

Simen Muhle Steen Jensen, Vegard Neverdal
Loen, Amund Vevelstad

Utvikling av en effektiv metode for registrering av lakseluslarver i ferske planktonprøver

Bacheloroppgave i Biomarin Innovasjon
Veileder: Stig Atle Tuene & Lars Christian Gansel
Mai 2021

Simen Muhle Steen Jensen, Vegard Neverdal Loen,
Amund Vevelstad

Utvikling av en effektiv metode for registrering av lakseluslarver i ferske planktonprøver

Bacheloroppgave i Biomarin Innovasjon
Veileder: Stig Atle Tuene & Lars Christian Gansel
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Oppgaven tar for seg problematikken med telling av lakselus i frie vannmasser, datagrunnlag for lakselus og validering av trafikklyssystemet. Vi har utviklet en effektiv metode for registrering av lakseluslarver i planktonprøver ved hjelp av maskinlæring og bildegjenkjenning av lakseluslarver i naupliestadiet.

Denne metoden fungerer som et “flow” system hvor væske med plankton pumpes i jevn strøm over en renne. Der vil alt av plankton som kommer forbi bli tatt opp i video og eventuelle lakseluslarver bli kjent igjen av bildegjenkjenningen. Ved bruk av denne metoden blir konsentrerte vannprøver analysert med en hastighet på 15 ml/minuttet og det nevralt nettverket gjenkjente 98,41 % av luselarvene. Menneskelige ressurser kan dermed brukes til å telle registreringene, i stedet for å lete etter luselarvene.

Resultatene viste også en gjennomsnittlig identifiseringssikkerhet av lakseluslarver på 92,98%. Det er benyttet kunstige prøver med plankton og nauplielarver (lakseluslarver), avlivet ved bruk av sprit, i forkant av analysene. Med optimal konsentrasjon på vannprøvene vil man pumpe 26 plankton i sekundet, og kan dermed gå gjennom 93600 plankton i timen sammenlignet med tradisjonell telling i mikroskop der tilsvarende mengde plankton kan ta 3-4 døgn. Det er behov for videre forskning med reelle planktonprøver og trening med lakselus i copepodittstadiet, som med tilrettelagt trening av AI forhåpentligvis kan gi lignende resultat. Effektiv registrering av lakselus i planktonprøver med AI og bildegjenkjenning vil kunne benyttes for å validere trafikklyssystemet ved å registrere antall lakseluslarver i viktige områder langs norskekysten.

Abstract

This thesis addresses the challenges associated counting salmon lice larvae in plankton samples, data of salmon louse and validation of the traffic light system. We have developed an effective method for registering salmon lice larvae in plankton samples by using deep learning and object recognition of the nauplii stage of salmon lice.

The method works as a flow system, where fluids with plankton is pumped in a steady flow through a thin chute. All the plankton passing the digital camera will be filmed, and the film is then processed by a neural network trained to recognize salmon lice larvae. Using this method, concentrated water samples containing plankton, gets analyzed at speed of 15ml/min. The neural network recognized 98,41% of the salmon lice larvae. Human resources can therefore be used to count recognitions instead of searching for manually for lice.

The results also showed an average identification certainty of salmon lice larvae of 92.98%. Artificial samples with plankton and nauplii larvae (salmon lice larvae), killed using alcohol, were used prior to the analyzes. With optimal concentrated water samples, this method will pump 26 plankton per second, and can thus go through 93600 plankton per hour compared to traditional counting under a microscope, where the corresponding number of plankton can take 3-4 days. There is a need for further research with real plankton samples and training with salmon lice in the copepodite stage, which with adapted training of the AI can hopefully give similar results. Effective registration of salmon lice in plankton samples with AI and image recognition can be used to validate the traffic light system by registering the number of salmon lice larvae in important areas along the Norwegian coast.

Forord

Vi er tre studenter som studerer Biomarin Innovasjon ved NTNU Ålesund. Vår Interesse for oppdrettsnæringen og næringens problemer når det kommer til lakselus har hatt stor innflytelse på vårt valg av bacheloroppgave. Opprinnelig var planen å skrive en oppgave som omfattet hvilke sjikt lakselusen befinner seg i, men vi kom etter hvert inn på å heller skrive om metoder for lusetelling i frie vannmasser. Etter å ha satt oss inn i utfordringene som finnes i sammenheng med lusetelling i frie vannmasser i dag, kom vi til slutt frem til vår endelige problemstilling, *«Utvikling av en effektiv metode for registrering av lakseluslarver i ferske planktonprøver»*

Bacheloroppgaven har blant annet blitt preget av Covid-19 restriksjoner på campus og et uheldig strømbrudd i kjølerommet på NTNU som førte til massedød av våre lakseluslarver. Dette har medført at ting har tatt lengre tid enn planlagt, men med iherdig jobbing og pågangsmot har vi kommet i mål med oppgaven til slutt.

Vi ønsker å takke våre veiledere Stig Atle Tuene og Lars Christian Gansel for god oppfølging og veiledning gjennom hele arbeidet med oppgaven. Vi har fått god hjelp både når det kommer til innhenting og dyrking av lakselus, og til utvikling av selve metoden. Vi må også rette en stor takk til PhD. kandidat Maximiliano Crescitelli som har stått for maskinlæringen, og gjort vår oppgave mulig å gjennomføre. I tillegg ønsker vi å takke oppdrettsanleggene på Gjerset, Furneset og Gjermundnes for tilgang på lakselus

Innhold

1 Innledning	1
1.1 Lakselus biologi	1
1.2 Datagrunnlag for lakselus	3
1.3 Metoder for lusetelling i frie vannmasser	5
1.4 AI (dyp læring)	6
1.5 Vitenskapelige artikler om gjenkjennelse ved bruk av dyp læring	6
1.6 Problemstilling	7
1.7 Hypoteser	7
2 Materiale og metoder	8
2.2 Innsamling og dyrking av lus	8
2.3 Innhenting av plankton	11
2.4 Mikroskop	12
2.5 Kamera	14
2.6 Utvikling av foto- og videorigg	15
2.7 Trening av maskinlæring	17
2.8 Testing av maskinlæring	19
2.9 Ekstrahering av resultater	19
3 Resultat	21
3.1 Innsamling og dyrking av lakselus	21
3.2 Maskinlæring og gjenkjenning	21
3.2.1 Resultat fra testvideo 1	21
3.2.2 Resultat fra testvideo 2	24
4 Diskusjon	27
4.1 utfordringer med dagens modeller	27
4.2 utfordringer med metoder for telling av lakselus i vannprøver fra felt	28
4.3 Vår metode sammenlignet med andre metoder	28
4.3.1 Estimert tidsbruk med studiets utviklede metode sammenlignet med andre	29
4.4 Forbedringspotensialer	30
4.5 Bilde eller video – fordeler og ulemper	32
4.6 Deteksjonsgrad	32
4.7 Identifiseringssikkerhet	33

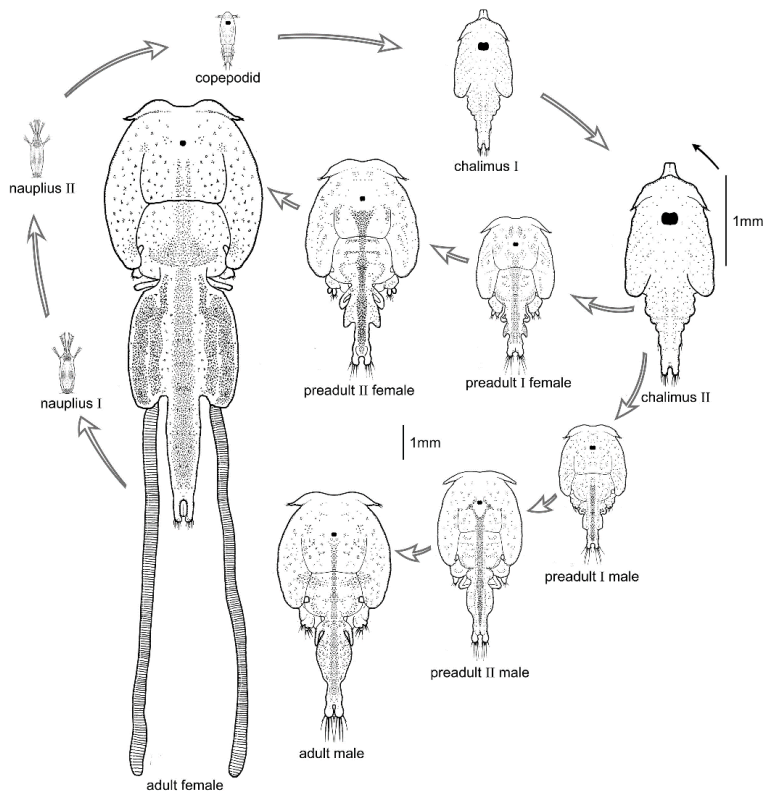
4.8 Falske positive resultater	33
5 Konklusjon	35
6 Referanser og kilder	36

1 Innledning

Norsk oppdrettsnæring har vokst kraftig de siste tiårene og Norge er det landet som eksporterer flest oppdrettslaks i verden (Miljødirektoratet, 2021). Siden 2009 er verdien av lakseeksporten mer enn tredoblet og samlet eksportverdi av laks var i 2019 på 72,5 milliarder kroner (Steinset, 2020). Etter hvert som oppdrettsnæringen har vokst har det blitt en oppblomstring av lakselus som har skapt utfordringer både for oppdrettsnæringen og oppdrettslaksen, både økonomisk og for fiskevelferden. I 2018 ble det solgt laks til en verdi av 64,5 milliarder kroner (Fiskeridirektoratet, 2019) og samme år ble det brukt over 5,2 milliarder kroner direkte knyttet til håndtering av lakselus (Ilaks, 2019). Sammenlignet med andre utfordringer i oppdrettsnæringen, som rømning av laks, er kostnadene for rømning veldig små i forhold til lusekostnader (Fiskeridirektoratet, 2021). Antall rømte laks var i 2018 159.105 laks og det kostet SalMar i 2011 ved rømning av 176 000 laks 10 millioner kroner (Aarhus, 2011). Spredning av lakselus har ført til at villaks og sjøørret har blitt mer utsatt for parasitten. I 2010-2014 var det beregnet årlige tap på 50 000 villaks grunnet lakselus, noe som tilsvarer 10% tap av villaksen (Havforskningsinstituttet, 2019). Grunnet alle disse komplikasjonene som følge av lakselus er det derfor skrevet en forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg. Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg har som formål: *“å redusere forekomsten av lakselus slik at skadevirkningene på fisk i akvakulturanlegg og i viltlevende bestander av laksefisk minimaliseres, samt redusere og bekjempe resistensutvikling hos lakselus”* (Nærings- og fiskeridepartement, 2018).

