

Bruk av krill som alternativ proteinkilde i fiskefôr

De tradisjonelle kildene for protein til produksjon av fiskefôr utnyttes i dag til det fulle og dersom en skal kunne øke produksjonen av oppdrettsfisk trengs det alternative kilder til fôrråvarer. Krill finnes i store mengder og det drives i dag kommersiell fangst, samtidig som det har en god aminosyresammensetning for karnivor fisk i forhold til vegetabiliske proteinkilder. Men krill inneholder store mengder fluor. Fluor i store mengder kan være giftig for de fleste dyr og det finnes derfor øvre grenseverdier (gitt av EU) for hvor mye en fôrråvare (for krillmel: 2000 mg F kg⁻¹ fôr, 88% tørvekt) og et ferdig fôr (150 mg F kg⁻¹ fôr, 88% tørvekt) kan inneholde. Tidligere forsøk har vist at laks vokser tilfredsstillende med krill som en del av fôret. Det synes som om fluor fra krillmel ikke tas opp eller lagres i laks i sjøvannsfasen. Dette har vi nå bekreftet. I tillegg vet vi nå at verken kveite eller torsk opplever negative effekter ved å få tilført store mengder krill i fôret. På lik linje med laks øker ikke mengden fluor i organene til disse marine artene selv om de får store mengder krill i fôret.

I den ene delen av dette arbeidet ble laks og torsk fôret med fôr hvor opptil 100 % av fiskemelet ble erstattet av krillmel laget fra antarktisk krill. Dette ga et fluorinnhold i fôret på over 800 mg kg⁻¹, men innholdet av fluor i bein, muskel, gjeller, skinn/skjell ble ikke høyere sammenliknet med gruppen som fikk 100% fiskemel. Verken vekst eller helse generelt ble påvirket sammenliknet med fisk som kun fikk fiskemel-basert fôr (tradisjonelt fôr).

I den andre delen ble det gjort en studie hvor kveite og laks fikk fôr hvor deler av fiskemelet (40-60 %) ble erstattet med mel fra arktisk krill og her ble det heller ikke observert noen negative effekter, snarere så man at laks som fikk et fôr hvor 60 % av fiskemelet ble erstattet med krillmel vokste litt raskere i den første perioden. Kveite og laks ble også gitt fôr hvor en erstattet 40% av fiskemelet med mel produsert fra en art amfipode. Amfipodemelet viste seg å inneholde mer fluor enn krillmelene, men det ga heller ingen økning av fluor i fisk som fikk dette fôret.

På grunnlag av våre data og litteraturen kan vi konkludere med at fluorinnholdet i disse alternative proteinkildene ikke kan anses som en hindring eller begrensende faktor i forhold til produksjon av fôr til oppdrettsfisk i saltvann.

Hovedmålet for prosjektet var å vise at krill, til tross for høyt innhold av fluor, kan brukes som ingrediens i fôr til oppdrettsfisk.

Delmål:

1. Absorpsjon og retensjon av fluor i atlantisk laks fôret med ulike nivåer av krill.
2. Absorpsjon og retensjon av fluor i regnbueørret fôret med ulike nivåer av krill
3. Absorpsjon og retensjon av fluor i torsk fôret med ulike nivåer av krill
4. Etablere en metode for måling av fluor i blodserum
5. Farmakokinetikk av fluor i atlantisk laks, regnbueørret og torsk gitt krill og NaF som kilder til fluorid

Som et resultat av at vi samarbeidet med Havforskningsinstituttet (HI) som ledet fôringsforsøkene gjennom et parallelt prosjekt (146871/S40), ble noen av disse delmålene noe endret. Følgende endringer ble gjort for de forskjellige delmålene:

1. To fôringsforsøk ble gjennomført med laks, et med antarktisk krill og et med arktisk krill.
2. Regnbueørret ble ikke fôret med krill, men med NaF som gir sammenlikningsgrunnlag i forhold til de øvrige artene i forbindelse med delmål 5.
4. Blodserum ble prioritert til å måle helseparametre som var vesentlige for den generelle vurderingen av krill som fôringrediens. Fluor ble derfor ikke målt.
6. I tillegg ble det gjennomført et fôringsstudie med kveite, tilsvarende de øvrige forsøkene.

