

## Langtidseffekter av lave omega-3 nivåer i fôr på laksens helse

Bente Ruyter, Marta Bou Mira, Grete Bæverfjord, Tone Kari Østbye, Trine Ytrestøyl, Målfrid Bjerke, Trygve Sigholt (Biomar) og Gerd Berge





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunndalsøra:**

Sjølseng  
NO-6600 Sunndalsøra

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**

# Rapport

ISBN: 978-82-8296-393-0 (trykt)  
ISBN: 978-82-8296-394-7 (pdf)  
ISSN 1890-579X

|   |  |
|---|--|
| <p><i>Tittel:</i><br/><b>Langtidseffekter av lave omega-3 nivåer i fôr på laksens helse</b></p>   | <p><i>Rapportnr.:</i><br/>26/2016</p> <p><i>Tilgjengelighet:</i><br/><b>Åpen</b></p> |
| <p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i><br/>Bente Ruyter, Marta Bou Mira, Grete Bæverfjord, Tone Kari Østbye, Trine Ytrestøyl, Målfrid Bjerke, Trygve Sigholt (BioMar) og Gerd Berge</p>  | <p><i>Dato:</i><br/>2. juni 2016</p>   |
| <p><i>Avdeling:</i><br/>Ernæring og forteknologi</p>  | <p><i>Ant. sider og vedlegg:</i><br/>46</p>  |
| <p><i>Oppdragsgiver:</i><br/>Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)</p>   | <p><i>Oppdragsgivers ref.:</i><br/>FHF # 900957</p>                                  |
| <p><i>Stikkord:</i><br/>Omega-3 fetttsyrebehov, Atlantisk laks, helse</p>   | <p><i>Prosjektnr.:</i><br/>10800</p>   |
| <p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Omega-3 fettstoffer er helt sentrale for en rekke biologiske funksjoner i kroppen, som for eksempel cellenes oppbygging, avlesing av arvematerialet og inflammasjons-respons. Det er for øvrig relativt lite kunnskap om hvor lite omega-3 i fôret oppdrettslaksen kan klare seg med uten at det går ut over helse og velferd. Hensikten med dette prosjektet har dermed vært å øke kunnskapen om hvilke konsekvenser lave nivåer av EPA og DHA i fôret til laks, over store deler av livssyklus, vil ha for fiskens sammensetning og helse i seinere livsfaser.</p> <p>Prosjektet bygger på et fiskemateriale fra NFR prosjektet (224913), hvor atlantisk laks ble fôret med et fiskeoljefritt og fiskemelfritt fôr tilsatt ulike nivåer av EPA, DHA eller en kombinasjon av EPA og DHA fra en fiskestørrelse på 40g til 400g. I FHF prosjektet 900957 ble fisken fulgt videre i sjø på henholdsvis 0,2 %, 1 % og 1,7 % EPA og DHA i fôr fram til slaktestørrelse på ca. 3,5 kg. Resultater fra prosjektet tyder på at 1 % EPA og DHA i fôret, et nivå som tidligere var ansett som nedre behovsnivå, er for lavt til at fisken kan opprettholde god helse under krevende miljøbetingelser. Laks fôret på 1 % EPA og DHA eller lavere, døde i betydelig større grad enn laks fôret med 1,7 % av disse fettstofferne i fôret når fisken ble utsatt for gjentatt håndteringsstress som avlusning ved høye vanntemperaturer. Lave nivå av EPA og DHA i fôret førte bl.a. også til redusert nivå av astaxanthin og EPA og DHA nivå i muskel, økt mengde fett i lever og rundt innvoller, manglende virvelmellomrom i rygggrad og histologiske endringer i midttarm. Denne studien har også vist at lave nivåer av omega-3 i fôret har ulik innvirkning på sammensetningen av membranlipidene til ulike vev. Spesielt i skinnen blir DHA i veldig stor grad erstattet av arakidonsyre (20:4n-6) når DHA nivået reduseres. Samme trend ble observert for tarmens fosfolipider, men i mindre grad enn i skinnen. Lever er et av de mest konserverte vevene med tanke på EPA og DHA. For å sikre en robust laks i sjø, som tåler den håndteringen den møter under naturlig variasjoner i oppdrettsbetingelser, så tyder dataene fra prosjektet på at oppdrettslaksen må ha over 1 % marine omega-3 fettstoffer i fôret for å dekke sitt behov.</p> |  |
| <p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>The omega-3 fatty acids EPA and DHA are essential components in salmon diets due to their important biological functions. More knowledge is required about the minimum requirements that secures the health of Atlantic salmon throughout life. The aim of this project was to study the health consequences of using low dietary levels of EPA and DHA over much of the fish's life cycle. The results shows that 1 % EPA and DHA in the diet of Atlantic salmon, a level previously regarded as the requirement level, is too low to maintain good health under demanding environmental conditions.</p>  |  |