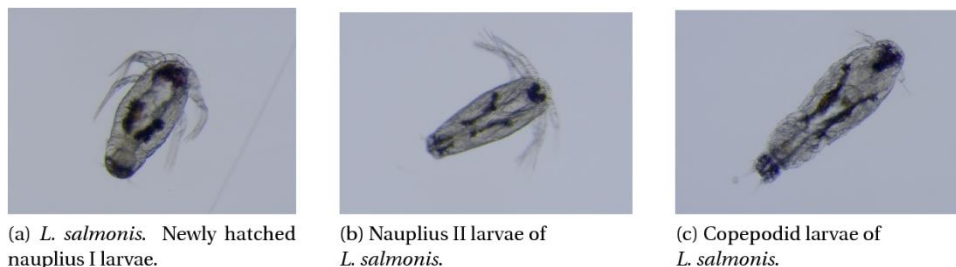
1.1 Lakselus biologi

Lepeophtheirus salmonis, også bedre kjent som lakselus er en ektoparasitt, det vil si at den lever på overflaten av den infiserte verten (Hamre, 2009). Den fullvoksne lusa ernærer seg på fiskens skinn og blod, noe som forårsaker stress og skader på fisken, og i verste fall infeksjoner og død (Hamre, 2009).



Figur 1. Livssyklus lakselus (Havforskningsinstituttet, 2020)

Lakselusens livssyklus består av hele 8 stadier (Figur 1). De første 2 stadiene er planktoniske naupliuslarver, hvor det tredje er copepoditt stadiet til lakselusen. I copepoditt stadiet går lakselusen fra å være frittsvømmende til parasittisk når den finner sin vert (Marine Institute, 2020). De siste fem stadiene er chalimus I og II, etterfulgt av preadult I og II, før det endelige fullvoksne stadiet. De siste 5 regnes som parasittiske stadier. Det er de fullvoksne lusene av hunnkjønn som produserer eggene, og bærer på ca. 1000 egg hengende i et par eggstrenger (Hamre, 2009). Disse eggene henger i eggstrenger på hunnlusen helt til eggene klekkes. Da flyter luselarvene i de frie vannmassene som nauplius. Kjønnfordelingen til lusene er 1:1. (Hamre, 2009)



Figur 2. Nauplius og copepoditt stadiene (Ingebrigsten, 2017)

I nauplius og copepoditt stadiene (Figur 2) er lusen planktoniske som vil si at de driver med havstrømmene og ikke kan bestemme hvor de selv skal svømme. De har derimot mulighet til å svømme vertikalt til en viss grad (Nelson, 2017). Nauplius larven lever av eget fett reserve før de etter 130 døgngrader går over fra nauplius til copepoditt stadiet (Marine Institute, 2020). Det vil for eksempel si 10 dager ved 13 grader i vannet. I copepoditt stadiet er lusa avhengig av å finne seg en vert for å overleve og vil feste seg på skinnen til laksen, hvor den blir sittende fast mens den vokser (Marine Institute, 2020). Copepoditten er 0,8 mm og vil etter hvert skifte skall når den vokser (Marine Institute, 2020). Lusen vil under alle skallskift holde seg fast på verten (Marine Institute, 2020). Undersøkelser om nauplius og copepoditt stadier i frie vannmasser vil kunne si noe om smittepress og lusenivå i fjordene. (Havforskningsinstituttet, 2019) Etter copepoditt stadiet går den over til Chalimus 1 og 2 hvor lusa er fastsittende. Etter Chalimus stadiene går lusa over til to preadulte stadier (preadult 1 og 2) før lusa er fullvoksen (adult stadiet). Her vil ikke lusa sitte fast lengre og den vil kunne bevege seg rundt på fisken (Marine Institute, 2020).

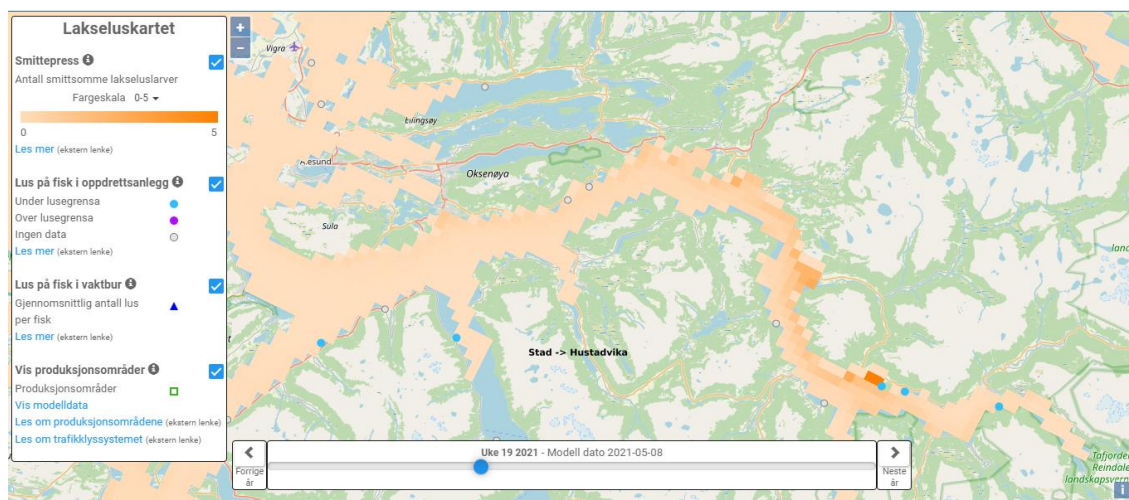
1.2 Datagrunnlag for lakselus

Datagrunnlag for lakselus blir estimert og modellert etter telling av lakselus fra oppdrettsanlegg, samt fysiske forhold i miljøet som påvirker spredning (Havforskningsinstituttet, 2019).

Trafikklyssystemet reguleres etter påslag av lus på vill laksefisk og det settes ulike farger for alvorlighetsgrad av lusepåslag, grønt (lavt lusepress), gult (moderat lusepress) og rødt (alvorlig lusepress) (Havforskningsinstituttet, 2021). Det er derimot manglende dokumentasjon på endring i antall lus på oppdrettsanleggene forbundet med lusepåslag hos vill laksefisk. Det er derfor viktig å kunne validere disse modelleringene og dokumentere hvor mye lakselus det befinner seg i

vannmassene. I det siste har oppdrettsnæringen sett seg nødt til å kutte i produksjonen pga. trafikklyssystemet som er satt i verk for å kontrollere lakselus situasjonen (Kyst.no, 2021). 25 oppdrettere fra Vestlandet gikk til søksmål mot Nærings- og fiskeridepartementet grunnet påslag om å redusere biomassen som følge av trafikklyssystemet (Kyst.no, 2021).

Havforskningsinstituttet har utarbeidet modell for å kartlegge lusepress og spredning av smittsomme lakselus (Sandvik, 2017). BarentsWatch bruker disse dataene for å utvikle et informasjonssystem og overvåkingssystem (BarentsWatch, 2018). Ut ifra kunnskap om overvåking, smittepress og hvordan lakselusa sprer seg har havforskningsinstituttet utarbeidet et lakseluskart (Figur 3) (Havforskningsinstituttet, 2021). Lakseluskartet har en fargeskala for smittepress med antall smittsomme copepoditter. Den går fra lys brun/gul (lavt smittepress) til mørk oransje/rød (høyt smittepress). Lus på fisk i vaktbur benyttes for å vurdere smittepress i området.



Figur 3. Havforskningsinstituttet lakseluskart (Havforskningsinstituttet, 2021)

Nelson *et al.*, (2017) tar for seg horisontal og vertikal fordeling av lakselus inne i og rundt oppdrettsanlegg i Bay of Fundy, Canada. Disse forsøkene ble gjennomført over 5 år med 1521 planktonprøver hvor volum av prøvene varierte fra 200 – 2000L (Nelson, 2017). Lakselus ble fanget opp ved bruk av plankton håv og plankton pumpe. Majoriteten av lakselus som ble fanget opp var nauplius (93%) som ble preservert og telt under et disseksjonsmikroskop. Larvene ble funnet å ha en syklus med å befinne seg i dypere vann, rundt 10-17 meters dyp om dagen og på

overflatevann, rundt 1-6 meters dyp om natten. Dette er noe som indikerer på at luselarver kan bevege seg vertikalt og holde seg rundt anlegget og skape en selvstående populasjon. (Nelson, 2017)

1.3 Metoder for lusetelling i frie vannmasser

Innhenting av planktonprøver gjøres hovedsakelig ved bruk av vertikal eller horisontal planktonhåv. Planktonhåven kan enten trekkes vertikalt eller ved at den tråles. Der blir strømhastighet, lengde og kubikkmeter på planktonhåv regnet sammen for å kalkulere hvor mange m³ med frie vannmasser som er filtrert med planktonhåven. Det er også mulig å benytte seg av pumpe for å pumpe vannmasser gjennom planktonhåven. Deretter lagres det normalt i alkohol, 70-96%, før det tas videre til lab for lusetelling (Uglem, 2018). Å finne lakselus i frie vannmasser er som å finne “nåla i høystakken”, og det må store vannmasser til for å finne lakselus. Tradisjonell telling i mikroskop og andre metoder for lusetelling i planktonprøver er for tidkrevende, unøyaktig eller med for høye kostnader. (Bui, 2021)