Videre i beskrivelsen av resultatene vil disse delprosjektene behandles i to omganger avhengig av hvordan fôrene ble produsert (se nedenfor), men også med vekt på del- og hovedmål.

Delmål 1 og 3. Laks og torsk fôret med fôr hvor 0 – 100% av fiskemelet ble erstattet med krillmel

Det første laskeforsøket (Laks 03) og torskforsøket ble gjennomført med antarktisk krill (*Euphausia superba*). Ulike eksperimentelle fôr ble laget til laks og torsk med henholdsvis 45 % protein og 30 % fett og 55 % protein og 14 % fett. Det er viktig å merke seg at torskefôret inneholdt en høyere andel protein og dermed vil også mengden krillmel være større. Det betyr at f.eks. med 60 % innblanding vil laksefôret inneholde 400 g krillmel kg^{-1} , mens torskefôret vil inneholde 490 g kg^{-1} .

Laks 03, delmål 1

Følgende organer ble analysert: muskel, bein, skjell/skinn, gjeller, magesekk, tynntarm og tykktarm i tillegg til helfisk, feces og fôr (tabell 1). Muskel ble valgt av hensyn til konsumenten, da evt. økt innhold av fluor i muskel ikke er ønskelig for humant konsum. Bein er det organet hvor fluor blir oppkonsentrert i pattedyr, fugl og ferskvannsfisk og kan anses som et målorgan. Skjell har liknende sammensetning som bein og det kunne tenkes at fluor kunne lagres her på en tilsvarende måte. Dersom fluor skilles ut, var gjeller et naturlig organ å studere i og med at hovedandelen av ionene blir utskilt over gjellene. Videre ville vi se på hvorvidt fluor eventuelt ble tatt opp i magesekk, tynn- eller tykktarm. Fecesprøver gir en indikasjon på mengden opptak fra tarm når innholdet sammenliknes med fôret og målorganer.

Fôringsforsøket pågikk i 140 dager og fisken vokste fra 550 til 1422 - 1824g. Ingen vektforskjeller ble funnet mellom fôringsgruppene. Flere blodparametre ble brukt som helseindikatorer, men ingen av gruppene fikk endret nivå av hematokrit, hemoglobin, røde blodceller eller plasmanivå av protein, glukose, triacyl glyserol, kolesterol, aspartat aminotransferase (ASAT) og alanin aminotransferase (ALAT). Vi kan konkludere med at krill ikke påvirket fiskens helse eller vekst i løpet av de 140 dagene forsøket pågikk.

Tabell 1. Innhold av fluor i prøver fra laks (mg F kg⁻¹ prøve tørrvekt ± std, n=2) etter 140 dagers fôring.

| Organ/prove | Andel fiskemel erstattet med antarktisk krillmel | | | | NaF (150 F ⁻ mg kg ⁻¹) |
|--------------|--|---------|----------|-----------|--|
| | 0% | 20% | 60% | 100% | |
| Fôr | 28 ± 1 | 130 ± 4 | 510 ± 27 | 900 ± 61 | 190 ± 10 |
| Muskel | 15 ± 1 | 15 ± 1 | 13 ± 2 | 14 ± 1 | 14 ± 1 |
| Skjell/skinn | 8 ± 2 | 9 ± 4 | 10 ± 1 | 9 ± 1 | 8 ± 1 |
| Bein | 9 ± 1 | 10 ± 1 | 10 ± 1 | 10 ± 1 | 8 ± 1 |
| Gjeller | 10 ± 1 | 9 ± 2 | 7 ± 1 | 11 ± 1 | 10 ± 2 |
| Magesekk | 9 ± 3 | 22 ± 5 | 33 ± 5 | 40 ± 8 | 20 ± 11 |
| Fortarm | 17 ± 2 | 22 ± 6 | 41 ± 2 | 76 ± 8 | 24 ± 11 |
| Baktarm | 10 ± 1 | 19 ± 3 | 28 ± 1 | 110 ± 13 | 16 ± 6 |
| Feces | 13 ± 2 | 170 ± 2 | 860 ± 14 | 2000 ± 86 | 150 ± 23 |
| Helfisk | | | | | |