# Innhold

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Sammendrag</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Innledning</b>  | <b>2</b>  |
| 2.1      | Faglig bakgrunn  | 2         |
| <b>3</b> | <b>Prosjektorganisering</b>                                    | <b>3</b>  |
| 3.1      | Prosjektets resultatmål  | 3         |
| 3.2      | Prosjektets effektmål  | 3         |
| <b>4</b> | <b>Prosjektgjennomføring</b>                                   | <b>4</b>  |
| 4.1      | Forsøksfiskens forhistorie                                     | 4         |
| 4.2      | Lusebehandlinger i løpet av forsøksperioden                    | 7         |
| 4.3      | Registreringer i løpet av forsøksperioden fra mai til november | 8         |
| 4.4      | Fôr i forsøksperioden  | 8         |
| 4.5      | Analyser   | 11        |
| 4.5.1    | Kjemiske analyser i fôr  | 11        |
| 4.5.2    | Fett ekstraksjon og Fettsyresammensetning                      | 11        |
| 4.5.3    | Plasma eikosanoider  | 11        |
| 4.5.4    | Genuttryksanalyse  | 11        |
| 4.5.5    | Analyse av LPS i plasma  | 12        |
| 4.5.6    | Røntgenanalyse av ryggrad                                      | 12        |
| 4.5.7    | Mikroskopianalyse av skinn og tarm                             | 12        |
| 4.5.8    | Metode for analyse av astaxanthin og idoxanthin i muskel       | 13        |
| 4.6      | Formler  | 13        |
| 4.7      | Statistiske beregninger  | 13        |
| <b>5</b> | <b>Resultater og diskusjon</b>                                 | <b>15</b> |
| 5.1      | Vekst og overlevelse   | 15        |
| 5.2      | Røntgenanalyser av ryggrad                                     | 16        |
| 5.3      | Muskel   | 18        |
| 5.3.1    | Fettsyrer i muskel   | 18        |
| 5.3.2    | Astaxanthin  | 20        |
| 5.4      | Tarm   | 22        |
| 5.4.1    | Fett % og fettsyresammensetning av lipidklasser i tarm         | 24        |
| 5.4.2    | Genuttrykk i tarm  | 27        |
| 5.4.3    | Mikroskopi av tarm   | 29        |
| 5.4.4    | LPS i plasma   | 31        |
| 5.4.5    | Innvollsfettscore  | 33        |
| 5.5      | Lever  | 33        |
| 5.5.1    | Leverindeks  | 33        |
| 5.5.2    | Fett % lever   | 33        |
| 5.5.3    | Fettsyrer i totale polare og nøytrale lipidklasser i lever     | 34        |
| 5.6      | Skinn  | 38        |
| 5.6.1    | Skinn histologi  | 38        |
| 5.6.2    | Fettsyrer i skinn  | 39        |

|          |                         |           |
|----------|-------------------------|-----------|
| <b>6</b> | <b>Konklusjon .....</b> | <b>43</b> |
| <b>7</b> | <b>Leveranser .....</b> | <b>45</b> |
| <b>8</b> | <b>Referanser .....</b> | <b>46</b> |

## 1 Sammendrag

Omega-3 fettsyrer er helt sentrale for en rekke biologiske funksjoner i kroppen, som for eksempel cellenes oppbygging, avlesing av arvematerialet og inflammasjons-respons. Men det er ennå ikke klarlagt hvor lite omega-3 i fôret oppdrettslaksen kan klare seg med uten at det går ut over fiskens helse og velferd. Hensikten med dette prosjektet har vært å øke kunnskapen om hvilke konsekvenser lave nivåer av EPA og DHA i fôret til laks, over store deler av livssyklus, vil ha for fiskens sammensetning og helse i seinere livsfaser.

Prosjektet bygger på et fiskemateriale fra NFR prosjektet (224913), hvor atlantisk laks ble fôret med et fiskeoljefritt og fiskemelfritt fôr tilsatt enten ulike nivåer av EPA, DHA eller en kombinasjon av EPA og DHA fra en fiskestørrelse på 40 g til 400g. I FHF prosjektet 900957 ble fisken fulgt videre i sjø på henholdsvis 0,2 %, 1 % og 1,7 % EPA og DHA i fôret fram til slaktestørrelse på ca. 3,5 kg. Resultater fra prosjektet tyder på at 1 % EPA og DHA i fôret, et nivå som tidligere var ansett som nedre behovsnivå, er for lavt til at fisken kan opprettholde god helse under krevende miljøbetingelser. Laks fôret på 1 % EPA og DHA eller lavere, døde i betydelig større grad enn laks fôret med 1,7 % av disse fettsyrene i fôret når fisken ble utsatt for gjentatt håndteringsstress som avlusning ved høye vanntemperaturer. Lave nivå av EPA og DHA i fôret førte bl.a. også til redusert nivå av astaxanthin i muskel, økt mengde fett i lever og rundt innvoller, manglende virvelmellomrom i ryggrad og histologiske endringer i midttarm. Studien viste at lave nivåer av omega-3 i fôret har stor innvirkning på sammensetningen av membranlipidene til de ulike vev. Spesielt i skinnet ble DHA i veldig stor grad erstattet av arakidonsyre (20:4n-6) når DHA nivået i fôret ble redusert. For å sikre en robust laks i sjø som tåler den håndteringen den møter under naturlig variasjoner i oppdrettsbetingelser, så tyder dataene fra prosjektet på at oppdrettslaksen må ha over 1 % marine omega-3 fettsyrer i fôret for å dekke sitt behov.

