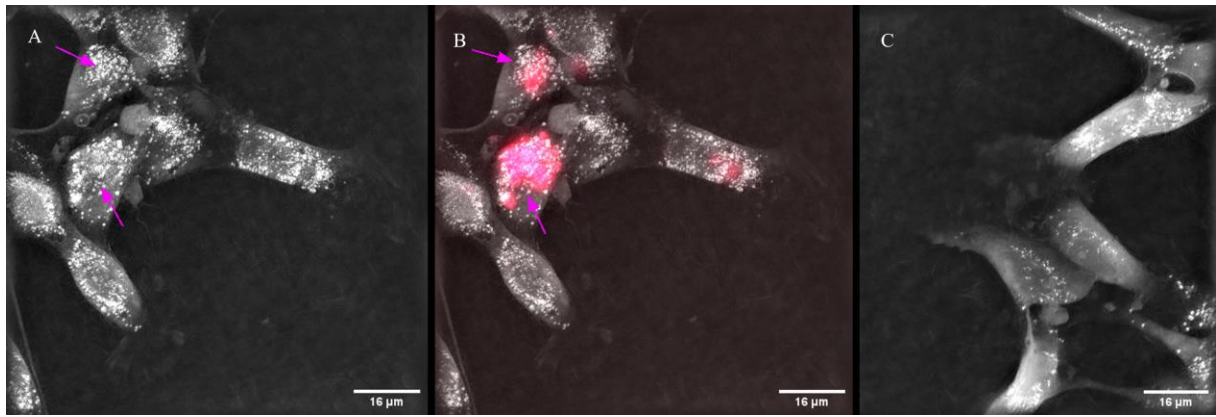
Nanolive, der et av bildene ble brukt for dokumentasjon. Bakterien ble på forhånd merket med «BactoView», som ga en rød fluorescensfarge. Fargen ble synlig ved å benytte Cy5 filter, samt billedtaking med overlay. Det ble lagt ved kontrollplate til noen tidsperioder, dvs. uten tilsetning av bakterier.

### 3.2.1.1 *Vibrio anguillarum*

Figur 32 og Figur 33 viser keratocytter inkubert med levende *V. anguillarum*, som vises i bildene ved rød fluorescensfarge («BactoView»). Celleassosierte bakterier ble observert for begge tidsperiodene. Ser trolig ut som bakteriene er intracellulære. Figur 32 viser bakterier i to av keratocytene, hvor en ansamling kan sees. Cellene ved senere tidspunkt (24t) (Figur 33), viste større ansamlinger enn det som ble observert ved 3-timerstidspunktet.



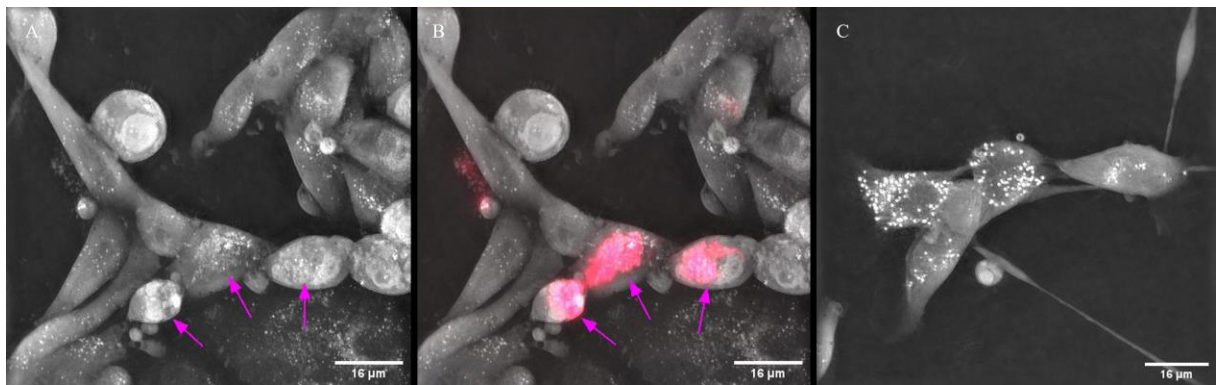
Figur 32: Keratocytter fra huden til atlantisk laks infisert med levende *V. anguillarum* i 3 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, og B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay», som får fram den røde fluorescensen («BactoView») fra levende bakterier (pil). I en av cellene vises en ansamling av bakterier intracellulært. C) Kontrollplate av keratocytter (uten tilsatt bakterier). Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og redigert i Fiji.



Figur 33: Keratocytter fra huden til atlantisk laks infisert med levende *V. anguillarum* i 24 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, og B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Bakterier fluorisert med «BactoView» vises tydelig innenfor to celler med rød farge (pil). Siden en stor andel av den ene keratocytten inneholder relativt mye fluorescens, kan dette tyde på en stor ansamling av bakterier her. C) Kontrollplate av keratocytter (uten tilsatt bakterier). Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og videre redigert i Fiji.

### 3.2.1.2 *Vibrio salmonicida*

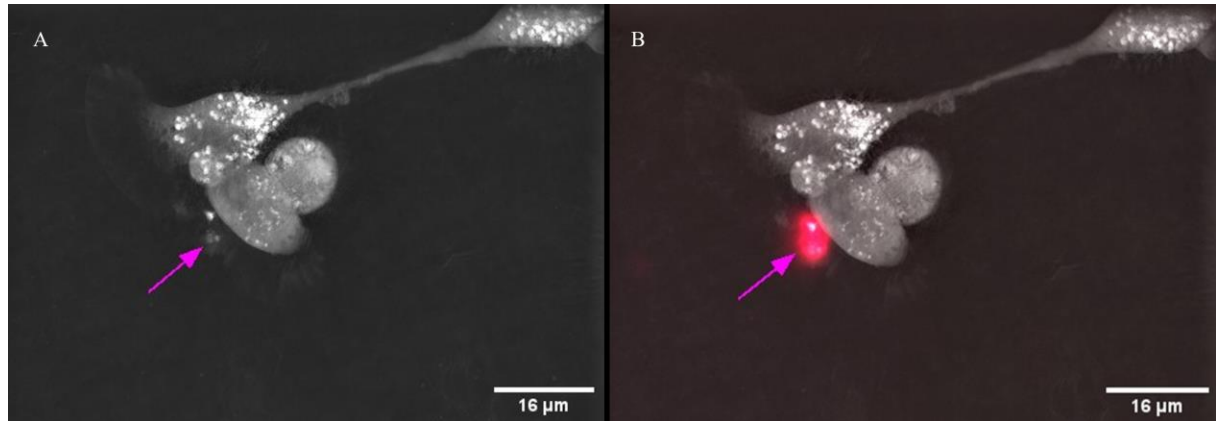
Keratocytter inkubert med levende *V. salmonicida* vises i Figur 34. Intracellulære bakterier sees ved rød fluorescens («BactoView»), og er fordelt på tre av cellene. Bakteriene ser ut til å oppta en stor del av cella.