Når det kommer til metoder for lusetelling fra planktonprøver i frie vannmasser, er det tradisjonelt blitt brukt manuell telling i stereomikroskop (Bui, 2021). Først filtreres de uønskede størrelsene av planteplankton, dyreplankton og makroalger ut, før planktonprøvene undersøkes i tellekammer med mikroskopet. Det kreves gode kunnskaper om lakselusa. PCR er en metode som utfører genetisk analysing av DNA. PCR står for polymerasekjedereaksjon og er en metode som kopierer opp arvestoffet (Fossum, 2021). Dette kan da benyttes for å finne ut hvor mange luselarver det er i en prøve om det er kjent hvor mange DNA-kopier en luselarve innebærer. Fluorescerende lys benyttes ved å finne lakselusas unike fluorescens-profil. Denne metoden vil man kunne benytte for å enklere kunne finne lakselus i fikserte langtidslagrede planktonprøver. Lakselusa vil da lyse opp i forhold til resten av planktonprøven. “Automated fluid imaging” er en metode som bruke ved å ta digitale bilder gjennom et flowcytometer. Flowcytometri benyttes for å telle eller sortere celler i en løsning (Kierulf, 2018). Væske med partikler strømmer kontinuerlig forbi glasset i flowcytometeret hvor kamera med mikroskopobjektlinse tar bilder jevnlig. I forbindelse med en lysstråle blir silhuetten til de ulike partiklene fanget opp. Deretter blir bildene analysert og sortert ved hjelp av programmer og til

slutt analysert av en ekspert med lakselus erfaring for å være sikker på at det er lakselus. (Bui, 2021)

1.4 AI (dyp læring)

Dyp læring er en avansert teknikk for kunstig intelligens, og er en undergruppe av maskinlæring. Datamaskiner blir konfigurert til å utføre oppgaver gjennom erfaring. De klassiske, eller tradisjonelle, AI-systemene jobber ut ifra et sett med regler som er gitt, og som maskinen må jobbe ut ifra. Ved dyp læring vil maskinlæringssystemet utvikles gjennom å behandle kommenterte eksempler. Dette kalles gjerne for trening. Tradisjonelle maskinlæringsalgoritmer løser mange problemer som regelbaserte programmer må behandle, men de kan ikke håndtere data som bilder, video og lydfiler. Ved å bruke et nettverk av variabler som tilpasser seg egenskapene til dataene de har blitt trent på. Dette kalles konvolusjonelle nevrale nettverk (CNN). Et slikt nevrale nettverk kan finne vanlige mønstre i ustrukturerte data som lyse og mørke flekker, kanter i ulike størrelser og vinkler. Dyp læringsalgoritmer kan ved hjelp av slike nevrale nettverk lære å kjenne igjen funksjoner og kjennetegn på objekter på bilder. (Sannsyn, 2020)

1.5 Vitenskapelige artikler om gjenkjennelse ved bruk av dyp læring

En vitenskapelig artikkel fra 2018 omhandler nevrale nettverk også kalt CNNs (Convolutional Neural Networks) sammen med bruken av bildeanalyse og gjenkjenning av phytoplankton. Det blir brukt et verktøy som heter "FlowCAM". Dette verktøyet kombinerer digital bildebehandling, strømmningscytometri og mikroskop i et og samme verktøy. Sammen med maskinlæring og et nevralt nettverk, kartlegges og gjenkjennes det forskjellige phytoplankton i vannprøver fra den belgiske delen av Nordsjøen. (Lloret, 2018)

Cheng *et al.* (2019) beskriver problematikken av å prosessere store antall med bilder av plankton. De har derfor utviklet et automatisk bilgjenkjenningssystem med opptelling av antall plankton ved bruk av konvolusjonelle nevrale nettverk (CNN) og sett på ulike nettverksstrukturer for automatisk klassifisering av planktonbilder. Ut av CNN modellene gav ResNet50 best resultat

med en nøyaktighet og gjenkjennelse på 94.52% og 94.13%. Studiet demonstrerer at dyp læring kan forbedre gjenkjenning av plankton i planktonbilder. (Cheng, 2019)

González *et al.* (2019) beskriver viktigheten av å studere marine plankton data for å kontrollere helsen til verdens hav. I de siste årene har avansert maskinlæring med nevralt nettverk blitt utviklet. Artikkelen beskriver hvordan konvolusjonelle nevralt nettverk kan ta over for tradisjonelle metoder for å estimere utbredelse av plankton i vannprøver. De har designet et sett av eksperimenter for å vise hvor effektiv dyp læring kan være når en jobber med en kombinasjon av dagens kvantifiseringsalgoritmer. (González, 2019)

En annen vitenskapelige artikkel beskriver gjenkjennelser av malaria i mikroskop på tykke blod bilder ved bruk av dagens «state-of-the-art object detector» YOLOv4 og YOLOv3 modeller. Artikkelen drar frem hvordan dyp læring og bruk av AI kan erstatte tradisjonell undersøkelse av malaria i blodet. Den beste YOLOv4 modellerte modellen hadde en gjenkjennelse på 94 prosent og identifiseringssikkerhet/presisjon på 95%. (Abdurahman, 2021)

1.6 Problemstilling

Utvikling av en effektiv metode for registrering av lakseluslarver i ferske planktonprøver.

1.7 Hypoteser

Hypotese: Ved bruk av maskinlæringsprosess og gjenkjenning av lakseluslarver kan en få gjenkjenningsgrad på over 90%.

Denne hypotesen er utviklet ut fra et forsøk gjennomført med maskinlæring og gjenkjenning av malaria i blodprøver med en gjenkjenningsgrad. Noe som i teorien er mer komplisert å gjøre enn å gjenkjenne lakseluslarver i planktonprøver. I tillegg er det brukt samme nevralt nettverk som skal benyttes i denne oppgaven.

2 Materiale og metoder

Materiale og metoder består av innsamling og dyrking av lys, innhenting av plankton, innstilling av lys og bilde til videografering, fiksering av planktonprøver, bilde/videotaking til trening av dyp læring (YOLOv4) og utvikling og testing av automatisert metode ved bruk av dyp læring.

2.2 Innsamling og dyrking av lus

Gjerset (62°31'53.4»N 6°25'41.5»E)

På lokaliteten Gjerset ble den kjønnsmodne lakselusen samlet inn under lusetelling 05.02.2021. Sjøtemperatur denne dagen var 6,6°C ved 5 meters dyp, og fisken ble bedøvet i 1000l kar. Lakselusen ble plukket med pinsett fra fisken og direkte over i en stor bønne med sjøvann tatt fra overflaten (Figur 4). Bøtten ble satt lokk på og satt i en isoporkasse med kjøleelement for å beholde temperaturen. Lakselusen ble fraktet til NTNU, og ble satt inn på kjølerom på etter 50 minutter fra den ble fjernet fra fisk. Eggstrengene ble fjernet fra lakselusen med pinsett, og ble så sortert etter farge. Lyse eggstrenger og mørke eggstrenger for seg. Dette ble gjort da de mørkere eggstrengene var nærmere klekking enn de lyse. De sorterte eggstrengene ble lagt i to erlenmeyerkolber med filtrert sjøvann, med en salinitet på ca. 30 promille (Figur 5). Det ble så lagt luftslanger ned i Erlenmeyerkolbene for å sikre god sirkulasjon og oksygen i vannet.



Figur 4. Plukking av lakselus med eggstrenger.



Figur 5. Bilde av luselarver og eggstrenger i glasskolbe på laboratorium

På grunn av en metallklemme, brukt for å holde luftslangene på plass i erlendmeyerkolbene, som viste seg å være i stål, utviklet det seg rustpartikler i vannet (Figur 6). Luselarvene og de resterende eggstrengene ble filtrert ut, og satt i nytt rent sjøvann. Det ble tatt i bruk noen rustfrie muttere for å holde slangene på plass.



Figur 6. Bilde av glasskolber med luselarver utsatt for rustpartikler fra metallventil

Det ble satt opp en batch nummer to med luselarver fra Gjerset, med samme utførelse. Denne batchen døde dessverre helt ut før man kunne ta den i bruk, grunnet kjølerommet på NTNU Ålesund streiket over en helg og økte til en temperatur på 28 °C.

Furneset (62°38'41.7»N 7°06'04.6»E)

Lakselusen fra Furneset ble plukket fra fisk under lusetelling av de ansatte på lokaliteten 22.03.2021. Sjøtemperatur denne dagen var 4,8°C ved 5 meters dyp. Fisken ble bedøvet, og den kjønnsmodne lusen ble plukket fra fisken under telling. Lusen ble fraktet i en 5l vandunk uten noe form for isolering. Etter endt arbeidsdag ble lusen overrakt, og den ble tatt med til privat hjem. Dette ble gjort grunnet NTNU campus var stengt som følger av covid-19 restriksjoner. Alt nødvendig utstyr var på forhånd flyttet fra NTNU. Fra lusen ble plukket av fisken, til den ble satt i kjøleskap gikk det omtrent 7 timer. Deretter ble eggstrengene fjernet fra lusen med pinsett, og eggstrengene sortert etter farge. Lyse eggstrenger for seg og mørke eggstrenger for seg. Dette ble gjort da de mørkere eggstrengene var nærmere klekking enn de lyse. De sorterte eggstrengene ble lagt i to erlenmeyerkolber med filtrert sjøvann, med en salinitet på omtrent 30 promille. Det ble så lagt luftslanger ned i Erlenmeyerkolbene for å sikre god sirkulasjon og oksygen i vannet.

Gjermundnes (62°37'33.1»N 7°11'24.6»E)

Lus fra Gjermundnes ble plukket fra fisk under lusetelling 30.04.2021. Sjøtemperatur denne dagen var 6,2°C ved 5 meters dyp. Lusen ble plukket før fisken gikk ned i bedøvelse. Dette ble gjort for å unngå at lakselusen skulle eksponeres for bedøvelse. Lakselusen ble fraktet fra anlegget i en flaske med vann med salinitet på omtrent 30 promille. Flasken ble transportert i en isoporkasse fylt med snø for å bevare sjøtemperaturen. Fra lakselusen ble plukket fra fisk, til den var satt i kjøleskap tok det omtrent 4 timer. Eggstrengene ble fjernet fra lakselusen og sortert i erlenmeyerkolber etter farge. De ble tilsatt luftslanger til erlenmeyerkolbene før det ble satt i et kjøleskap og tilsatt lys.

2.3 Innhenting av plankton



Figur 7. Innhenting av plankton

Innhenting av plankton ble gjort ved å bruk av en planktonhåv med horisontal trekk, hvor det samlet seg plankton nederst i glass kjeglen (Figur 7).

Disse ble så filtrert ved å benytte et filter med 500 μm størrelse for å få bort større plankton og alger. Deretter ble det så filtrert med et filter med 180 μm størrelse for å få bort mindre uønskelige partikler. På denne måten står man igjen med størrelse av plankton lik luselarven. Planktonet ble overført over i en beholder og tatt med hjem for videre bruk av miksing med lakselus til å lage videoer. Det ble hentet inn plankton både fra Volsdalsberga (62°28'05.6»N 6°11'57.1»E) og utenfor lokalitet på Myrane (62°38'58.9»N 6°43'58.8»E).