## 2 Innledning

### 2.1 Faglig bakgrunn

Når planteprotein og planteoljer til stor grad erstatter marine ingredienser i laksefôret, blir også mengden av EPA+DHA, omega-6 og enumettet fett endret (Torstensen et al., 2013, Ytrestøyl et al., 2014). Det er forventet at endringene i fettsyresammensetningen i fôret til laks vil ha konsekvenser for fiskens vekst, utvikling og helse. Grunnen er at fett og fettsyrer er helt sentrale for en rekke biologiske funksjoner, som for eksempel regulering av cellenes oppbygging og avlesing av arvematerialet og inflammasjonsrespons. Hvilke konsekvenser endringer i fettsyresammensetning i fôret har for fiskens helse og velferd avhenger blant annet av fiskens egne minimumsbehov for EPA og DHA. Kriteriene for fastsetting av ernæringsbehov er ikke klart definert. Tidligere studier har vist at laks har et minimumsbehov på ca 1 % EPA og DHA i fôret i ferskvannsfasen for å opprettholde god tilvekst (Ruyter et al., 2000a,b). Men hittil har ernæringsbehov hos laks stort sett vært definert ut i fra tilvekst og overlevelse i korttidsforsøk, og i henhold til rapport av Torstensen et al., 2013, ble det fastslått at en ny definisjon for ernæringsbehov bør også omfatte informasjon om nivå som gir optimal ytelse i henhold til en rekke kriterier knyttet til vekst, fravær av symptomer på mangel, optimal fiskehelse (inkludert motstandskraft mot sykdom). Det er viktig å definere tidlige symptomer på omega-3 fettsyremangel, siden sub-optimale mangeltilstander i tidlige livsfaser antagelig kan føre til økt helserisiko i seinere livsfaser, selv når mangelen ikke er manifestert ved åpenbare symptomer som redusert vekst og økt dødelighet. Det mangler kunnskap om hvilke konsekvenser lave nivåer av EPA og DHA i fôret over store deler av livssyklus vil ha for fiskens helse i seinere livsfaser fram til slaktestørrelse.

*Hovedmålet med dette prosjektet har vært å studere hvordan lave nivåer av EPA og DHA i fôret til laks gjennom hele livsløpet påvirker helsen til laksen.*

### **3 Prosjektorganisering**

Nofima har hatt prosjektlederansvar. Biomar har vært ansvarlig for fôrproduksjonen.

Styringsgruppen for prosjektet har bestått av Øyvind Oaland, Marine Harvest, Eldar Bendiksen, Salmar, Arne Schei, Lerøy og Tommy Hansen, Nordlaks. Merete Bjørgan Schrøder har fulgt opp prosjektet fra FHF's side.

#### **3.1 Prosjektets resultatmål**

Hovedmålet med prosjektet har vært å øke kunnskapen om hvordan lave nivåer av EPA og DHA ulike livsfaser påvirker laksens ytelse og helse.

#### **3.2 Prosjektets effektmål**

Resultater fra prosjektet vil bidra til å gjøre næringsaktørene innenfor lakseoppdrett bedre rustet til å vurdere hvilke nedre nivåer av EPA og DHA i ulike livsfaser som sikrer laksen god helse (robust fisk), og dermed kunne bidra til å redusere dødelighet i sjø.



## 4 Prosjektgjennomføring

### 4.1 Forsøksfiskens forhistorie

Prosjektet bygger på et forsøksmateriale fra NFR-prosjektet 224913, hvor hensikten var å studere effekter av ulike EPA og DHA nivåer i laksefôr på laksens helse i 2 tidlige livsfaser, henholdsvis fra 40 gram fiskestørrelse til 400 gram i fase 1 og fra 400 gram til ca 1 Kg i fase 2. I fase 1 ble fisken fôret med ulike konsentrasjoner av EPA alene, DHA alene og en miks av EPA og DHA. Basisfôret var et fiskoljefritt og fiskemel-fritt fôr. Laksen ble fulgt fra startvekt 40 gram opp til 1 kg i innendørs kar på Nofima Sunndalsøra. Ved oppstart av forsøket (40 gram) var fisken ferdig smoltifisert og klar til å settes på sjøvann.

**EPA og DHA nivåer i ulike fôr i fase 1 (totalt 14 ulike dietter), fiskestørrelse fra 40 gram til 400 gram:**

1. 0 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 % og 2 % EPA
2. 0 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 % og 2 % DHA
3. 0 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 % og 2 % EPA+DHA
4. Tilnærmet kommersiell kontroll diett (TK) (2,2 % EPA + DHA, her er det benyttet fiskemel og fiskeolje).