Figur 34: Keratocytter fra huden til atlantisk laks infisert med levende *V. salmonicida* i 24 timer er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, hvor pilene indikerer intracellulære bakterier (piler), og B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Bakterier med rød fluorescens («BactoView») sees innenfor tre av cellene (piler), hvor de ser ut til å oppta en stor del av cella. C) Kontrollplate av keratocytter (uten tilsatt bakterier). Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og videre redigert i Fiji.

### 3.2.1.3 *Moritella viscosa*

Figur 35 viser keratocytter inkubert med levende *M. viscosa*. Bakteriene ser ut til å ligge utenfor cella, på lamellipodium. Farging med «BactoView» gjør at bakteriene vises i bildet med rød fluorescens.

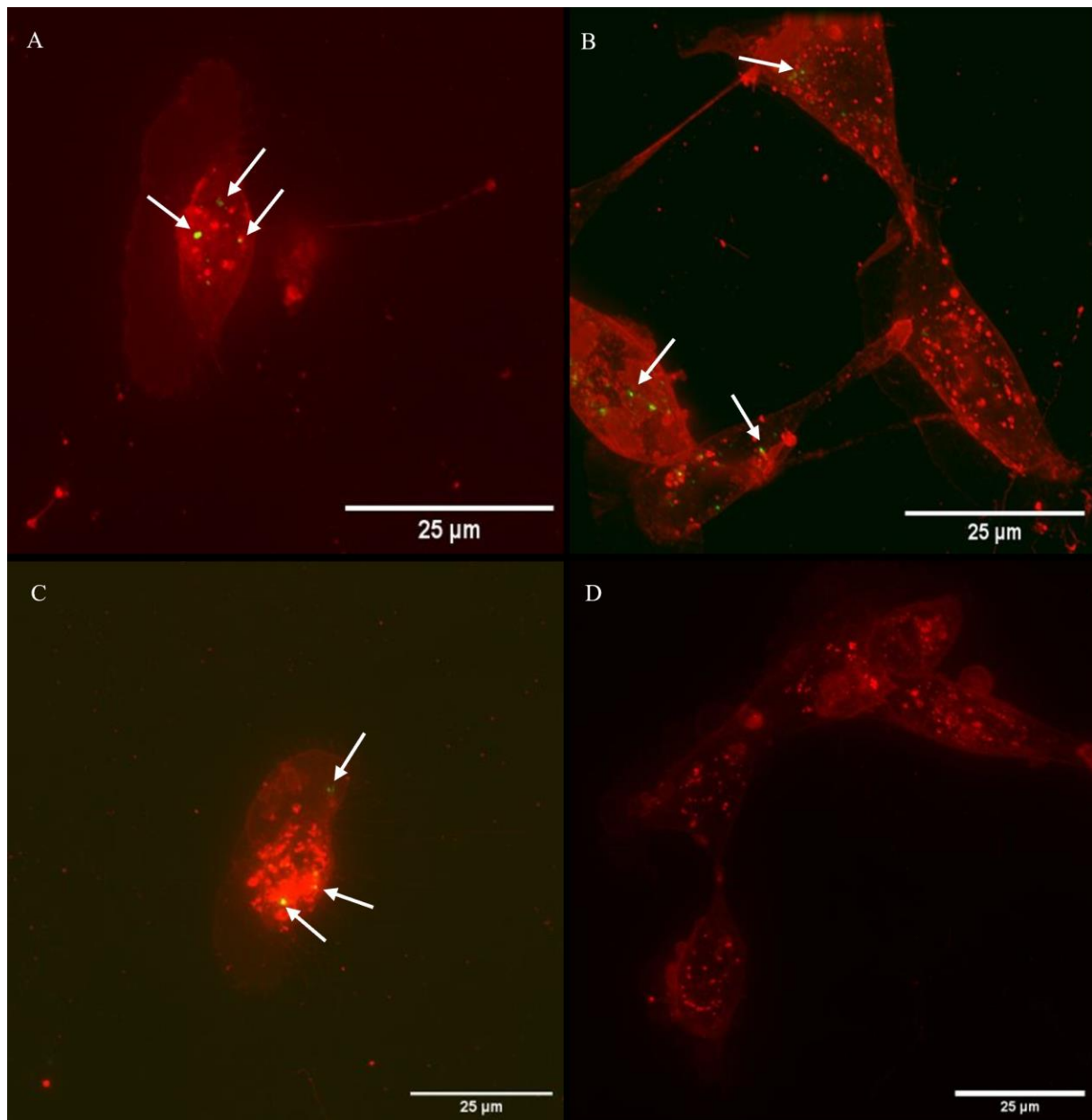


Figur 35: Keratocytter fra huden til atlantisk laks infisert med levende *M. viscosa* i 1 time er vist i A og B (samme bildeutsnitt). A) Z-projeksjon av HT-bilde, og B) Z-projeksjon av HT-bilde med «overlay». Bakterier er rødfarget av «BactoView» (pil), og ser ut til å ligge ekstracellulært, muligens på lamellipodium. Bildene er tatt i Nanolive (forstørrelse 60x) og videre redigert i Fiji.