2.4 Mikroskop

Gjennom de ulike forsøkene er det benyttet mikroskopet Leica Wild M8 sammen med et LM scope c-mount. Dette gir muligheten for å montere speilreflekskamera og bruke mikroskopet som objektiv (Figur 8). Leica Wild M8 kan operere med en forstørrelse på 6x til 50x. Med høy forstørrelse vil man kunne se mange små detaljer som kan gjøre karakteristikkgjennkjenningen lettere (Figur 9). Man kan tydelig se karakteristika på luselarven, men arealet som man får observert blir veldig lite. 6x forstørrelse vil observere og dekke et større areal per bilde. Man får med en slik forstørrelse et stort observasjonsfelt, men detaljene blir litt små og vanskelige å se (Figur 10). Ved 9x forstørrelser man flere detaljer enn ved 6x forstørrelse, samtidig som man fortsatt har et stort observasjonsareal. På undersiden av objektbordet finner man et vendespeil med to sider, et blankt speil (Figur 11), og et matt hvitt speil (Figur 12). Begge sider ble testet belyst med et hvit ledlys, og det ble besluttet å gå videre med det matte speilet.

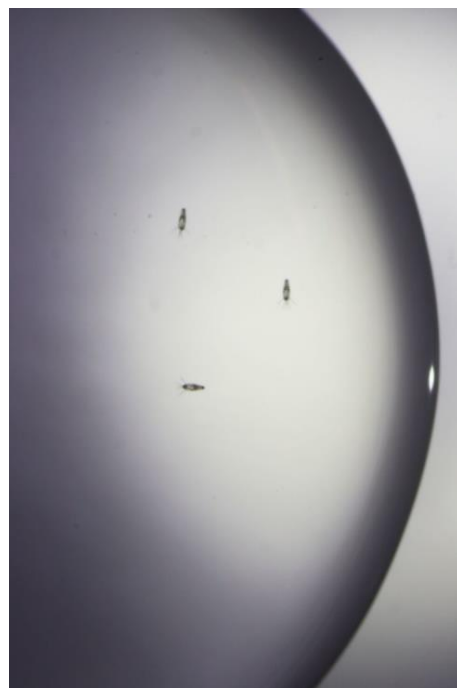


Figur 8. Oppsett med mikroskop og kamera

Figur 9. Naupliuslarve fotografert med 50x forstørrelse



Figur 10. 3 naupliuslarver fotografert med 6x forstørrelse



Figur 11. Naupliuslarve i 9x forstørrelse, belyst med et hvitt led lys reflektert i et blankt vendespeil på undersiden av objektbordet



Figur 12. Naupliuslarve i 9x forstørrelse, belyst med et hvitt led lys reflektert i et blankt vendespeil på undersiden av objektglasset.



2.5 Kamera

Gjennom dette prosjektet er det benyttet et Canon EOS 80D speilreflekskamera (Figur 13 & Figur 14) for foto- og videografering. Det ble tatt bilder av luselarvene, og eksperimenterer med innstillingene på kamera. Lukkehastigheten ble satt til auto, for å oppnå lavest mulig lukkehastighet. ISO ble satt til 400. Hvitbalanse ble satt til «white fluorescent light» for å håndtere det hvite lyset fra ledlykten.



Figur 13. *Canon EOS 80D*
mikroskop



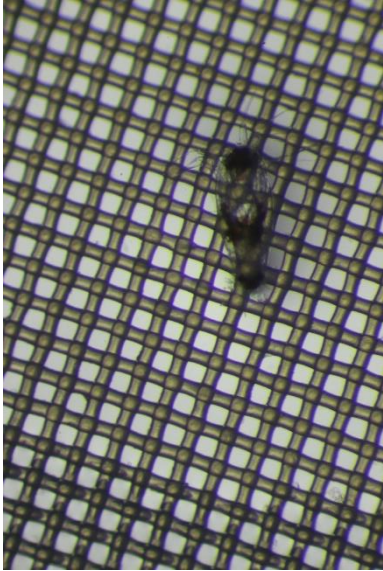
Figur 14. *Canon EOS 80D* montert på

Det ble senere tatt en beslutning for å gå over til videografering. Dette ble gjort for å effektivisere produksjonsprosessen av treningsmateriale for maskinlæringen, samtidig som det var ønskelig å teste ut om video kunne være et godt og effektivt verktøy for registrering av luselarver i vannprøver. Videograferingen ble gjort i 1080x1920 med 50 bilder i sekundet. Bildemodus «fine detail» ble brukt for å gjøre kanter og strukturer mer detaljerte og tydelige. Mikroskopet og kamera ble flyttet fra campus til privat husstand grunnet covid-19 restriksjoner, og det ble benyttet en halogenlampe som lyskilde. Lyskilden ble satt til en fast posisjon for å kunne få en uforandret belysning. For å kompensere for det litt mer gulaktige lyset fra halogenlampen, ble hvitbalansen på kameraet endret til «tungsten light».

2.6 Utvikling av foto- og videorigg

Det var primært en ide å utvikle en løsning i form av et revolversystem. I et slikt system plasseres prøvene på et filter, og filtrerer ut organismer som er både større, og mindre enn en luselarve. Filteret fotograferes for gjenkjenning av lus, skylles, og så fotograferes igjen for å verifisere at ingen lus ble liggende igjen etter skylling.

Det ble gått bort fra et slikt revolversystem da det å utvikle en metode for å automatisere denne prosessen ville være svært krevende, både tidsmessig og teknisk. Det ble også vanskelig å kjenne igjen konturene til luselarvene på grunn av maskene i det tiltenkte filteret (Figur 15).



Figur 15. *Bilde av nauplielarve på filter med 160 μ m*

Det ble utført forsøk ved bruk av en metode hvor det ble benyttet en tynn plastikkrenne der vannet flyter i en jevn strøm forbi kameraet ved hjelp av en pumpe (Figur 16). Dette resulterte i gode forhold for videografering med gode bilder av luselarver som renner forbi kameralinsen. Metoden fungerer ved å pumpe vann fra en beholder med planktonprøver, forbi kameralinsen og over i en annen beholder. Pumpen som ble brukt, er en GHL Doser 2.1 SA. Pumpen doserer en bestemt mengde vann med en bestemt og fiksert hastighet.

Ved vannmengde på 45ml/min ble vannhastigheten så rask at enkeltbilder i videoen fikk bevegelses-uskarphet, dvs. lukkeråpningen til enkeltbilder ble for lang med vannhastigheten for å få skarpe bilder. Resultatet ble at luselarvene passerte kameralinsen, uten å fange dette opp på video. Vannhastigheten ble så justert ned til pumpens minimum på 2ml/min. Dette viste seg derimot som en altfor langsom hastighet. Luselarvene la seg på bunn av rennen og ble liggende. Tester ble utført med 10ml/min, 12ml/min, 15ml/min og 20ml/min før det ble enighet om at 15ml/min var den hastigheten som hindret mest lakselus i å sette seg fast på rennen, uten at det var noe som gikk forbi kameralinsen i for høy hastighet.



Figur 16. Oppsett med mikroskop, pumpe, renne, og vannprøvebeholder

2.7 Trening av maskinlæring

Til trening av maskinlæringen trengs det mye data i form av bilder. I begynnelsen ble det tatt enkle og tydelige bilder av en enkelt luselarve (Figur 17). På denne måten får man fanget luselarvens klare kjennetegn og mange smådetaljer som det nevralt nettverket kan lære seg, og kjenne igjen. Videre ble det introdusert flere luselarver i hvert bilde (Figur 18), og deretter forstyrrelser i form av annen plankton (Figur 19).

Det ble så gått over til å lage videomateriale som inneholdt luselarver og raudåte. Det ble først benyttet en lav konsentrasjon av plankton (Figur 20), og det ble en gradvis økning i antall luselarver og andre dyreplankton (Figur 21). Til slutt var det opparbeidet 200 bilder og 3 timer, 11 minutter og 13 sekunder med videomateriale. Det gir totalt 574 500 bilder å jobbe ut ifra.

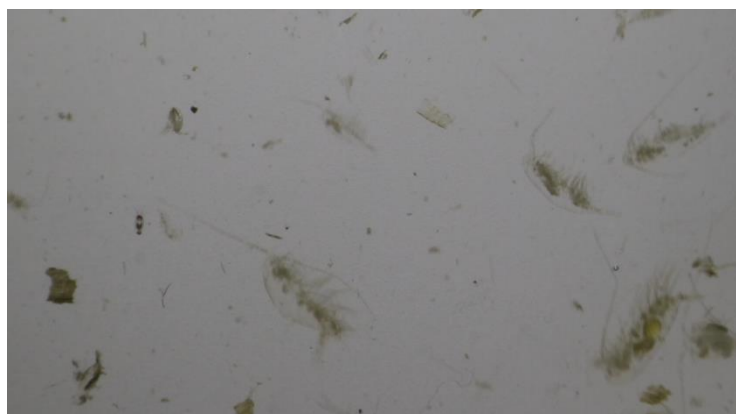
Det neurale nettverket brukt i denne oppgaven kalles for YOLOv4 (you only look once). Det ble generert et datasett ut ifra 947 bilder, utvunnet av de forskjellige lærings- og testvideoene. Her er bilder fra de diverse videoene blandet sammen, slik at datasettet har en god blanding av forskjellige bilder. For de 947 bildene som ble utvunnet, ble 80% av bildene brukt til læring, og 20% ble brukt til validering av datasettet.