Fôrets fluorinnhold økte med økende mengde krill. Tilsvarende resultater fant vi i feces, men her er den prosentvise økningen nesten dobbel av hva vi fant i fôret. Dette kan tyde på at fluor går rett gjennom fordøyelseskanalen. Det ble funnet økende mengder fluor i mage, tynn- og tykktarm i tillegg til helfisk. Stoffer som ikke tas opp vil normalt oppkonsentreres bakover i fordøyelseskanalen. Derimot fant vi ingen endring i fluornivå i muskel, bein, skjell/skinn eller gjeller. Høyst sannsynlig skyldes økningen i fordøyelseskanalen at rester av feces har blitt med i analysen. Videre, økning av fluorinnholdet i helfisk skyldes også bidrag fra fordøyelseskanalen.

Fisk fôret med natriumfluorid (NaF) tilsvarende 150 mg F⁻ kg⁻¹ fôr viste seg å ha et innhold av fluor i feces på et nivå likt fisk fôret med 20 % krillmel. Ser en på innhold av fluor i dette fôret ligger det nært opp til fôret som er tilsatt NaF. Sammenlikner vi disse to gruppene og innholdet av fluor i magesekk, tynn- og tykktarm og helfisk ligger nivåene innenfor samme område. Dette kan sees som en indikasjon på at fluor fra krill er omtrent like tilgjengelig som NaF. Samtidig har det ikke blitt akkumulert fluor i muskel, bein, skinn/skjell eller gjeller i fisk fôret med NaF og dette styrker indikasjonen på at fluor fra krill og NaF "oppfører" seg likt i fiskens fordøyelsessystem.

Torsk, delmål 3

På bakgrunn av dataene fra lakseforsøket, analyserte vi prøver fra fisk fôret med 0 % og 100 % krillmel og fisk fôret med NaF (tilsvarende 150 mg F⁻ kg⁻¹ fôr) i første omgang (tabell 2). Vi analyserte fôr, feces bein, og muskel (tabell 2). Innholdet av fluor i fôret økte med økende mengde krillmel. Videre var nivået av fluor i feces økende med økt innblanding. Innholdet av fluor i bein og muskel var derimot på samme nivå i alle gruppene. Det ble derfor ikke utført fluoranalyser av andre grupper.

Fôringsforsøket pågikk i 75 dager og fisken vokste fra 120 til 250g (snittvekt, ingen forkjeller i vekt ble funnet mellom fôringsgruppene). Det ble heller ikke her endringer i analyser av blodparametre tilsvarende forsøket med laks (Laks 03).

Tabell 2. Innhold av fluor i prøver av torsk (mg F kg^{-1} prøve tørrvekt \pm std, $n=2$)

| Organ/prøve | Andel fiskemel erstattet med antarktisk krillmel | | NaF (*) ($150 \text{ F}^- \text{ mg kg}^{-1}$) |
|-------------|--|---------------|---|
| | 0% | 100% | |
| Fôr | 44 \pm 10 | 790 \pm 40 | 110 \pm 10 |
| Muskel | 11 \pm 1 | 10 \pm 3 | 9 \pm 1 |
| Bein | 8 \pm 1 | 9 \pm 2 | 9 \pm 2 |
| Feces | 59 \pm 7 | 1700 \pm 30 | 290 \pm 20 |

(*) kun fisk i et kar ble fôret med NaF, variasjonen (std) stammer fra variasjon i analysen