I fase 2 ble fisken fra de 14 eksperimentelle gruppene over, overført til 9 kar og 3 ulike dietter (3 gjentak per diett). All fisk var individmerket. Fisk fra de ulike pre-diettføringsgruppene ble likt representert i de 9 karene.

**EPA og DHA nivåer i ulike i fôr i fase 2, fiskestørrelse 400 gram til 1000 gram:**

1. 1,7 % EPA + DHA (6,6 % av totale fettsyrer) (tilnærmet kommersiell kontroll)
2. 1 % EPA + DHA (4,1 % av totale fettsyrer)
3. 0,2 % EPA + DHA (0,4 % av totale fettsyrer)

Etter siste veiing og prøveuttak i NFR prosjektet 224913, ble restfisk overtatt av FHF-prosjektet 900957. Fisken var individveid før transport fra Sunndalsøra, og snittvekt i de 9 gruppene varierte fra 1172 til 1430 gram. Fisken ble overført fra de 9 forsøkskarene på Sunndalsøra til 9 merder i sjø ved Helgeland Havbruksstasjon på Dønna. Fisken i fase 3 ble fôret videre med de samme tre diettene som i fase 2.

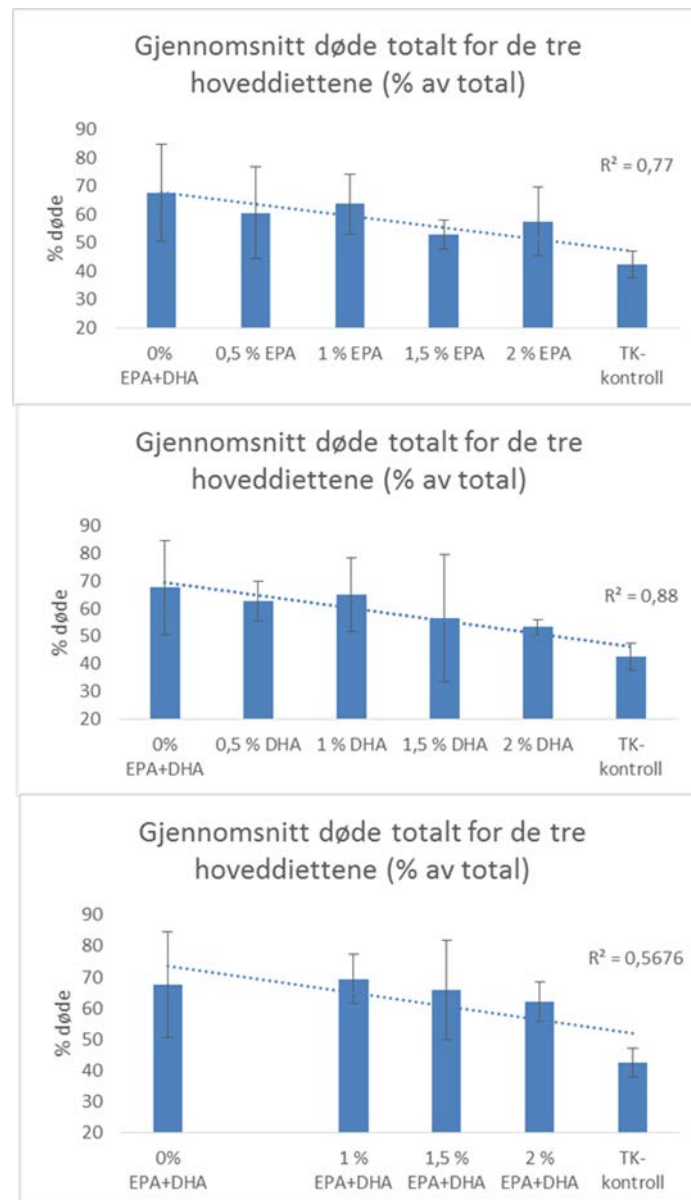
**EPA og DHA nivåer i ulike fôr i fase 3, fiskestørrelse 1 kg til 3,5 kg:**

1. 1,7 % EPA + DHA (tilnærmet kommersiell kontroll)
2. 1 % EPA + DHA
3. 0,2 % EPA + DHA