## 3.3 Keratocytter inkubert med fikserte bakterier – undersøkt i DV-mikroskop

For å undersøke om fikserte bakterier kan være intracellulære i keratocytter, ble det benyttet DV-mikroskop. Keratocytterne ble inkubert med ulike bakterier i 72 timer, A) *M. viscosa*, B) *V. anguillarum*, C) *V. salmonicida*, hvor alle viser intracellulære bakterier (Figur 36).





Figur 36: Viser keratocytter fra huden til atlantisk laks eksponert for fikserte bakterier (ulike typer) i 72 timer. Keratocytter er farget med «CellMask», mens bakteriene er farget med «Sytox green» og vises med grønn fluorescens. Keratocytene er tilsatt A) *M. viscosa*, B) *V. anguillarum* C) *V. salmonicida*, der pilene peker på noen av de intracellulære bakteriene. D) Kontrollplate uten tilsetning av bakterier. Bildene er tatt i DV-mikroskop (kanal TRITC).

## 4 Diskusjon

### 4.1 Dyrking av celler

#### 4.1.1 Keratocytter og holotomografi

Dyrking av keratocytter fra huden til laks er beskrevet i kap. 2.1.3. Keratocytene ble under dyrking ofte observert i celleflak som migrerte fra fiskeskjellene, mens mindre ansamlinger av celler eller enkeltceller også forekom. Migrering av celler fra fiskeskjell syntes å være raskere ved 12°C sammenlignet med 4°C, selv om vi ikke foretok direkte målinger av hastigheten. Det er kjent at migreringshastigheten til keratocytter er temperaturavhengig (Ream et al., 2003).

Det viste seg å være fordelaktig å studere cellene i Nanolive innen en uke etter dyrking. Det skyldtes at keratocytene som oftest begynte å dø etter dette. Andre utfordringer var at det ikke alltid migrerte keratocytter fra fiskeskjellene. I tillegg kunne fiskeskjellene enkelte ganger løsne fra dyrkningskålene pga. for stor bevegelse av skålene.

Holotomografi med Nanolive er ikke mye brukt for å studere opptak av bakterier i celler, men er tidligere benyttet for å studere responser fra infeksjon av parasitter i celler (López-Osorio, 2020). Hasheminasab et al. (2022) brukte 3D holotomografisk mikroskopering ved undersøkelser av NETosis i levende celler forårsaket *Cryptosporidium parvum*.

Holotomografi har også blitt bruk for å studere opptak av ulike partikler i celler. Friedrich et al. (2020) benyttet 3D holotomografi i forbindelse med intracellulær kvantifisering og lokalisering av umerkede jernoksid nanopartikler. Studiet demonstrerte at det var celledoesifikt intracellulært opptak av nanopartikler for ulike pankreatiske cellelinjer. De konkluderte med at 3D holotomografi-mikroskopi var en nyttig metode for å skille mellom intracellulær- og membranassosierte partikler. I masterstudiet av Stette (2022) ble holotomografisk mikroskopering med Nanolive benyttet til innsamling av høyoppløselige bilder. Interaksjonen mellom nano- og mikropartikler av ulike materialer (f.eks. gull, silika, fluorescerende polystyrenpartikler) med hornhinne- og keratocytter fra atlantisk laks ble undersøkt.

### 4.1.2 ASK-celler

I kap. 2.3.2 er dyrking av ASK-celler beskrevet, etterfulgt av splitting i kap. 2.3.3. Dyrking av ASK-celler gikk i starten etter planen. ASK-cellene så fine ut og splitting ble gjennomført når ASK-cellene var ca. 90% konfluente, noe som tok en ukes tid. Etter noen måneder begynte derimot ASK-cellene å se dårlige ut. I tillegg vokste de sakte, og de ble lite konfluente etter splitting. Dette kan muligens skyldes at det ble foretatt høyere fortyning av cellene sammenlignet med tidligere, hvor 1:3 ble brukt. Ifølge leverandøren av ASK-celler anbefales det en subkulturering (splitting) på 1:2 til 1:3 (ATCC). Dette var kanskje årsaken til forsøket med ASK-celler tilsatt fikserte *V. salmonicida*, *M. viscosa* og *A. salmonicida*, ble mislykket. Et annet moment er at ASK cellene hadde passert 200 splittinger/generasjoner, noe som kanskje er for mange for gunstig cellefunksjon. Kombinasjonen av disse to momentene var sannsynligvis årsaken til at cellene ikke trivdes.

## 4.2 Farging

For farging og visualisering av fikserte bakterier i cellene, ble ulike fluorescerende agenser testet (Tabell 4). Det var derfor viktig å finne en fluorescens som synliggjorde kun bakterier, og i minst mulig grad keratocyt- og ASK-cellenes organeller. Bruk av Hochst fargestoffer resulterte i at også cellekjernene til keratocytter og ASK-celler ble farget, mens DAPI viste seg også å farge mange av cellekjernene til keratocytene, samt noen cellekjerner hos ASK-cellene. Siden DAPI er cellegjennomtrengelig blir den vanligvis brukt til farging av døde celler. I henhold til produsenten (ThermoFisher) kan høyere konsentrasjoner av DAPI likevel kunne trenge gjennom levende celler. Så en mulighet er at det har blitt benyttet en for høy konsentrasjon, som resulterte i farging av kjerner til levende celler. Det viste seg at «Sytox green» fungerte best i å visualisere inaktiverede bakterier med bruk i kulturer med keratocytter og ASK-celler. I Figur 31 kan det imidlertid se ut til at organeller i ASK-cellene har tatt til seg fluorescens («Sytox green»), organellene kan være vesikler. Siden dette bildet er fra det lengst fremskridende tidspunktet (96 timer), kan inkubasjonstiden med bakterier også ha en innvirkning.

Siden «Sytox green» trenger igjennom kompromitterte cellemembraner, typisk for døde celler, kan dette være en god indikator på andelen døde celler i en prøve. «Sytox green» farger nukleinsyrene (Tabell 4) (ThermoFisher). «Sytox green» farging er en vanlig metode for merking av celler innen biologisk forskning.

Gafario et al. (2002) brukte «Sytox green» til å farge *Escherichia coli* for å studere og kvantifisere fagocytose hos makrofager. Makrofagene ble først inkubert med merkede bakterier, og så analysert ved flow cytometri.