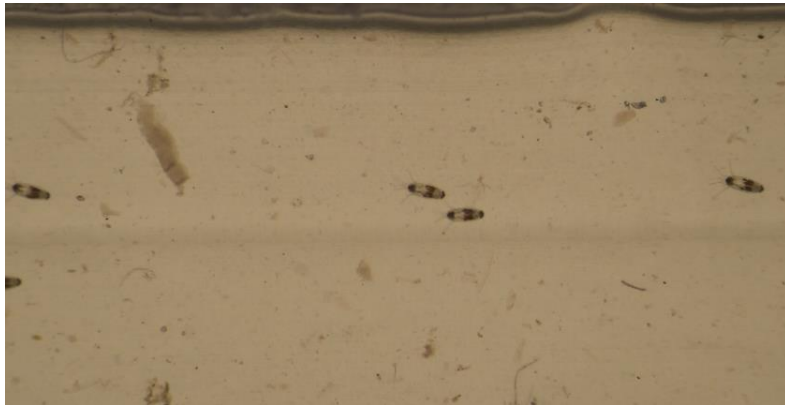
Figur 17. *Bilde av en enkelt nauplielarve*



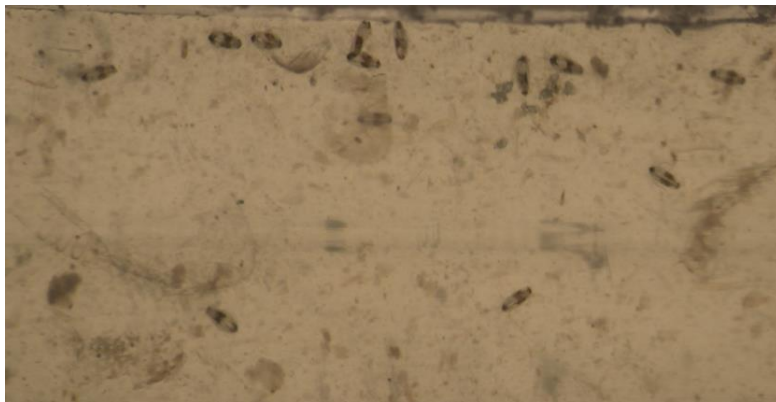
Figur 18. *Bilde av 3 nauplielarver*



Figur 19. *Skjerm bilde fra video med en nauplielarve og noen forstyrrelser*



Figur 20. Skjerm bilde fra video med 4 nauplielarver og noen forstyrrelser



Figur 21. Skjerm bilde fra video med 16 nauplielarver og en mye forstyrrelser

2.8 Testing av maskinlæring

For å teste effekten av maskinlæringen kreves et unikt sett med bilder som datamaskinen ikke har blitt trent på tidligere. Det er for å teste at maskinen kjenner igjen objektene som er på bildet, ikke bildet i seg selv. Det ble derfor produsert to videoer på 5 minutter og 3 sekunder, og 4 minutter og 24 sekunder. På disse videoene er det høy tetthet av nauplielarver og forstyrrelser som raudåte. Det ble gjennomført en manuell telling av lus i testvideoene. Det ble da talt opp henholdsvis 92 lus på testvideo 1, og 34 lus på testvideo 2. Dette gir et sammenligningsgrunnlag til å se hvor mye lus datamaskinen gjenkjenner, kontra det som faktisk vises på videoene.

2.9 Ekstrahering av resultater

Etter testvideoene har blitt analysert av det nevrale nettverket og markert registreringene med bokser og identifiseringssikkerhet, må man med denne versjonen av gjenkjenningssystemet telle antall registreringer. Man må da telle antall bokser og avgjøre om det er en identifisering av

luselarve, eller en falsk positiv registrering. YOLOv4 analyserer videoer bilde for bilde. En lus som befinner seg i videoen over tid vil da havne på flere bilder, og forsøkt identifisert for hvert enkelt bilde. Det kreves derfor en person som kan følge luselarven gjennom videoen og tolke dette som én lus, og ikke flere forskjellige lus. Det anbefales å registrere bokser når de entrer bildet og identifisere dem som lus (Figur 22, Figur 23, Figur 24 & Figur 27) eller falske positive. Slik ble detektert og udetektert lus talt opp (Tabell 1 & Tabell 2). For hvert objekt på hvert bilde hvor YOLOv4 har identifisert en mulig luselarve, vil den estimere hvor sikker den er på at objektet er en nauplie fra 0,00 til 1,00 (Figur 22). For å regne ut en gjennomsnittlig identifiseringssikkerhet på luselarvene ble det tatt ut et bilde annethvert sekund i de to testvideoene. Identifiseringssikkerhetene for hver luselarve på bildet ble registrert, og gjennomsnittet ble regnet ut fra dette. For identifisering av falske positive resultater ble videoene gjennomgått bilde for bilde. Alle registreringer av partikler som ikke er lakseluslarve (Figur 25, Figur 26 & Figur 28) ble notert med tidspunkt og identifiseringssikkerhet. Alle verdiene fra gjennomsnittsberegningen av identifiseringssikkerhet, og alle verdiene av falske positive registreringer ble samlet i en graf (Figur 29) for å vurdere ny terskelverdi for gjenkjenning av lakseluslarver.

3 Resultater

3.1 Innsamling og dyrking av lakselus

Gjerset

Fra første batch med lakselus oppnådde stor grad av klekking. Luselarvene ble eksponert for rustpartikler grunnet en stålklemme som rustet i sjøvannet. Luselarvene og resterende eggstrenger ble filtrert ut og satt i nytt sjøvann, men en del luselarver døde relativt raskt i etterkant.

Andre batch med lakselus fra Gjerset oppnådde også stor grad av klekking, men etter en helg med romtemperatur opptil 28 °C grunnet havari på kjølerommet, så døde alle luselarvene.

Furneset

Batchen med lakselus fra Furneset oppnådde høy grad av klekking. Luselarvene døde kjapt ut, og det ble ingen utbytte av batchen.

Gjermundnes

Batchen med lakselus fra Gjermundnes oppnådde stor grad av klekking. Luselarvene har i stor grad vokst frem som levedyktige.

3.2 Maskinlæring og gjenkjenning

3.2.1 Resultat fra testvideo 1

Tabell 1 Tabell over detekterte lus (positive) og udetekterte lus (falske negative) og total mengde lus i testvideo 1

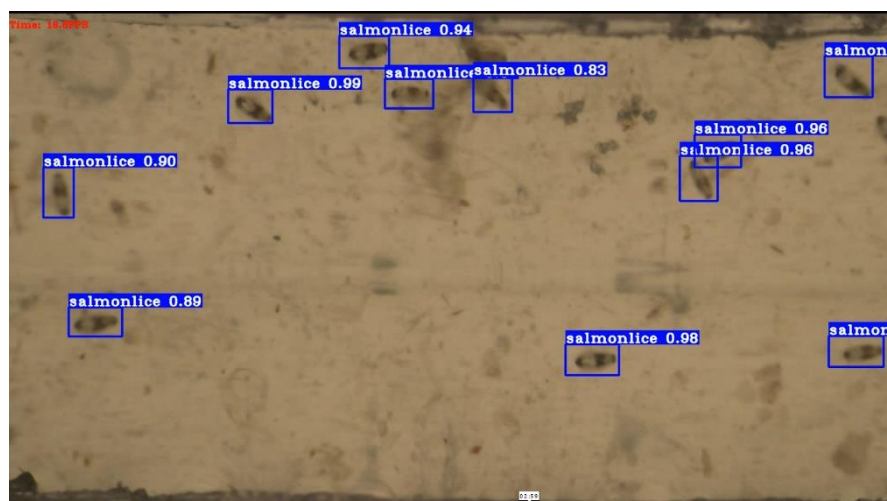
Detekterte lus	90	97,8 %
Udetekterte lus	2	2,2%
Sum lus	92	100%

Identifiseringssikkerhet

Identifiseringssikkerheten ble regnet ut fra 427 registreringer av lus. Verdiene varierte fra 71% til 99%, og gjennomsnittet fra alle disse ble 92,41%.

Figur 22.

Skjerm bilde av detekterte lus med 83-99% identifiseringssikkerhet



Figur 23.

Skjerm bilde av udetektert lus

Denne er ikke blitt detektert grunnet den henger loddrett i vannet. Da får ikke datamaskinen se karakteristikaene til lusen som den er trent opp til å kjenne igjen.



Figur 24.

Skjerm bilde av udetektert lus sammen med en detektert lus

Den udetekterte lusen svømmer så fort at kamera ikke får fanget et klart bilde av den, og da blir det vanskelig for datamaskinen å gjenkjenne den.



Falske positive for test 1

Med falske positive menes det registreringer av lakseluslarver når dette i realiteten er noe annet, men som stadig gjenkjennes og registreres som en lakseluslarve. Under kan man se bilder på et eksempel hvor noe i det ene sekundet blir detektert som lakselus med identifiseringssikkerhet på 71%. I bildet etterpå blir det ikke detektert som lus, og man kan se at det bare er slam eller grums i vannet



Figur 25. Partikkel detektert som luselarve med 71%



Figur 26. Partikkel i vann

I test 1 ble det gjort 43 registreringer av falske positive gjenkjenninger, med en gjennomsnittlig gjenkjenningsgrad på 0,736 eller 73,6%. De falske positive varierer i gjenkjenningsgrad fra 70% - 95%.

Disse falske positive resultatene har en svært begrenset tidsramme med gjenkjenningsverdi over 0,70/70% og det kunne variere fra 1 bilde gjenkjenning til 5 bilder med gjenkjenning. Den gjennomsnittlige tidsrammen med gjenkjenning for de falske positive resultatene i test 1 var 1,58 bilder.