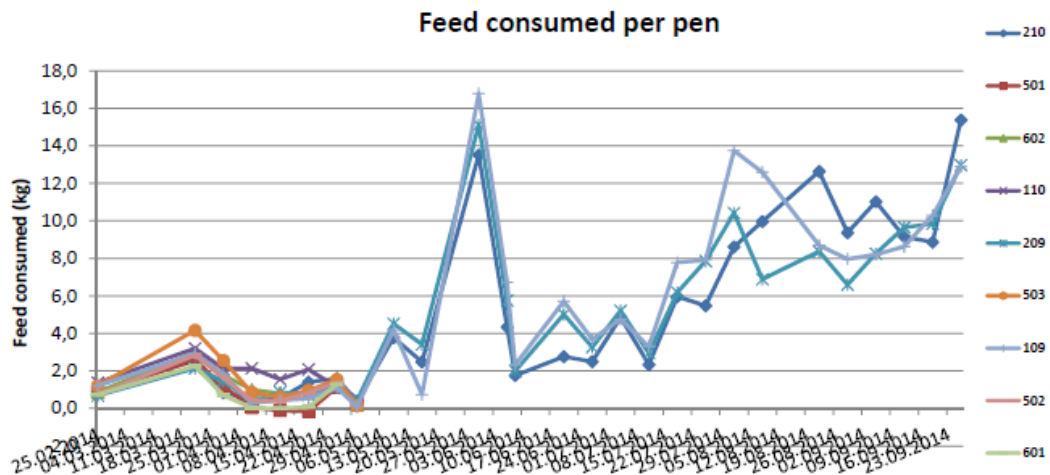
**Tap etter overføring av forsøksfisk med tankbil fra Sunndalsøra til Helgeland Havbruksstasjonen**

Fisken ble transportert med tankbil, i februar 2014. Fisk fra 9 innendørskar 3 fôrgrupper og tre gjentak ble overført til 9 forsøksmerder på 5m\*5m, Helgeland Havbruksstasjon, Dønna. På dette tidspunktet hadde fisken nådd en snittvekt på over 1 kg, så håndtering og transport og overføring til lavere vanntemperatur ble til sammen en stor påkjenning for fisken. Kort tid etter overføring til Dønna ble det oppdaget sår på en del av fisken, spesielt rundt halepartiet, noe som tydet på skader pga. håndtering. I løpet av de neste 4 ukene ble det relativt stor dødelighet i alle de 9 merdene (Figur 1). Det var ulik dødelighet i ulike merder, noe som også medførte at vi satt igjen med ulikt antall fisk i merdene. Det var for øvrig en helt klar trend i hver merd til at sammensetningen av pre-diett i i fase 1

fra fiskestørrelse mellom 40 gram til 400 gram hadde effekt på dødelighet når fisken var i snitt 1,2 kg. Økende nivå av DHA i fôret i de tidligste livsfaser førte til lavere dødelighet. Fra overføringen fra Sunndalsøra til Helgeland Havbruksstasjon og frem til 20 april hadde ca 60 % av fisken dødd i mangelgruppen sammenlignet med ca 40 % i kontrollgruppen med det høyeste nivået av EPA og DHA i fôret (Figur 1). Størst dødelighet ble observert de 4 første ukene i sjø, deretter avtok dødeligheten gradvis frem til april hvor den avtok helt.



Figur 1 Gjennomsnittlig dødelighet i forsøksmerdene (samlet snitt for de 9 forsøksmerdene). Gjennomsnittlig % døde per pre-diettgruppe for 9 forsøksmerder.



Figur 2 Gjennomsnittlig fôrinntak i de ulike forsøksmerdene i løpet av forsøksperioden i sjø. Det er 9 forsøksmerder i perioden fra 25 februar til 30 april 2014, deretter 3 forsøksmerder

Pga. få fisk tilbake og ulikt antall fisk tilbake i hver merd etter dødeligheten i første periode i sjø, ble det besluttet å redusere antall merder fra 9 til 3 den 30. april 2014. En merd per forsøksfôr i fase 3 og ca 200 fisk per merd. Forsøket ble i prinsippet startet på nytt etter at dødeligheten hadde avtatt og fisken ble overført fra 9 til 3 forsøksmerder. All fisk ble veid ved overføring til 3 forsøksnøter. I hver merd ble de ulike pre-diettgruppene likt representert. Figur 2 viser at fôrinntaket økte etter at dødeligheten avtok og fisken ble overført til 3 forsøksnøter.

### Temperatur, salinitet og oksygen

Temperatur, salinitet og oksygen ble logget hvert 15. minutt (tilgjengelig via nettsiden [www.havforsk.com](http://www.havforsk.com) med brukernavn: fjord og passord: storvik 508). Fra utsett i merder 19.02.2014 og fram til midten av april var temperaturen rundt 5 °C. Deretter steg temperaturen gradvis fram til slutten av juli, da høyeste temperatur ble målt til 17,5 °C, før temperaturen gradvis gikk nedover til 9 °C ved avslutning av forsøket midt i november 2014 (Figur 3).



Figur 3 Vanntemperatur i forsøksperioden fra februar 2014 til november 2014.

## 4.2 Lusebehandlinger i løpet av forsøksperioden

Fisken ble avluset i 4 omganger i henhold til standard prosedyrer ved Helgeland havbruksstasjon.

Oversikten under viser dato for avlusning, legemiddel benyttet og holdetid under avlusningsbehandling.