Et annet studie benyttet «Sytox green» merking for å teste bakterienes levedyktighet og sensitivitet overfor antibiotika (Roth et al., 1997). Målinger ved flow cytometri og fluorometri gjorde det mulig å skille levende fra døde *E. coli*, ettersom «Sytox green» var cellegjennomtrengelig i døde celler. Effekten av antibiotika kunne dermed bestemmes ved kvantifisering av innfarging.

For visualisering av levende bakterier i keratocytter ble derfor «BactoView» (Tabell 4) valgt, noe som gir rød fluorescensfarge. Denne fargen viste seg å fungere bra, som vist i figur 33 og figur 34.

For studie i DV-mikroskop ble det brukt «Sytox green» for synliggjøring av bakteriene i keratocytene. «CellMask™ Plasma Membrane Stain» ble benyttet til farging av keratocyttenes cellemembran, noe som ble gjort for å lokalisere bakteriene.

### **4.3 Opptak av bakterier i cellene studert ved holotomografi**

Ved eksponering av keratocytter og ASK-celler med fikserte bakterier, så det ut til at bakteriene ble tatt opp (internalisert) i cellene ved alle tidspunktene. Noen bakterier ble også observert ekstracellulært eller assosiert til lamellipodium. Siden bakteriene var farget med «Sytox green», var de lett å identifisere på grunn av deres grønne fluorescens (bruk av FITC-kanalen) i holotomografimikroskopet og ved bruk av Nanolive applikasjonen. Bakteriene opptrådte enkeltvis, i mindre eller større ansamlinger. Mange bakterier så ut til å befinne seg i ytre deler av cytosol, mens andre syntes å ligge nær cellekjernen. Likevel var det vanskelig å fastslå om bakteriene var intra- eller ekstracellulære. Det skyldtes først og fremst at Nanolive har begrenset oppløsning i Z-planet, noe som gjorde det usikkert å bestemme posisjonen til bakteriene i forhold til cellemembranen.

Tidligere masterstudier viser at det var utfordrende å fastslå om ulike typer av mikro- og nanopartikler har blitt internalisert eller ikke (Stette, 2022; Kjølstad & Svartaas, 2020; Heim, 2023). Stette (2022) gjorde undersøkelser i Nanolive, mens Kjølstad & Svartaas (2020) gjorde analyser i DV-mikroskop der de prosesserte mange bilder om til en 3D-prosjeksjon. Ved bruk av fluorescensfarging av lysosomene ga det inntrykk av at noen mikro- og nanoplastpartikler

var lokalisert nær lysosomene, og dermed muligens internalisert (Kjølstad & Svartaas, 2020). Heim (2023) brukte samme metode ved studie av ASK-celler, og sier at lokalisering av polystyren-partikler nær lysosomer gir en sterk indikasjon at partiklene ble tatt opp i cellen.

#### **4.3.1 *Vibrio anguillarum***

Etter at keratocytter og ASK celler ble eksponerte for inaktiverede *V. anguillarum*, viste mikroskopering at disse bakteriene var intra- og/eller ekstracellulære ved alle de analyserte tidspunktene (jfr. Figur 15 og Figur 29). Det var imidlertid vanskelig å avgjøre om de var internaliserte. Keratocytter tilsatt levende bakterier viste ved begge tidspunktene (3 og 24 timer) også en mulig internalisering (Figur 32 og Figur 33).

*V. anguillarum* opptrådte hovedsakelig enkeltvis, noe som ble observert både ved seriefortynninger av fikserte bakterier, samt mikroskopisk undersøkelse i kultur. Ut fra bakteriens karakteristiske stavform i prøvene gjorde at de var lett gjenkjennbare.

Det er tidligere gjort lite forskning på keratocyttenes evne til å ta opp *V. anguillarum*. Imidlertid ble det i ett studie på regnbueørret observert opptak av *V. anguillarum* i epitelceller i hud. Opptaket var avhengig av O-antigen på overflaten hos bakterien (Lindell et al., 2012).

#### **4.3.2 *Moritella viscosa***

Våre observasjoner gjort på keratocytter eksponert for formalinfiksede *M. viscosa*, viste at disse bakteriene var intra- og/eller ekstracellulære ved alle de analyserte tidspunktene, (Jfr. Figur 20 og Figur 22). I likhet med *V. anguillarum* var det vanskelig å bestemme om de var internaliserte eller membranassosierte. For keratocytter eksponert for levende *M. viscosa* i en time (Figur 35), så bakterier ut til å være ekstracellulære, oppå lamellipodium. Siden det kun ble gjort studie av levende *M. viscosa* med relativt kort eksponeringstid, er det vanskelig å si om lengre co-inkubasjon kunne medført et annet resultat. Ved seriefortynninger (Figur 11) av *M. viscosa* ble det observert en del klumping. Dette gjorde det noe mer utfordrende å velge en passende fortynning før tilsetning til celler. I Figur 23 ser en også tydelig at bakterier har klumpet seg i en av keratocytterne. Også Figur 35 av levende bakterier, viser klumping av *M. viscosa*.

Forsøk utført av Karlsen et al. (2012) viste at evnen til epidermal regenerering av keratocytter på hudoverflater der fiskeskjell var fjernet, ble påvirket eller hindret ved tilstedeværelse av *M. viscosa*. Det ble forklart ut fra keratocyttenes evne til å ta opp disse bakteriene var ineffektive. SEM-bilder viste at *M. viscosa* ble «forskjøvet» av keratocytterne som migrerte fremover, slik at de dannet små klumper eller hauger foran lamellipodium. Samtidig ble *Alivibrio wodanis* internalisert, som også var med i forsøket. Det kan tyde på at keratocytterne var spesifikke i hvilke bakterier de tok opp, eller at *M. viscosa* hadde egenskaper som gjorde at de i større grad unngikk å bli internalisert. Karlsen et al. (2012) antydte at dette kan skyldes en viskøs fenotype av *M. viscosa* (Lunder et al., 2000). Viskositeten kan være viktig i forhold til klumping av bakterien for å unnsnippe keratocyttenes rensing i form av opptak. Løvoll et al. (2009) rapporterer om en sen immunrespons hos laks infisert med *M. viscosa*. De antydte at denne bakterien bruker «maskeringsmekanisme» for å unngå immunsystemet. Keratocytterne kan migrere raskt fra sårkantene og dekke sårflaten med et beskyttende cellelag i løpet av timer etter at såret oppstod (Shephard, 1994). Ved lave temperaturer som gjenspeiler forholdene om vinteren, kan langsommere migrasjon og sårheling føre til at *M. viscosa* får tilstrekkelig tid til å kolonisere sårflatene på huden. Dette gjør fisken mer utsatt for infeksjoner. Dessuten fører lav vanntemperatur til at *M. viscosa* blir mer bevegelig og får en sterkere adhesjon (Tunsjø et al., 2007). Forsøket med eksponering av *M. viscosa* og ASK-celler var dessverre mislykket.