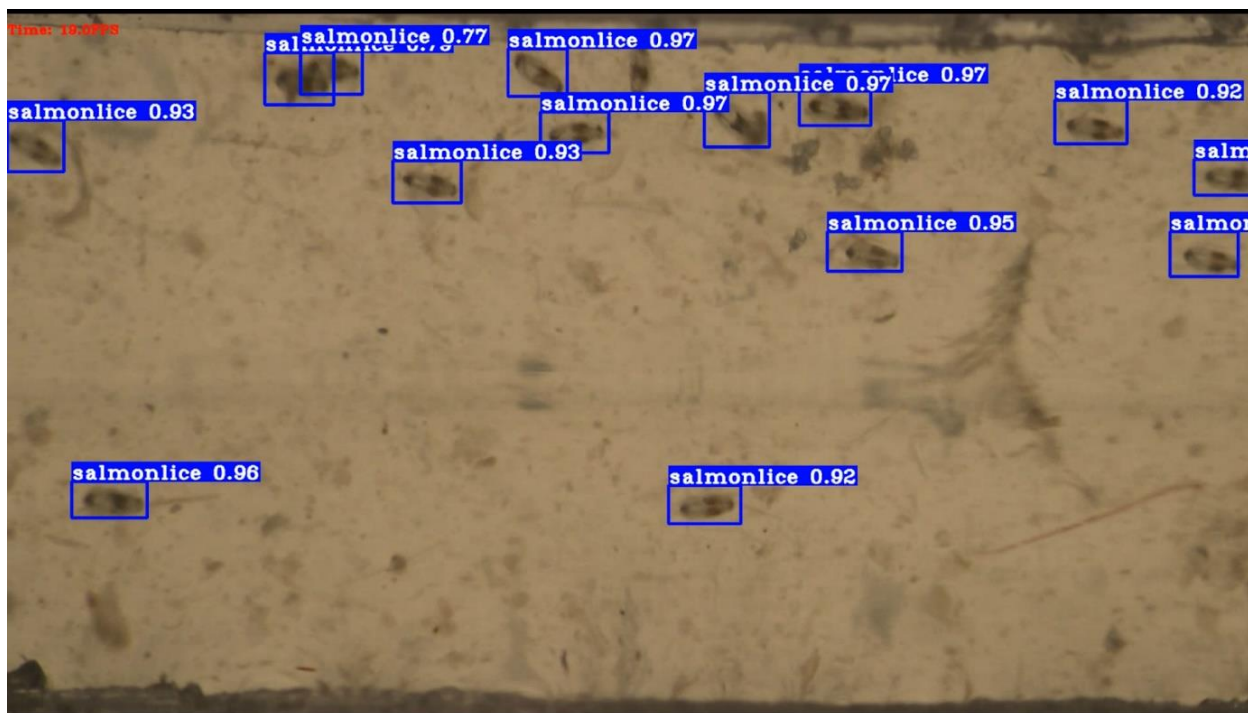
3.2.2 Resultat fra testvideo 2

Tabell 2. Tabell over detekterte lus (positive) og udetekterte lus (falske negative) og total mengde lus i testvideo 2

Detekterte lus	34	100%
Udetekterte lus	0	0%
Sum lus	34	100%

Identifiseringssikkerhet

Identifiseringssikkerheten ble regnet ut fra 598 registreringer av lus. Verdiene varierte fra 71% til 99%, og gjennomsnittet fra alle disse ble 93,38%.



Figur 27. Skjerm bilde av detektert lus med identifiseringssikkerhet på 77-97%

Falske positive for test 2

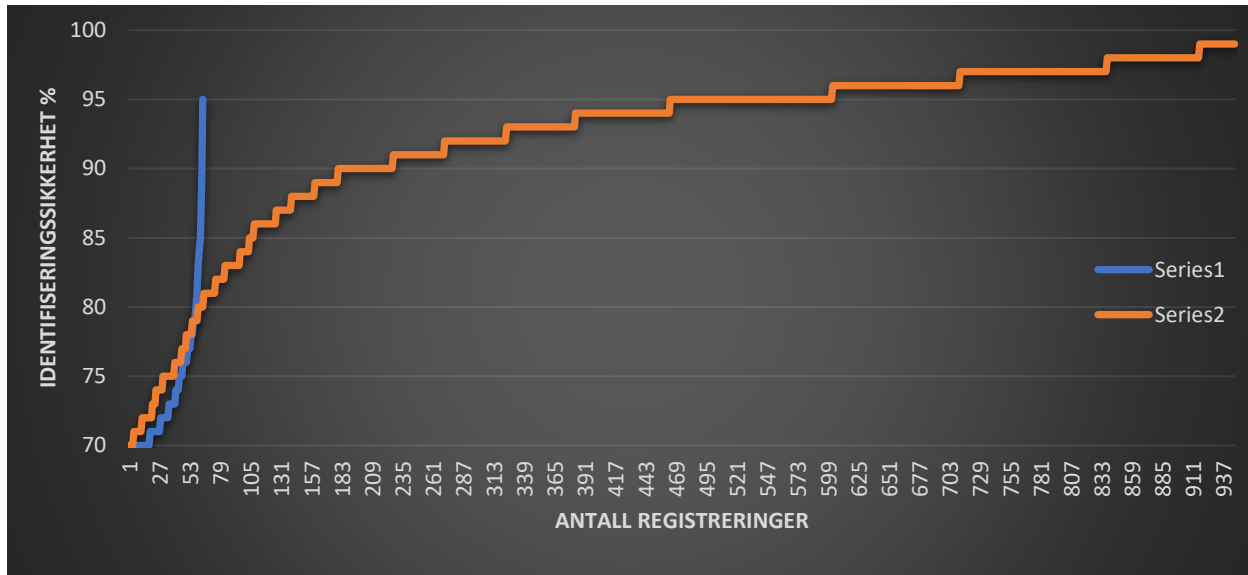
I testvideo 2 ble det registrert 21 tilfeller av falske positive resultater. De falske positive resultatene hadde en gjennomsnittlig gjenkjenningsverdi på 0,74 eller 74% og var litt høyere enn i test 1. Det er også en del ulike varianter av falske positive (se figur x)

Den gjennomsnittlige tidsrammen for gjenkjenningen av de falske positive var i test 2 på 1,76 bilder.



Figur 28. Partikkel detektert som lakselus med 73% identifiseringssikkerhet

Den sammenlagte gjennomsnittlige identifiseringssikkerheten for både testvideo1 og testvideo 2 var 92,98 %. Den sammenlagte gjennomsnittlige identifiseringssikkerheten til de falske positive registreringene i testvideo 1 og testvideo 2 var 73,96%



Figur 29 Samlet graf av identifiseringssikkerhet på luselarver (Serie 2) og falske positive registreringer (Serie 1)

4 Diskusjon

4.1 Utfordringer med dagens modeller

Informasjonen som brukes i datagrunnlag for lakselus baseres på modeller. Disse modellene tar utgangspunkt i lusepåslag i anlegg, lakselusens biologi, i kombinasjon med strømmodeller. Strømmodellene baseres på parametere som salinitet, vind, temperatur, tidevann, ferskvannsavrenning, m.m. Med lakselusens biologi handler dette om antakelser om døgngrader til utvikling, lakselusens atferd og vertikalvandring. Strømmen kan variere betydelig ved ulike dyp, og det finnes ikke data på i hvilket dyp luselarvene klekkes. Det er også mye vertikale vannbevegelser rundt oppdrettsanlegg grunnet et dynamisk og komplekst strømbilde som kommer av oppdrettsstrukturen og biomassen av laks som svømmer i merdene (Gansel, u.d.). Resultatene for spredning av lakselus kan derfor avvike fra realiteten og modellene som er laget. Det er derfor viktig å kunne kalibrere og teste modellene med data på lakselus larver i sjøen. Det finnes lite informasjon om lakselus larver i frie vannmasser siden dette ikke er overkommelig med dagens metoder. Informasjon om påslag av lakselus på oppdrettsfisk og vill laksefisk blir i stedet brukt. Det vil si at det er store usikkerheter i hvor korrekte dagens modell resultater er. (Sandvik, 2017; Nelson, 2017)

I en rapport av havforskningsinstituttet nr. 12-2017 legges det vekt på at validering av dagens modellsystem er svært vanskelig. Det nevnes at modellen estimerer antall smittsomme lakselus, mens de aller fleste observasjonene er fra lusetelling av laksen. Det vil med andre ord være nødvendig å etablere en klar sammenheng mellom antall lakselus i de frie vannmassene, og det antallet av lakselus som setter seg på fisken (Sandvik, 2017).

Trafikklyssystemet er også diskusjoner rundt. Som kjent baseres denne ut fra nettopp modelleringer, estimeringer og påslag av lakselus på vill laksefisk. Sjømat Norge støtter trafikklys ordningen, men ser også utfordringer og forbedringspotensialer. *“Dagens trafikklys ordninger baserer seg på modeller som ikke kvantifiserer hvilken populasjonsregulerende effekt lus fra oppdrett har på vill laksefisk (Haram, 2020).”* Dette vil si at ordningen ikke baserer seg på

hvilke endringer i produksjonsvolum av laks påvirker påslag av lus på vill laksefisk. Det vil derfor være nødvendig med mer forskning og utvikling for at dette systemet skal bli mer nøyaktig. Hvis det skal kunne valideres hvor nøyaktig trafikkløssystemet og datagrunnlag for lakselus er, må det skaffes en bedre oversikt av lakselus larver i de frie vannmassene. Dette er noe som kan gjøres ved å ta vannprøver ute i felt.

4.2 utfordringer med metoder for telling av lakselus i vannprøver fra felt

Bui *et al.* (2021) sammenligner ulike metoder for å telle lakselus i planktonprøver. Bakgrunnen for forskningen kommer av behov for å undersøke planktonisk forekomst av lakselus. Mens telling i mikroskop har høyest presisjon, tar det for lang tid og er for dyrt. Denne metoden krever god kompetanse for å unngå at lakselus blir oversett. Fluorescerende lys korter ned tiden det tar å telle lus i planktonprøvene, men det krever forbehandling og må lagres over tid. PCR-metodene var nøyaktige, men med variable tellinger og høye kostnader. Automatisk luseteller, i dette tilfelle “fluid analyse” som ble forklart under kapittel om ulike metoder for lusetelling, var betydelig raskere, billigere og med mindre arbeidstid, men ikke like nøyaktig. (Bui, 2021)

4.3 Vår metode sammenlignet med andre metoder

Planktonprøver varierer i tetthet med ulike årstider. Dermed vil tidsbruk for å telle gjennom en prøve også variere. Det vil også variere fra person til person, hvor lang tid det tar å telle gjennom en planktonprøve. En planktonprøve fra våren 2020 i Storfjorden inneholdt 30 dyreplankton i størrelse mellom 180 μm og 1000 μm per liter vann og med 1 m^3 vann kan det ta opp mot et dagsverk å analysere manuelt i stereo mikroskop for luselarver «S.A.Tuene, personlig kommunikasjon, 23.05.2021». 30 dyreplankton per liter vann i 1 m^3 vil tilsvare 30 000 dyreplankton.

4.3.1 Estimert tidsbruk med studiets utviklede metode sammenlignet med andre

Bildet til kameralinsen er 1,2cm x 0,8cm og rennen er 0,4cm i dybden. Dette tilsvarer 0,384 cm³. Det er registrert over 20 lakseluslarver på det meste i resultatvideoene. Det kan gjøres et estimat på at det vil være plass til minst det dobbelte (40), og fortsatt mulig å foreta registrering og telling av lusa. Det vil si 40 dyreplankton på 0,384 cm³. 1 cm³ er det samme som 1 ml slik at 40 dyreplankton på 0,384 cm³ vil tilsvare 104 dyreplankton per ml. Pumpen med de innstillingene brukt i denne oppgaven pumper 15 ml per minutt. Antall dyreplankton per minutt vil da tilsvare 1560 (Tabell 3). 30 000 dyreplankton vil med vår metode dermed ta 19,23 minutt. Sammenlignet med tradisjonell telling i mikroskop på et dagsverk (8 timer) er vår metode 25 ganger raskere (ikke medregnet tid for manuell validering).