### Avlusning 25. april, Vanntemperatur 5,7°C

Legemiddel:

1) Trident vet (0,2 g/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 45 min

2) Alphamax: 0,2 ml/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 35 min

### Avlusning 10. juli, Vanntemperatur 11,7°C

Legemiddel:

1) Trident vet (0,2 g/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 40 min

2) Alphamax) 0,4 ml/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 30 min

*(Kommentar, det ble registrert akutt dødelighet i forb. med avlusning og i etterkant)*

#### **Avlusning 20. august. Vanntemperatur 10,3°C**

Legemiddel

1) Trident vet (0,2 g/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 35 min

2) Alphamax 0,4 ml/m<sup>3</sup>)

Holdetid) 35 min

*(Kommentar, det ble registrert akutt dødelighet i forb. med avlusning og i etterkant)*

#### **Avlusning 6. november, vanntemperatur 9,1°C**

Legemiddel)

1) Trident vet (0,2 g/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 31 min

2) Alphamax (0,3 ml/m<sup>3</sup>)

Holdetid: 21 min

Fisk i alle merder fikk Slice vet i periodene 10.-20. juni, og 11.-18. september.

### **4.3 Registreringer i løpet av forsøksperioden fra mai til november**

Det ble foretatt en mellomveeing (etter 8 uker) og sluttveeing (etter 38 uker) på Helgeland Havbruksstasjon. Død fisk ble registrert og veid, og PIT-tags ble lest og tatt ut. Ark med data for hver dødfisk, med PIT-tag-merke limt på, ble sendt Sunndalsøra for å inkludere dødelighetsdata i hoveddatafil for forsøket og tilknyttet vektdata og dato.

Ved avslutning av forsøket ble all fisk slaktet, individvekter registrert og det ble tatt individprøver av flere organer til analyser. Lever og hjerte ble fotografert og undersøkt for evt. abnormaliteter, inkludert forekomst av fettlever. Hepatosomatisk indeks (HSI) og cardiosomatisk indeks (CSI) ble registrert og det ble scoret for mengde innvolls fett. Fra hver fisk ble det tatt blodprøver. Det ble tatt ut vev og organer som ble frosset på flytende nitrogen og fiksert i formalin for senere analyser av helsemarkører, fettsyrer, lipidklasser og fettnivå. Personale fra Nofima var ansvarlig for prøveuttak, personale fra HHS gjorde vurdering (scoring av tarm) og filetering av fisk.

### **4.4 Fôr i forsøksperioden**

Fôr brukt i forsøket ble produsert av BioMar AS. Utfôringsstrategi var lik for alle diettgrupper i forsøket, og fulgte de rutiner som HHS Dønna har utviklet for appetittfôring og som medfører en overfôring på ca 10 %. Det ble benyttet to måltid pr dag ved temperaturer >8 °C, og ett måltid per dag ved temperaturer <8 °C. Fôrintak pr merd ble registrert ukentlig basert på utfôret mengde, og korrigeringsfaktor for fôrspill samlet opp ved hjelp av LiftUp. Fôrformulering er vist i tabell 1, kjemisk sammensetning av fôret i tabell 2 og fettsyresammensetning av fôret i tabell 3. Fôrene inneholdt ca 34 % fett og 36 % protein. Forsøksfôr A var basert på et fiskemelsfritt og et fiskeoljefritt basisfôr, hvor oljekilden var rapsolje, fjørfeolje og linfrøolje. Hovedproteinkilden var fjørfemel. Fôr B var også fiskemelsfritt, men tilsatt fiskeolje slik at EPA og DHA nivået var 1 % i fôret. Fôr C var tilnærmet et kommersielt fôr tilsatt både fiskemel og fiskeolje. Alt fôr var konstruert basert på spesifikasjoner for det kommersielle fôret CPK 1000 fra BioMar. Nofimas vitamin og mineral-blanding ble brukt i fôr A og B. I alle fôr ble 3,0% krillmel brukt som en appetitt-forsterker.

Tabell 1 Fôrformulering.

| Diett 7 mm                    | A              | B            | C                           |
|-------------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|
|                               | 0,2% EPA + DHA | 1% EPA + DHA | 1,7% EPA+DHA<br>TK-kontroll |
| Fiskemel <sup>1</sup>         |                |              | 15,000                      |
| Fjørfeemel <sup>3</sup>       | 18             | 18           |                             |
| Krillmel <sup>2</sup>         | 3,0            | 3,0          | 3,0                         |
| Soya protein konsentrat (SPC) | 24,97          | 25           | 25                          |
| Hvete gluten                  |                | 0            | 1                           |
| Mais gluten                   | 5,0            | 5,0          | 7,0                         |
| Erteprotein                   | 5,140          | 6,150        | 0,000                       |
| Hvete                         | 11,2           | 10,81        | 12                          |
| Hestebønner ( avskallet)      |                |              | 8,05                        |
| Fiskeolje <sup>4</sup>        |                | 11,08        | 17,19                       |
| Rapsolje <sup>5</sup>         | 7,5            | 5            | 9,83                        |
| Linfrøolje                    | 5              | 5            |                             |
| Fjørfeolje <sup>3</sup>       | 15             | 6,51         |                             |
| Mono-calcium fosfat (MCP)     | 1,24           | 1,21         | 1,9                         |
| Aminosyrer                    | 1,090          | 0,440        | 0,830                       |
| Process additives             | 0,330          | 0,330        | 0,280                       |
| Ethoxyquin 66,6%, tørr        | 0,02           | 0,02         |                             |
| Lucatin pink                  | 0,04           | 0,04         | 0,04                        |
| Vitamin og mineraler          |                |              | 0,49                        |
| Vitamin NOFIMA                | 2,0            | 2,0          |                             |
| Mineral NOFIMA                | 0,52           | 0,52         |                             |
| YTTRIUM                       | 0,05           | 0,05         | 0,05                        |
| Water change                  | -0,1           | -0,15        | -1,64                       |
| Total                         | 100,0          | 100,0        | 100,0                       |