Delmål 1, 2 og 6. Laks og kveite fôret med fôr hvor fiskemelet ble erstattet med ulike krillmel og mel fra amfipoder

I det andre lakseforsøket (Laks 04), som også inkluderte regnbueørret, og i kveiteforsøket ønsket en å studere effekten av å erstatte deler av fiskemelet med mel fra ulike kilder krill som f. eks. arktisk krill (*Thysanoessa inermis*), antarktisk krill (*Euphausia superba*) og amfipode (*Themisto libellula*). Ut i fra de erfaringer vi gjorde knyttet til de første forsøkene, valgte vi følgende eksperimentelle fôr: Fiskemel ble byttet ut med 0, 40 eller 60 % mel fra arktisk krill, med 40 % antarktisk krill og med 40 % mel fra amfipoder. I tillegg ble et fôr med $150 \text{ mg F}^- \text{ kg}^{-1}$ fôr (fra NaF) laget for å kunne studere evt. effekt av fluor på laks, kveite og ørret. Samme fôr ble brukt til både Laks 04 og kveiteforsøket.

Laks 04 og regnbueørret, delmål 1 og 2

Tabell 3 viser fluorinnholdet i prøver fra laks fôret med fôr hvor 0 eller 60 % av fiskemelet ble byttet ut med mel fra arktisk krill og fra laks fôret med NaF. Igjen ble det analysert prøver av fôr, bein og muskel. I tillegg analyserte vi nyrer som kunne tenkes å være et utskillingsorgan dersom fluor evt. ble tatt opp og skilt ut med urinen. Vi utelot øvrige organ fordi vi ikke fant noen økning i prøvene som ble analysert, og kan derfor med stor sikkerhet anta at fluor ikke har blitt absorbert i dette forsøket heller.

Fôringsforsøket pågikk i 160 dager og fisken vokste fra 410 til 1500g (snittvekt). Ingen forskjeller i vekst ble funnet mellom fôringsgruppene ved forsøkets slutt. Det ble likevel påvist økt vekst hos fisk fôret med 60 % krillmel i løpet av den første halvdel av fôringsforsøket, og det kan være forårsaket av krillmelet sin egenskap som attraktant. Dette funnet er nøye diskutert av Suontama og medarbeidere (Havforskningsinstituttet). Ingen negative effekter ble observert ved analyser av blodparametre.

Tabell 3. Innhold av fluor i prøver fra laks (mg F kg⁻¹ prøve tørrvekt, n=3) etter 160 dagers fôringsforsøk.

| Organ/prøve | Andel fiskemel erstattet med arktisk krillmel | | NaF (150 F ⁻ mg kg ⁻¹) |
|-------------|---|----------|--|
| | 0% | 60% | |
| Fôr | 50 ± 3 | 340 ± 20 | 180 ± 20 |
| Muskel | 12 ± 1 | 10 ± 2 | 12 ± 1 |
| Bein | 9 ± 1 | 8 ± 1 | 10 ± 1 |
| Nyre | 16 ± 1 | 16 ± 4 | 20 ± 2 |

Tabell 4 viser innholdet av fluor i prøver fra regnbueørret fôret med NaF. Innholdet er i det samme området som lakseprøvene og vi kan derfor hevde at fluor ikke er giftig for regnbueørret som er saltvannstilvendt. Det er viktig å merke seg at tidligere studier har vist at høyt nivå av fluor i fôr til ørret i ferskvann og brakkvann gir økt innhold av fluor i bein.