Tabell 3. Tabell som viser antall dyreplankton pumpet pr. minutt ved pumpehastighet 15ml/min og optimal planktontetthet på 104 plankton/ml

Minutt	Antall dyreplankton
1	1560
5	7800
10	15600
15	23400
20	31200
25	39000
30	46800
35	54600
40	62400
45	70200
50	78000
55	85800
60	93600

“Horizontal and vertical distribution of sea lice larvae (*Lepeophtheirus salmonis*) in and around salmon farms in the Bay of Fundy, Canada (Nelson, 2017)” gikk gjennom 1521 prøver i et tidsrom på over 5 år (Nelson, 2017). Dette tilsvarer 304 prøver per år eller 0,83 prøver per døgn. Dersom hver prøve hadde inneholdt 30 000 dyreplankton ville det tatt 20,3 døgn med vår metode, om pumpen hadde gått kontinuerlig. Om en regner med at pumpen går 8 timer hver dag (en vanlig arbeidsdag) ville det tatt 60,9 døgn, som tilsvarer rundt 2 måneder.

Bui *et al.* (2021) sammenlignet stereomikroskop og andre metoder med hverandre. Her viser telling i stereo mikroskop en nøyaktighet og presisjon på 86.1% og 77.4% (Tabell 4).

Tabell 4. Nøkkeltall med evaluering av prestasjon av testede metoder (Bui, 2021)

Method	Accuracy (%)	SD	CV ^a	Precision (%) ^b	Bias ^c	OAE
Light microscopy	86.1	19.4	22.6	77.4	-13.9	33.3
Fluorescence microscopy	67.2	32.1	47.8	52.2	-32.8	64.9
Auto. fluid imaging	51.4	28.1	54.6	45.4	-48.6	76.7
ddPCR	86.6	22.6	26.1	73.9	-13.4	36.0
qfPCR	87.7	55.9	63.8	36.2	-12.3	68.3
qPCR	212.1	154.2	72.7	27.3	112.1	266.3

^aCV calculated as standard deviation divided by the mean, multiplied by 100.

^bPercentage precision calculated as 100 minus CV.

^cBias calculated as exact accuracy (100%) minus mean observed accuracy.

Vår metode har derimot høyere «Accuracy» (deteksjonsgrad) og «Precision» (identifiseringssikkerhet) enn de andre metodene ut ifra de gjennomførte testene, men det trengs fortsatt flere tester rundt dette området med reelle prøver. Det vil si at vår metode ikke kan valideres før den er trent og prøvd ute i felt. Hvis en antyder at vår metode har over 90% gjenkjennelse og identifiseringssikkerhet etter videre utvikling og testing vil en kunne argumentere for at vår metode vil være mer effektiv og kostnadsbesparende enn de andre metodene.

4.4 Forbedringspotensialer

Den største metodiske svakheten i dette forsøket var at planktonprøvene var lite representative. En fersk planktonprøve ville ikke sett helt lik ut med tanke på plankton sammensetning, og om man hadde hatt mer tid skulle man gjennomført reelle planktonprøver for å trene AI, og for å teste om det nevrale nettverket hadde klart å finne igjen lakselus i felt. Oppsettet som er utviklet gjennom forsøkene denne våren er en god start, og kan gjerne kalles en tidlig prototype. Men man har observert at det er en rekke ulike forbedringspotensialer som kan gjøres videre for å forbedre løsningen.

Det finnes kamera som kan ta enda flere bilder per sekund slik at en ville fått flere bilder av en eventuelt lakseluslarve som driver forbi kameralinsen og flere muligheter til å kjenne den igjen. Et kamera med høyere oppløsning og flere piksler vil kunne fange flere detaljer og gi et bilde av høyere kvalitet. Siden løsningen har gått bort fra fotografering, og over til videografering kan man tenke seg at et videokamera som er designet for å fange mye detaljer på video kan være fordelaktig, kontra et speilreflekskamera, som i utgangspunktet er designet for å ta bilder. Ved å bedre lysforhold vil en også kunne få enda bedre bilder. Det er mulig å lage en form for kuppel for å stenge ut alt av naturlig lys og kontrollert tilsette ønskelig lys, og dermed få enda klarere bilder med detaljer fra luselarven. En annen observasjon som ble gjort var at luselarvene sank til bunns når de døde og gled ikke like godt forbi som resten av organismene. Om dette gav et positivt utslag eller ikke er ikke sikkert, da det ikke har blitt gjennomført tester på en glattere renne. Det kan være at luselarvene hadde glidd lettere forbi ved bruk av en glassrenne. En glattere renne vil derimot kunne resultere i lavere vannstand, noe som kan gjøre det enklere å få fullstendig dybdefokus. Når vannet som organismene befinner seg i blir grunnere, vil det bli et mindre dybdespekter som kamera må fokusere i, og man vil kunne få et klarere bilde i bunn og i toppen av vannsøylen.

Pumpen som ble benyttet gav en pulserende strøm i stedet for en helt jevn vannstrøm. Det er mulig dette kan være en fordel med tanke på å få fokus i bildet og muligens løsne organismer fra hverandre dersom de sitter fast i hverandre. Dette er noe som må undersøkes nærmere ved optimalisering av systemet.

Treningen og gjenkjenning av luselarver med bruk av nevralt nettverk har gitt gode tall og man har fått gode tilbakemeldinger. En slik løsning har et stort potensial og vil trolig kunne bidra med store forandringer i metode for telling av luselarver i frie vannmasser. Man kan, ut fra artikler i innledning, se at det er flere som har begynt å utforske muligheter for å bruke AI og nevrale nettverk for gjenkjenning og klassifisering av plankton. Dette kan bekrefte at det er interesse og nødvendighet for presise og effektiviserende løsninger i forskning og næring.

4.5 Bilde eller video – fordeler og ulemper

Et revolversystem, eller en lignende løsning som baserer seg på objektgjenkjenning på bilder, har som fordel at man ganske enkelt kan få klare og tydelige bilder, som fanger opp mye detaljer. En ulempe med et slik system basert på bilder av stasjonære objekter er at dersom flere objekter overlapper hverandre, så kan deler av karakteristika skjules, og det objektet som er av interesse ikke blir gjenkjent. En annen ulempe med bildebasert gjenkjenning er at dersom man tar flere bilder av objekter i bevegelse, så vil man ikke ha mulighet til å telle antall objekter av interesse med mindre man kan gi objektene en unik identitet. Fordelen med en videobasert gjenkjenning av objekter i en strøm, i dette tilfelle en vannstrøm, er at man ved hjelp av et titalls bilder i sekundet gir det nevralt nettverket flere muligheter til å kjenne igjen de aktuelle objektene. I en kontinuerlig video av objekter i bevegelse, vil man også ved hjelp av tracking, kunne følge hvert enkelt objekt slik at man unngår dobbeltregistreringer av samme objekt på to bilder.

4.6 Deteksjonsgrad

Metoden oppnådde en deteksjonsgrad på henholdsvis 97,8% i testvideo 1 (Tabell 1) og 100% i testvideo 2 (Tabell 2). I løpet av testvideo 1 og testvideo 2, ble det observert to udetekterte luselarver. Den ene ble hengende vertikalt i vannet og ble for kameraet synlig som en sort prikk. Den andre svømte i så høy hastighet at kameraet ikke greide å få et klart bilde av luselarven. Begge disse tilfellene foregikk tidlig i testvideo 1, og skyldes trolig at de fortsatt var levende. Dersom man hadde ventet med å starte videograferingen en liten stund til, slik at luselarvene fikk lengre eksponering for spriten, ville nok alle luselarvene vært døde.

I testvideo 2 var alle luselarvene døde, og deteksjonsgraden ble 100%. Man kan derfor tenke seg at dersom all lusen i testvideo 1 var død, så kunne man trolig oppnådd en deteksjonsgrad på 100% der også. Men det bør presiseres at det kreves mer trening, og mer reell trening, samt mye testing før man kan avgjøre en gjennomsnittlig gjenkjenningsgrad. Man kan også trolig trene opp datamaskinen til å gjenkjenne luselarvene som står vertikalt i vannet, men dette vil sannsynligvis føre til en stor økning i falske positive registreringer da det er mange partikler som kan ligne på en vertikal lakselus, altså en mørk prikk. Det blir derfor vurdert at det er gunstigere å eliminere

eller redusere årsaken til vertikalhengende luselarver, enn å trene opp maskinen og skape mange falske positive registreringer.

4.7 Identifiseringssikkerhet

Som resultatene viser så identifiserer YOLOv4 nauplielarver med et samlet gjennomsnitt fra testvideo 1 og testvideo 2 på 92,98%. Det er resultatet etter trening med et datasett på 748 ulike bilder. Det er totalt opparbeidet et datasett på 574 500 bilder, så med mer tid til trening har man grunn til å tro at det nevralt nettverket kunne oppnådd en enda høyere grad av identifiseringssikkerhet.

4.8 Falske positive resultater

I test 1 ble det gjort 43 registreringer av falske positive gjenkjenninger, av totalt 135 registreringer, med en gjennomsnittlig gjenkjenningsgrad på 73,62%. De falske positive registreringene varierte i gjenkjenningsgrad fra 70 - 95%. I testvideo 2 ble det 21 falske positive registreringer, av totalt 55 registreringer. Disse falske positive registreringene hadde en gjennomsnittlig gjenkjenningsgrad på 0,74 eller 74,57%, noe som er marginalt høyere enn i testvideo 1. Sammenlagt har disse en gjennomsnittlig identifiseringssikkerhet på 73,96% Disse falske positive registreringene blir raskt oppdaget som falske og i gjennomsnitt så er de registrert i 1,58 bilder i testvideo 1 og 1,76 bilder i testvideo 2. Dette betyr at det er veldig korte øyeblikk der forstyrrelsene ligner på luselarver, og med mer trening av maskinlæringen så vil man trolig kunne luke ut mange av disse falske positive registreringene. Sammenligner man den samlede gjennomsnittlige identifiseringssikkerheter for luselarver på 92,98% og falske positive registreringer på 73,96% kan man tolke det slik at YOLOv4 gjør en god jobb å skille mellom disse. Dersom man øker terskelen for å identifisere et objekt og markere den med boks, vil man redusere antall falske positive registreringer. Dersom man øker den terskelverdien på 70% som har vært benyttet frem til nå, og opp til 85% så vil 62 av 64 (96,87%) av de falske positive registreringene lukes bort, mens bare 104 av 1025 (10,14%) nauplieregistreringer brukt til gjennomsnittsutregning vil falle bort. De 10,14% naupliene som hadde indentifiseringssikkerhet under 85% på det bilde vi registrerte verdier, vil trolig likevel registreres av YOLOv4 da verdiene

endrer seg fra bilde, og hver lus vises på flere bilder, og gjennomsnittlig identifiseringssikkerhet for nauplielarver er 92,98%.