<sup>1</sup> Blanding av Nord-Atlantisk og Sør-Amerikansk fiskemel

<sup>2</sup> Aker BioMarine

<sup>3</sup> GePro, Vertiebgesellschaft, Diepholz, Tyskland

<sup>4</sup> Nord-Atlantisk fiskeolje, hovedsakelig lodde.

<sup>5</sup> Rapeseed oil, crude

Tabell 2 Kjemisk sammensetning av fôret.

|               | 0,2 % EPA + DHA | 1% EPA + DHA | 1,7 % EPA+DHA<br>TK-kontroll |
|---------------|-----------------|--------------|------------------------------|
| Tørrstoff, %  | 95,2            | 96,3         | 95,3                         |
| Fett,%        | 32,4            | 34,5         | 31,6                         |
| Protein, %    | 37,3            | 36,1         | 36,2                         |
| Aske, %       | 6,0             | 6,1          | 6,4                          |
| Energi, MJ/kg | 24,3            | 24,4         | 23,8                         |

Tabell 3 Fettsyresammensetning av fôr 7mm (% av totale fettsyrer).

| Fettsyre<br>(% av totale fettsyrer) | 0,2% EPA + DHA | 1% EPA + DHA | 1,7% EPA+DHA<br>TK-kontroll |
|-------------------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|
| C 12:0                              | 0,8            | 0,4          | 0,1                         |
| C 14:0                              | 1,0            | 3,3          | 4,5                         |
| C 16:0                              | 14,2           | 11,9         | 8,3                         |
| C 18:0                              | 4,2            | 3,2          | 1,5                         |
| C 20:0                              | 0,3            | 0,3          | 0,4                         |
| C 24:0                              | 0,1            | 0,1          | 0,2                         |
| Sum SAT                             | 20,6           | 19,1         | 14,8                        |
| C 16:1 n-9                          | 0,2            | 0,2          | 0,1                         |
| C 16:1 n-7                          | 2,8            | 4,5          | 5,4                         |
| C 18:1 n-9                          | 38,1           | 26,2         | 26,8                        |
| C 18:1 n-7                          | 1,2            | 1,6          | 2,2                         |
| C 20:1 n-7                          | 0,0            | 0,3          | 0,5                         |
| C 22:1 n-11                         | 0,4            | 8,1          | 12,5                        |
| C 22:1 n-9                          | 0,1            | 0,8          | 1,3                         |
| C 24:1 n-9                          | 0,1            | 0,3          | 0,6                         |
| Sum MUFA                            | 43,2           | 42,8         | 50,3                        |
| C 18:2 n-6                          | 21,1           | 13,1         | 8,1                         |
| C 18:3 n-6                          | 0,1            | 0,1          | 0,1                         |
| C 18:3 n-4                          | 0,1            | 0,1          | 0,0                         |
| C 18:3 n-3                          | 11,4           | 11,4         | 4,2                         |
| C 20:4 n-3                          | 0,2            | 0,8          | 1,2                         |
| C 20:1 n-9                          | 0,8            | 7,0          | 10,5                        |
| C 20:2 n-6                          | 0,1            | 0,2          | 0,2                         |
| C 20:3 n-6                          | 0,1            | 0,1          | 0,0                         |
| C 20:4 n-6                          | 0,3            | 0,2          | 0,2                         |
| C 20:5 n-3                          | 0,4            | 2,4          | 3,9                         |
| C 22:5 n-3                          | 0,1            | 0,2          | 0,4                         |
| C 22:6 n-3                          | 0,3            | 1,1          | 2,1                         |
| Sum PUFA                            | 35,0           | 36,5         | 30,6                        |
| Sum EPA+DHA                         | 0,7            | 3,5          | 6,0                         |
| Sum N-3                             | 12,4           | 15,8         | 11,6                        |
| Sum N-6                             | 21,8           | 13,7         | 8,6                         |

Sum SAT inkluderer fettsyrene 15:0, 17:0 og sum MUFA inkluderer 14:1n-5, 16:1n-5, 17:1n-7, 22:1n-7 ( $\leq 1$  % av total fettsyre)

## 4.5 Analyser

### 4.5.1 Kjemiske analyser i fôr

Fôret ble analysert for tørrstoff (tørketap ved 103 °C til stabil vekt; ISO 6496: 1999), aske (forbrenning ved 550 °C, ISO 5984: 2002), råprotein (Nx6.25, forbrenning etter Dumas prinsippet, ISO 16634-1), bruttoenergi (bombekalorimetri; ISO 9831:1998) og råfett (Folch et al., 1957, etter syrehydrolyse).