Basert på resultatene av dette studiet er det rimelig å anta at fikserte *V. anguillarum* ble tatt opp av keratocytter og ASK celler, mens det var usikkert om cellene tok opp *M. viscosa*.

### **4.3.3 *Vibrio salmonicida***

Forsøket med keratocytter og inaktive *V. salmonicida* viste at denne bakterien antagelig ble tatt opp i cellene, som vist i Figur 26 og Figur 27. Eksponering av keratocytter for levende bakterier (i 24 timer) viste sannsynligvis også en internalisering (Figur 34). Det var problematisk med dyrkning av ASK cellene, slik at vi ikke fikk gode bilder etter co-kultivering. Det fins ikke andre publikasjoner, så vidt jeg vet, som omhandler opptak av *V. salmonicida* i kultiverte keratocytter.

#### **4.3.4 *Aeromonas salmonicida***

Ved seriefortynning av *A. salmonicida* ble det observert en stor grad av klumping. Det gjorde det dermed usikkert om bakterien skulle brukes i forbindelse med forsøkene. Mot slutten av studiet, ble det likevel besluttet å prøve å eksponere ASK-celler med fikserte bakterier. Siden det oppstod problemer med dyrkning av ASK-celler ble dette forsøket også mislykket.

Tidligere studie av Åsbakk (2001) viste at epidermale «malpighian» celler (keratocytter) hos atlantisk laks tok opp *A. salmonicida*.

Dersom forsøkene med å tilsette *A. salmonicida* til cellene hadde vært vellykket, er det en mulighet for at bakteriene hadde blitt internalisert, siden dette er påvist i en tidligere studie.

### **4.4 Betydningen av resultatet**

Det er rimelig å anta at fikserte bakterier brukt i dette forsøket var internaliserte i keratocytterne og ASK-cellene. Det samme gjelder for keratocytter eksponerte for levende bakterier, med unntak av *M. viscosa*.

Det er imidlertid usikkert om opptak av både levende og inaktiverte bakterier skjer hos keratocytter hos fisk i sitt naturlige habitat, da epitelcellene er dekt av slimlag. Om fisken har fått sår eller at slimlaget har erodert vil slike celler bli stadig eksponert for patogene bakterier – noe som kan gi større sår dannelse dersom ikke bakterier er eliminerte eller uskadeliggjorte. Siden det er høy biomasse av fisk i oppdrett innenfor et begrenset område, er den generelt også mer utsatt for sykdomsfremkallende bakterier, samt kontinuerlig erodering av slimlag og hud. Det er da rimelig å anta at forsøk med keratocytter *in vitro* kan være med på å gjenspeile cellenes egenskaper *in vivo* for å håndtere bakterier.

### **4.5 Forslag til videre forskning**

Basert på resultatene av dette studiet er det rimelig å anta at bakterier har blitt internaliserte i keratocytter og ASK-celler. Tidligere studier på keratocytter har vist at de er i stand til å ta opp partikler og enkelte bakterier, mens ASK-celler ikke har vært mye brukt i slike studier. Det kan imidlertid ikke bekreftes med sikkerhet om bakterier er internalisert i cellene ved bruk av Nanolive og DV-mikroskop. Videre arbeid bør derfor inkludere bruk av elektronmikroskop (TEM i kombinasjon med immunmerking), som vil gi mer sikre observasjoner om hvorvidt bakteriene er tatt opp i cellene. Elektronmikroskopet benytter

elektroner i stedet for lys ved studie av objekter (forstørrelse: 1 million ganger), noe som gjør det mulig å studere cellestrukturer i detalj (Fysisk Institutt UiO, 2020). Videre vil det være viktig å studere hvilke forsvarsmekanismer keratocytterne benytter for å uskadeliggjøre patogener.

I dette studiet ble keratocytter kun eksponert for levende *M. viscosa* i én time. Det kan være interessant å studere opptak av bakterien ved lengre eksponeringstider, ettersom det i dette studiet ikke så ut til å være en internalisering av denne bakterien. Siden klassiske vintersår utgjør en av de største helseproblemene for norsk oppdrettslaks i dag, er hvordan keratocytter håndterer *M. viscosa* viktig å forske mer på i fremtiden.

Et annet forslag til videre forskning kan være å studere opptak, i detalj, av andre levende bakterier i keratocytter som for eksempel *Tenicibaculum*, ettersom fisken naturlig eksponeres for blant annet disse i sjøvannet. *Tenicibaculum* kan være med på å forårsake ikke-klassisk vintersår. I 2022 ble den regnet for å være på 6. plass over de største helseproblemene for norsk oppdrettslaks (jfr. Figur 1).



## 5 Konklusjon

Keratocytter og ASK-celler ble brukt i dette studiet for å studere opptak av ulike inaktiverede bakterier som kan forårsake hudsår hos oppdrettslaks. Bakteriene som ble benyttet var *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* og *A. salmonicida*. Det ble også tilsatt levende *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *V. salmonicida* til keratocytter. Eksperimentene ble utført ved å eksponere cellene for bakterier i ulike tidsperioder (24-96 timer), mens det for levende bakterier ble benyttet kortere eksponeringstid (1-24 timer). Til forsøkene ble det hovedsakelig brukt et holotomografisk mikroskop (Nanolive), mens DV-mikroskop også ble brukt i enkelte tilfeller. Bakteriene var på forhånd merket med fluorescens, slik at de lett kunne lokaliseres i cellene.