Med bakgrunn i de resultatene oppnådd i disse forsøkene, ser det positivt ut med tanke på en presis, tid- og kostnadsbesparende validering av lusenivåer langs norskekysten. Med en nøyaktighet på 92,9% etter et datasett på bare 748 bilder, er det grunnlag for å tro at YOLOv4 også skal kunne trenes og benyttes på gjenkjenning av kopepoditter. Vi vurderer det slik at et videreutviklet gjenkjenningsprogram for nauplielarver og kopepoditter kan bli et viktig verktøy for forskning og regulering av laksenæringen, da reelle prøver og beviselige data er bedre vurderingsgrunnlag enn estimer og modeller.

5 Konklusjon

Vi har gjennom denne oppgaven utviklet en metode for automatisert gjenkjenning av lakseluslarver. Den automatisert metoden gjenkjente 98,41 % av alle luselarvene som gikk igjennom systemet. Med det kan det konkluderes at dette er en løsning, som har utført den tiltenkte oppgaven, og en metode som fungerer slik som tiltenkt med svært få falske positive eller falske negative resultater.

Det er et store forbedringspotensial på flere forskjellige aspekter av løsningen. Studiet synliggjør muligheten for å bruke maskinlæring til å registrere lakseluslarver i vannprøver, og dette arbeidet legger et grunnlag for videre testing av metoden med ferske vannprøver for å mer nøyaktig kunne kartlegge lakselusens omfang ved forskjellige geografiske lokaliteter. For å kunne gjennomføre dette kreves det en enda mer omfattende maskinlæring, effektivisering og optimalisering av selve metoden, og ikke minst manuell validering for å sjekke forbedringen av resultatene.

6 Referanser

- Aarhus, I. J., 2011. *Rømming - en høyt prioritert utfordring for oppdrettsnæringen*. [Internett]
Available at: <https://www.sintef.no/siste-nytt/2011/romming-en-hoyt-prioritert-utfordring-for-oppdrett/>
[Funnen 12 Mai 2021].
- Abdurahman, F. F. K. A. & A. M., 2021. Malaria parasite detection in thick blood smear microscopic images using modified YOLOV3 and YOLOV4 models. *BMC Bioinformatics*, 8 Mars, pp. 1-17.
- BarentsWatch, 2018. *Om oss*. [Internett]
Available at: <https://www.barentswatch.no/om/>
[Funnen 8 Mai 2021].
- BarentsWatch, 2021. *Fiskehelse*. [Internett]
Available at: <https://www.barentswatch.no/fiskehelse>
[Funnen 10 Mai 2021].
- BarentsWatch, 2021. *Fiskehelse - forklaring og bruksanvisning*. [Internett]
Available at: <https://www.barentswatch.no/tjenester/fiskehelse/>
[Funnen 2 Mai 2021].
- Bui, e. a., 2021. Finding the needle in the haystack: Comparison of methods for salmon louse enumeration in plankton samples. *Aquaculture Research*, 20 Februar, pp. 1-14.
- Cheng, e. a., 2019. Enhanced convolutional neural network for plankton identification and enumeration. *PLOS ONE*, 10 Juli, p. 1.
- Fiskeridirektoratet, 2019. *Hvor stor er oppdrettsnæringen i Norge?*. [Internett]
Available at: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Nyheter/2019/0519/Hvor-stor-er-oppdrettsnaeringen-i-Norge>
[Funnen 23 Mai 2019].
- Fiskeridirektoratet, 2021. *Rømmingsstatistikk*. [Internett]
Available at: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Roemningsstatistikk>
[Funnen 15 April 2021].
- Fossum, S. & D. E., 2021. *PCR (polymerasekjedereaksjon)*. [Internett]
Available at: https://sml.snl.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon
[Funnen 5 Mai 2021].
- Gansel, L. C. M. T. A. & M. D., u.d. *VANNSTRØM GJENNOM OG RUNDT MERD*. [Internett]
Available at: https://www.sintef.no/contentassets/56ec1cc24ee045b097208bdbedbca757/lars-gansel-merdmiljokonferanse_vann-gjennom-og-rundt-merd.pdf
[Funnen 26 Mai 2021].
- González, e. a., 2019. Automatic plankton quantification using deep features. *Journal of Plankton Research*, 30 Juli, pp. 449-463.

Hamre, L. A. G. K. A. & N. F., 2009. Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains. *Parasitology International*, Desember, pp. 451-460.

Haram, Ø. A., 2020. - *To røde soner, er to for mye*. [Internett]
Available at: <https://sjomatnorge.no/to-rode-soner-er-to-for-mye/>
[Funnen 20 Mai 2021].

Havforskningsinstituttet, 2019. *Beregning av smittepress*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/beregning-av-smittepress>
[Funnen 4 Mai 2021].

Havforskningsinstituttet, 2019. *Effekter av lakselus på vill laksefisk*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/effekter-av-lakselus-pa-vill-laksefisk>
[Funnen 8 Mai 2021].

Havforskningsinstituttet, 2019. *Overvåking av lakselus*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/overvaking-av-lakselus>
[Funnen Mai 8 2021].

Havforskningsinstituttet, 2020. *Generell biologi*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>
[Funnen 3 Mai 2021].

Havforskningsinstituttet, 2021. *Hvordan spres lakselusa?*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/hvordan-spres-lakselusa>
[Funnen 8 Mai 2021].

Havforskningsinstituttet, 2021. *Lakseluskartet*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/forskning/marine-data-forskningsdata/lakseluskart/html/lakseluskart.html>
[Funnen 4 Mai 2021].

Havforskningsinstituttet, 2021. *Tema: Trafikklyssystemet – HI sin kunnskap*. [Internett]
Available at: <https://www.hi.no/hi/temasider/akvakultur/trafikklyssystemet-hi-sin-kunnskap>
[Funnen 10 Mai 2021].

Ilaks, 2019. *Lakselusa kostet oppdretterne minst 5,2 milliarder kroner i 2018*. [Internett]
Available at: <https://ilaks.no/lakselusa-kostet-oppdretterne-minst-52-milliarder-kroner-i-2018/>
[Funnen 23 Mai 2021].

Ingebrigsten, H., 2017. *Molecular quantification of sea lice in and around sea cages - A study comparing the molecular quantification method qPCR against a conventional method*. [Internett]
Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-quantification-of-sea-lice-in-and-around-Ingebrigtsen/6ae28abe2e0ab5e89bd4d57dfa1cdd76c74ea1c5>
[Funnen 4 Mai 2021].

Kierulf, P., 2018. *flowcytometri*. [Internett]
Available at: <https://sml.sn.no/flowcytometri?web=1&wdLOR=cACA437FB-EA38-4212-AABB->

27C639C901A8

[Funnen 5 Mai 2021].

Kyst.no, 2021. *Trafikklysrettssaken: Oppdretterne tapte for staten. Her er litt av begrunnelsen retten gav.* [Internett]

Available at: <https://www.kyst.no/article/oppdretterne-tapte-over-staten/>

[Funnen 20 Mai 2021].

Kyst.no, 2021. *Trafikklys-saken: – Riktig avgjørelse i en prinsipielt viktig sak.* [Internett]

Available at: <https://www.kyst.no/article/trafikklys-saken-riktig-avgjoerelse-i-en-prinsipielt-viktig-sak/>

[Funnen 24 Mai 2021].

Lloret, e. a., 2018. Convolutional Neural Networks for Phytoplankton identification and classification. *BISS Biodiversity Information Science and Standards*, 28 Mai, pp. 1-2.

Marine Institute, 2020. *Life cycle of the Salmon Louse.* [Internett]

Available at: <https://www.marine.ie/Home/site-area/areas-activity/aquaculture/sea-lice/life-cycle-salmon-louse>

[Funnen 6 Mai 2021].

Miljødirektoratet, 2021. *Fiskeoppdrett - en næring i vekst.* [Internett]

Available at: <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/hav-og-kyst/fiskeoppdrett/>

[Funnen 23 Mai 2021].

Nærings- og fiskeridepartement, 2018. *Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg.* [Internett]

Available at: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140>

[Funnen 5 Mai 2021].

Nelson, e. a., 2017. Horizontal and vertical distribution of sea lice larvae (*Lepeophtheirus salmonis*) in and around salmon farms in the Bay of Fundy, Canada. *JOURNAL OF FISH DISEASES*, 21 November, p. 885.

Regjeringen.no, 2017. *Regjeringen skrur på trafikklyssystemet.* [Internett]

Available at: <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/regjeringen-skrur-pa-trafikklyset/id2577032/>

[Funnen 4 Mai 2021].

Sandvik, e. a., 2017. *Hydrodynamisk spredningsmodell for lakselus og konsentrasjon av smittsomme kopepoditter*, Bergen: Havforskningsinstituttet.

Sannsyn, 2020. *Dyp læring er en grunnpilar i avanserte automatiseringsoppgaver.* [Internett]

Available at: <https://sannsyn.com/no/dyp-laering/>

[Funnen 27 April 2021].

Steinset, T. A., 2020. *Oppdrettslaks til heile verda.* [Internett]

Available at: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/oppdrettslaks-til-heile-verda>

[Funnen 4 Mai 2021].

Uglem, e. a., 2018. *Lusetelling i vann og på laks*. [Internett]

Available at: <https://www.fhf.no/media/1264/18-ingebrigt-uglem-nina-lusetelling-i-vann-og-paa-laks-v2.pdf>

[Funnen 8 Mai 2021].

Veterinærinstituttet, 2021. *Lusekart - verktøy for å beregne smittepress*. [Internett]

Available at: <https://www.vetinst.no/dyr/oppdrettsfisk/lusekart-verktoy-for-a-beregne-smittepress>

[Funnen 9 Mai 2021].