Tabell 4. Innhold av fluor i prøver fra ørret (mg F kg⁻¹ prøve tørrvekt± std, n=3) etter 160 dagers fôringsforsøk.

| Organ/prøve | NaF (150 F ⁻ mg kg ⁻¹) |
|-------------|--|
| Fôr | 180 ± 20 |
| Muskel | 16 ± 1 |
| Bein | 9 ± 1 |
| Nyre | 7 ± 1 |

Kveite, delmål 6

Tabell 5 viser resultater av fluoranalyser fra kveite fôret med fôr hvor 0 eller 40 % av fiskemelet ble erstattet med arktisk krillmel, 40 % antarktisk krillmel eller 40% amfipodemel. Fôr med mel fra amfipoder hadde absolutt høyest innhold av fluor, men heller ikke her viste resultatene en økning av fluorinnholdet i muskel, bein eller nyre.

Fôringsforsøket pågikk i 150 dager og fisken vokste fra 330 til 680g (snittvekt) og ingen forkjeller ble funnet mellom fôringsgruppene, ei heller ble det observert endringer i blodparametrene.

Tabell 5. Innhold av fluor i prøver fra kveite (mg F kg⁻¹ prøve tørrvekt± std, n=2) etter 150 dagers fôringsforsøk.

| Organ/prøve | Andel fiskemel erstattet med mel fra | | | | NaF (150 F ⁻ mg kg ⁻¹) |
|-------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------------|------------------|--|
| | 0% | Arktisk krill 40% | Antarktisk krill 40% | Amfipoder 40% | |
| Fôr | 50 ± 3 | 220 ± 7 | 380 ± 5 | 1080 ± 60 | 180 ± 20 |
| Muskel | 14 ± 1 | 12 ± 2 | 14 ± 1 | 12 ± 2 | 9 ± 2 |
| Bein | 17 ± 2 | 12 ± 4 | 16 ± 5 | 10 ± 1 | 10 ± 2 |

Innhold av fluor i melene

Tabell 6 viser fluorinnholdet i de tre melene brukt i Laks04- og kveiteforsøket. Det er tydelig at amfipodene inneholder mer fluor enn krill og at antarktisk krill inneholder mer fluor enn arktisk krill, i alle fall i denne studien. Dette kan være av interesse for produsenter av alternative proteinkilder å få undersøkt i og med at øvre tillatte grense (satt av EU) for fluor i fôrråvarer for fiskefôr er 2000 mg kg⁻¹ (88% tørrvekt).

Tabell 6. Innhold av fluor i mel fra antarktisk krill, arktisk krill og amfipoder

| Type | mg F kg ⁻¹ (tørrvekt) |
|------------------|-------------------------------------|
| Arktisk krill | 780 ± 50 |
| Antarktisk krill | 1160 ± 50 |
| amfipodemel | 4000 ± 110 |

Samlet konklusjon

Uavhengig av art eller fluorkilde fant vi ingen økning av fluorinnhold i organer som skinn/skjell, bein, nyre, gjeller og muskel. Fra litteraturen er det kjent at fluor oppkonsentreres i bein i fisk føret med krill, men disse studiene er fra fisk som enten har gått i ferskvann eller brakkvann (Thiews et al 1981, Grave 1980). Samtidig har vi fra tidligere forsøk vist at laks i saltvannsfasen føret med 30 % krillmel ikke fikk økt mengde fluor hverken i muskel eller bein (Julshamn et al. 2004). Ser en på hva som har kommet fram ved studier av giftigheten av fluor løst i vannet, ser en at fluor sin giftighetsgrad avhenger sterkt av mengde løst kalsium og natrium. Altså med økende konsentrasjoner av Na og Ca får en redusert giftighet av F (rewieved by Camargo 2003). Våre forsøk er alle kjørt i saltvann, hvilket også gjelder for forsøket gjennomført av Julshamn et al. (2004) i motsetning til Thiews et al (1981) og Grave et al (1980). I og med at fluor som er løst i vannet reduserer sin giftighet med økende saltholdighet kan det også være at fluor som er i føret har en annen effekt på fisk i saltvann enn i brakkvann og ferskvann.

Videre kan vi konkludere med at fluorinnholdet i disse alternative proteinkildene ikke kan anses som en hindring eller begrensende faktor i forhold til produksjon av fôr til oppdrettsfisk i saltvann.