Basert på billedtaking og analyser så det ut til at bakterier var internaliserte i keratocytter og i ASK-celler. Et unntak var hvor keratocytter var eksponerte for levende *M. viscosa* (1 time). Det var vanskelig å fastslå med sikkerhet om bakteriene var internaliserte eller befant seg ekstracellulært.

## 6 Referanseliste

- Afewerki, S., Asche, F., Misund, B., Thorvaldsen, T. & Tvetenas, R. (2022). Innovation in the Norwegian aquaculture industry. *Rev Aquaculture*, 15(2), 759-771.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12755>
- Ambs, P., Huignard, J.-P. & Loiseaux, B. (2005). Holography. I F. Bassani, G.L. Liedl & P. Wyder (red.), *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*. ScienceDirect. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B0-12-369401-9/00610-0>
- ATCC (2023). ASK [Atlantic Salmon Kidney]:  
[ASK \[Atlantic Salmon Kidney\] - CRL-2747 | ATCC](#)
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E. & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71, 255-266. <https://doi.org/10.3354/dao071255>
- Bjørngen, H. & Koppang, E.O. (2022). Anatomy of Teleost Fish Immune Structure and Organs. I: Buchmann, K. & Secombes, J. (Red.). *Principles of Fish Immunology. From Cells and Molecules to Host Protection*. 1-30. Springerlink.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-85420-1\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-85420-1_1)
- Bruno, D.W., Noguera, P.A. & Poppe, T.T. (2013). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (2.utg.). Springer.
- Brown, G. & Wellings, S. (1970). Electron microscopy of the skin of the teleost, *Hippoglossoides elassodon*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 103(2), 149-169. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00337309>
- Bullock, A.M., Marks, R. & Roberts, R.J. (1978). Cell-kinetics of teleost fish epidermis—epidermal mitotic-activity in relation to wound-healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Zoology*, 185, 197–204.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1978.tb03296.x>
- Chakraborty, M., Mukherjee, B., Nalinakshan, N., Biswas, A., Nayak, R.K. & Sinha, B. (2022). Effect of heterogeneous substrate adhesivity of follower cells on speed and tension profile of leader cells in primary keratocyte collective cell migration. *Biology Open*, 11(3): bio058893.  
<https://journals.biologists.com/bio/article/11/3/bio058893/274641/Effect-of-heterogeneous-substrate-adhesivity-of>
- Chemi-Teknik (u.å.). Hentet 30.11.2023 fra  
<https://www.chemi-teknik.no/butikk/fikseringslosninger/prefylte/formalin-bufret-10-pk-20/>
- Cho, Z.H. (2003) Tomography. I R.A. Meyers (red.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (3.utg.). ScienceDirect. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00965-0>
- Cipriano, R.C. & Austin, B. (2011). Furunculosis and other aeromonad diseases. I: P.T. Woo & D.W. Bruno (red). *Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections* (2.utg.). CABI, Wallingford, 424-483.
- Collins, T.J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(1), 25-30.  
<https://doi.org/10.2144/000112517>
- Dupont, M., Souriant, S., Lugo-Villarino, G., Maridonneau-Parini, I. & Vérollet, C. (2018). Tunneling Nanotubes: Intimate Communication between Myeloid Cells [Mini Review]. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00043>
- Elliot, D.G. (2011). THE SKIN. Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes. I: A.P. Farrell (Red.). *Encyclopedia of Fish Physiology. From Genome to Environment* (1.utg.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00108-8>

- Esteban, M.A. (2012). An overview of immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 2012, 853470. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- Ferreira, T. & Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide. <https://imagej.net/ij/docs/guide/146.html>
- Fiskeridirektoratet (2022). Nøkkeltall for norsk havbruksnæring – publikasjon. <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Statistiske-publikasjoner/Noekkeltall-for-norsk-havbruksnaering>
- Fred, R. (2017). Fluorescence Microscopy, Applications. I Lindon, J.C & Koppenaal, D.W. (red.). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3.utg.). ScienceDirect. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3>
- Friedrich, R.P., Schreiber, E., Tietze, R., Yang, H., Pilarsky, C. & Alexiou, C. (2020). Intracellular Quantification and Localization of Label-Free Iron Oxide Nanoparticles by Holotomography Microscopy. *Nanotechnology, Science and Application*, 13, 119-130. <https://doi.org/10.2147/NSA.S282204>
- Franz, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B. & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34, 643–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Furevik, A., Haugen Tunheim, S., Heen, V., Klevan, A., Knutsen, L.E., Tandberg, J.I. & Gausdal Tingbo, M. (2023). New vaccination strategies are required for effective control of winter ulcer disease caused by emerging variant strains of *Moritella viscosa* in Atlantic salmon. *Fish and Shellfish Immunology*, 137, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108784>
- Gaforio, J.J., Serrano, M.J., Ortega, E., Algarra, I. & Alvares de Cienfuegos, G. (2002). Use of SYTOX Green Dye in the Flow Cytometric Analysis of Bacterial Phagocytosis. *Cytometry*, 48, 93-96.
- GE-Healthcare (2014). DeltaVision imaging system user manual. [https://cdn.southampton.ac.uk/assets/imported/transforms/content-block/UsefulDownloads\\_Download/F21A6D82AB864B598A07D487C756A92E/Delta%20Vision%20Elite%20User%20Manual.pdf](https://cdn.southampton.ac.uk/assets/imported/transforms/content-block/UsefulDownloads_Download/F21A6D82AB864B598A07D487C756A92E/Delta%20Vision%20Elite%20User%20Manual.pdf)
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P. & Ollevier, F. (1996). Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26(3), 181–187.
- Groff, J.M. (2001). Cutaneous biology and diseases of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 4, 321–411. [https://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30037-3](https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30037-3)
- Hasheminasab, S.S., Conejeros, I., Velásquez, Z.D., Borggreffe, T., Gärtner, U., Kamena, F., Taubert, A. & Hermosilla, C. (2022). ATP Purinergic Receptor P2X1-Dependent Suicidal NETosis Induced by *Cryptosporidium parvum* under Physioxia Conditions. *Biology*, 11(3), 442. <https://doi.org/10.3390/biology11030442>
- Heim, O. (2023). Uptake of Polystyrene Nanoplastic and its impacts on the Proteome of Salmonid Cells. Master's thesis in Marine Biotechnology (BIO-3901). UIT The Arctic University of Norway. <https://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/29530/thesis.pdf?sequence=2>
- Hoebe, R. A., Van Oven, C. H., Gadella, T. W. J., Dhonukshe, P. B., Van Noorden, C. J. F. & Manders, E. M. M. (2007). Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nature Biotechnology*, 25(2), 249-253. <https://www.nature.com/articles/nbt1278>
- Huber, F. (2012). Emergent structure formation of the actin cytoskeleton. Dissertation. Der Fakultät für Physik und Geowissenschaften der Universität Leipzig eingereichte.

- Imsol Image Solutions (2022). DeltaVision Elite.  
<https://www.imsol.co.uk/deltavision-elite/>
- Jensen, L.B., Wahli, T., McGurk, C., Eriksen, T.B., Obach, A., Waagbø, R., Handler, A. & Tafalla, C. (2015). Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1527–1543.  
<https://doi.org/10.1007/s10695-015-0105-2>
- Johansen, R., Olsen, A.B., Nilsen, A., Moen, A., Lillehaug, A., Jensen, B.B., Hjeltnes, B., Fritsvold, C., Colquhoun, D., Biering, E., Thoen, E., Bornø, G., Hansen, H., Nilsen, H., Skjelstad, H.R., Hellberg, H., Høgåsen, H., Ørpetveit, I., Lie, K.-I., Falk, K. ... Garseth, Å.H. (2012). Fiskehelse rapporten 2012.  
<https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2013/fiskehelse-rapporten-2012>
- Karlsen, C., Sørum, H., Willassen, N.P. & Åsbakk, K. (2012). *Moritella viscosa* bypasses Atlantic salmon epidermal keratocyte clearing activity and might use skin surfaces as a port of infection. *Veterinary Microbiology*, 154(3-4), 353-362.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.024>
- Karlsen, C., Thorarinnsson, R., Wallace, C., Saloni, K. & Midtlyng, P.J. (2017). Atlantic salmon winter-ulcer disease: Combining mortality and skin lacer development as clinical efficacy criteria against *Moritella viscosa* infection. *Aquaculture*, 473, 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.035>
- Keren, K., Pincus, Z., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Marriott, G., Mogilner, A. & Theriot, J.A. (2008). Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*, 453, 475-481.  
<https://doi.org/10.1038/nature06952>
- Kjølstad, E.M. & Svartaas, O.K.H. (2020). Keratocyttilignende celler fra hornhinne og hud hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Mikro- og nanoplast, mitokondriutveksling, fusjonering og celletunneler. Masteroppgave i Akvamedisin. UIT The Arctic University of Norway.  
<https://munin.uit.no/handle/10037/19278>
- Kryvi, H. & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*. Fagbokforlaget, Bergen.
- Lai, P. P., Alghamdi, R. A., Tomancak, P., Reynaud, E. G. & Shroff, H. (2017). Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature methods*, 14(7), 657-661.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4344>
- Lindell, K., Fahlgren, A., Hjerde, E., Willassen, N.-P., Fällman, M. & Milton, D.L. (2012). Lipopolysaccharide O-Antigen Prevents Phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 7 (5), e37678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037678>
- Liu, P.Y., Chin, L.K., Ser, W., Chen, H.F., Hsieh, C.-M., Lee, C.-H., Sung, K.-B., Ayi, T.C., Yap, P.H., Liedberg, B., Wang, K., Bourouina, T. & LePrince-Wang, Y. (2016). Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab on a Chip*, 16(4), 634-644.  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/lc/c5lc01445j>
- López-Osorio, S. (2020). Eimeriosis in ruminants: Large-scale epidemiological survey, isolation of a new *Eimeria zuernii* strain and novel data on *Eimeria* spp.-host cell interaction. Inaugural dissertation, University Giessen, Germany.
- Lunder, T., Evensen, Ø., Holstad, G. & Hastein, T. (1995). Winter ulcer in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(1), 39-49.  
<https://doi.org/10.3354/dao023039>

- Lunder, T., Sørum, H., Holstad, G., Steigerwalt, A.G., Mowinckel, P. & Brenner, D.J. (2000). Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 50, 427-450. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-427>
- Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C.R., Tunsjø, H.S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H. & Grove, S. (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* - pathogen invasion and host response. *Fish and Shellfish Immunology*, 26, 877-884. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.019>
- Magnadóttir, B. (2010). Immunological control of fish disease. *Marine biotechnology*, 12, 361-379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>
- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M. & El-Matbouli, M. (2016). Review: *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120, 49-68. <https://doi.org/10.3354/dao03006>
- Møllerstuen, I.L. (2020). Sår og sårheling hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) i RAS med sjøvannstilsetning og i tradisjonelle sjømerder. Masteroppgave i fiskehelse. Institutt for biovitenskap. Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet Universitetet i Bergen. <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/2718931>
- Nanolive Manual (u.å.): Hentet 15.mars 2023 fra <https://www.nanolive.ch/products/3d-microscopes/cx/>
- Okimura, C., Taniguchi, A., Nonaka, S. & Iwadate, Y. (2018). Rotation of stress fibers as a single wheel in migrating fish keratocytes. *Scientific Reports*, 8: 3565. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28875-z>
- Olsen, A.B., Gulla, S., Steinum, T., Colquhoun, D.J., Nilsen, H.K. & Duchaud, E. (2017). Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. *Veterinary Microbiology*, 205, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.028>
- Omsland, M., Bruserud, Ø., Gjertsen, B.T. & Andresen V. (2017). Tunneling nanotube (TNT) formation is downgraded by cytarabine and NF- $\kappa$ B inhibition in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget*, 8(5), 7946-7963. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13853>
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T.S., Gismervik, K. & Stien, L.H. (2019). Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Aquaculture*, 11, 1398-1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12299>
- Press, C.M. & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Rapanan, J.L., Pascual, A.S., Uppalapati, C.K., Cooper, K.E., Leyva, K.J. & Hull, E.E. (2015). Zebrafish keratocyte explants to study collective cell migration and reepithelialization in cutaneous wound healing. *Journal of Visualized Experiments*, 96: 524489. <https://doi.org/10.3791/52489>
- Ream, R.A., Theriot, J.A. & Somero, G.N. (2003). Influences of thermal acclimation and acute temperature change on the motility of epithelial wound-healing cells (keratocytes) of tropical, temperate and Antarctic fish. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4539-4551. <https://doi.org/10.1242/jeb.00706>
- Regjeringen (2021). Norsk havbruksnæring. <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/fiskeri-og-havbruk/1/oppdrettslaksen/Norsk-havbruksnaring/id754210/>
- Roberts, R.J. (2012). The bacteriology of teleosts. I: R.J. Roberts (red.). *Fish pathology* (4.utg.). Wiley-Blackwell, Oxford,, 330-382.

- Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T. & Millard, P.J. (). Bacterial Viability and Antibiotic Susceptibility Testing with SYTOX Green Nuclei Acid Stain. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2421-2431.  
<https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2421-2431.1997>
- Rottmann, R., Francis-Floyd, R., Durborow, R. (1992). The role of stress in fish disease.  
[https://www.mblaquaculture.com/content/downloads/articles/SRAC\\_Role\\_of\\_Stress.php](https://www.mblaquaculture.com/content/downloads/articles/SRAC_Role_of_Stress.php)
- Shephard, K.L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4, 401–429. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00042888>
- Stette, M.H. S. (2022). Nano- and microparticle interaction with corneal and epidermal keratocyte-like cells of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): High-resolution imaging using holotomography microscopy. Master's thesis in Aquamedicine. UIT The Arctic University of Norway.
- Southern Regional Aquaculture Center.  
[https://www.mblaquaculture.com/content/downloads/articles/SRAC\\_Role\\_of\\_Stress.php](https://www.mblaquaculture.com/content/downloads/articles/SRAC_Role_of_Stress.php)
- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Silva de Oliveira, V.H., Moldal, T., Bornø, G., Haukaas A. & Brun, E. (2023). Fiskehelse rapporten 2022. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelse-rapporten-2022>
- Sveen, L.R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Handeland, S. & Ytteborg, E. (2019). Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, 9: 3565. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39080-x>
- Svendsen, Y.S. & Bøgwald, J. (1997). Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 7, 317–325. <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1997.0087>
- Takle, H., Ytteborg, E., Vale Nielsen, K., Karlsen, C.R., Nilsen, H., Sveen, L., Colquhoun, D., Olsen, A.B., Sørum, H. & Nilsen, A. (2015). Sårproblematikk og hudhelse i laks- og regnbueørretoppdrett. Nofima Rapport 5.  
<https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/handle/11250/283167>
- Tosheva, K. L., Yuan, Y., Matos Pereira, P., Culley, S. & Henriques, R. (2020). Between life and death: strategies to reduce phototoxicity in super-resolution microscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53(16), 1630. <http://doi.org/10.1088/1361-6463/ab6b95>
- Tunsvø, H.S., Paulsen, S.M., Mikkelsen, H., L'Abée-Lund, T.M., Skjerve, E. & Sørum, H. (2007). Adaptive response to environmental changes in the fish pathogen *Moritella viscosa*. *Research in Microbiology*, 158(3), 244–250.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.014>
- Veterinærinstituttet (2023, 02.03). Furunkulose.  
<https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/furunkulose>
- Veterinærinstituttet (u.å.). Klassiske vintersår. Hentet 5.september 2023 fra  
<https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/klassiske-vintersar>
- Veterinærinstituttet (u.å.). Tenacibaculose. Hentet 28.november 2023 fra  
<https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/tenacibaculose>
- Zhu, L., Rajendram, M. & Huanq, K.C. (2021). Effects of fixation on bacterial cellular dimensions and integrity. *iScience*, 24(4), 102348.  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102348>
- Åsbakk, K. (2001). Elimination of foreign material by epidermal Malpighian cells during wound healing in fish skin. *Journal of Fish Biology*, 58, 953–966.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00547.x>

Åsbakk, K. & Dalmo, R.A. (1998). Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) epidermal Malpighian cells – motile cells clearing away latex beads in vitro. *Journal of Marine Biotechnology*, 6(1), 30-34.

## Appendiks A

Tabell 5: Viser en oversikt over kjemikalier brukt i forbindelse med dette studiet i tillegg til leverandør/produsent, samt produktnr/katalognr.

Kjemikalier	Leverandør/produsent	Produktnummer/katalognr.
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)-miks	Corning Life Science	21-022-CM
Streptomycin	Sigma-Aldrich	A2942
Penicillin	Sigma-Aldrich	P0781
Amphotericin	Sigma-Aldrich	A2942
Leibovitz`s L-15 medium	Gibco™	11415064
L-15 media uten fenolrødt	Thermo Fisher Scientific	21083027
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest	S181B500
Blodagar med 2% NaCl	Veterinærinstituttet	
Phosphate-buffered Saline (PBS)	Biowest	LO615-500
Trypsin	Thermo Fisher Scientific	252000056
Formalin (4% formaldehyde)	Chemi-Teknik as	CHE/BAF-6000-08A
0,9 % NaCl	Sigma-Aldrich	S9888
Sytox™ green	Thermo Fisher Scientific	S7020
Sytox™ orange	Thermo Fisher Scientific	S11368
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Thermo Fisher Scientific	D1306
Hoechst	Thermo Fisher Scientific	62249
BactoView™ Live Fluorescent Bacterial Stains	Biotium	40101-T
CellMask™ Plasma Membrane Stains	Thermo Fisher Scientific	C10045
MONO-Vs agglutinasjonstest	Bionor Laboratories AS	DF020



MONO-Mv agglutinasjonstest	Bionor Laboratories AS	DQ020
MONO-Va agglutinasjonstest	Bionor Laboratories AS	DE020