### 4.5.2 Fett ekstraksjon og Fettsyresammensetning

Fett ble ekstrahert fra muskel, lever, skinn og tarm som en Folch ekstraksjon (Folch et al., 1957). Deretter ble fettsyrene i ekstraktet trans-forestret til fettsyre metyl estere (FAME) etter en metode beskrevet av Mason og Waller (1964). Fettsyresammensetning ble bestemt ved bruk av Hewlett Packard 6890 gass kromatograf (GC) utstyrt med en ID-BP $\times$ 70 kolonne (SGE, Melbourne, Australia; 60 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film) med helium som bæregass. Temperaturprogram; 50°C i 1.2min, 50°C til 170°C med 4°C/min, til 200°C med 0.5°C/min, og til 300°C med 10°C/min. FAME ble detektert ved hjelp av en flammeionisasjons-detektor (FID) og fettsyresammensetning verifisert ved hjelp av standard 68D (Nu-Check Prep Inc).

For separering av ulike lipidklasser, ble Folch-ekstraktet (tilsatt BHT (0.7 mg/l) dampet inn under nitrogengass og re-oppløst i kloroform. Fri fettsyrer (FFA), fosfolipider(PL), triacylglyseroler (TAG) ble separert ved hjelp av tynnskikt-kromatografi (TLC) med mobilfase: petroleumeter:dietyl eter:eddiksyre (113:20:2 v/v/v). De ulike lipidklassene ble visualisert ved å dyppe platen i en kobber-løsning. Flekkene som korresponderte til henholdsvis FFA, PL og TAG ble identifisert ved sammenligning med kjente standarder ved hjelp av en Bioscan AR-2000 imaging scanner (Bioscan Inc., Washington, DC, USA). De ulike lipidklassene ble så skrapet ut, ekstrahert og FAME produsert og fettsyrer i lipidklasser bestemt i henhold til metoden beskrevet over.

### 4.5.3 Plasma eikosanoider

Eikosanoider ble målt i samleprøver av plasma fra ekstrem pre-diettgrupper innen hver hoved-diett. Samleprøvene ble laget ved å slå sammen like mengder plasma fra fisk som hadde fått samme pre-diett. Prostaglandin E2 (PGE2) ble analysert i plasma ved hjelp av assay kit (KGE004B Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit fra R&D systems (Minneapolis, MN, USA).

### 4.5.4 Genuttryksanalyse

Total RNA ble ekstrahert fra tarm ved bruk av Trizol og Purelink Pro 96 Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) i henhold til produsentens protokoll. RNA ble behandlet med RNase-free DNase I for å fjerne kontaminerende DNA (Life Technologies, Carlsbad, USA). cDNA syntese ble laget fra 1000 ng total RNA i et volum på 20  $\mu$ L med TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents (Life Technologies, Carlsbad, USA). Reaksjonen ble kjørt 10 minutter ved 25 °C, 48 °C i 60 minutter, og 95 °C i 5 minutter. PCR reaksjonen ble kjørt med 4  $\mu$ L cDNA (1:10 fortynnet), 1  $\mu$ L primer miks (tabell x, 0.5  $\mu$ M av hver primer) og 5  $\mu$ L SYBR green master miks under følgende betingelser: 95 °C i 5 sekunder, 45 sykluser med 95 °C i 15 sekunder/60 °C i 15 sekunder/ 72 °C i 15 sekunder. ef1a og eif3 ble evaluert



som referansegener (reffinder, <http://fulxie.0fees.us/>), og ef1a ble vurdert til å være mest stabil (Tabell 4). Smeltepunktsanalyse ble kjørt for å bekrefte amplifisering av kun et fragment. Relativt genuttrykk ble beregnet ved  $\Delta\Delta C_t$  metoden.

Tabell 4 Oversikt over genbanknummer og primeresekvens.

|            | Genbank nummer | Primer 1 (5'-3')          | Primer 2 (5'-3')          |
|------------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| cox1       | nm_001140374   | gaggccagacaggctttgat      | ggctggaggacattgaagg       |
| cox2       | ay848944       | ccccgacttacaatgctga       | gcggtcccataggtgtagg       |
| etif       | dw542195       | caggatgttgttgctggatggg    | acccaactggcagggtcaaga     |
| ef1a       | af321836       | caccaccggccatctgatctaca   | tcagcagcctccttctgaacttc   |
| bcmo1      | nm_001279071   | tgttgcaatgtcagcagtg       | aatgaacacgggctctgatg      |
| bcmo1-like | nm_001279074   | atggctcaagagtgagtg        | ggctcagaggggtagcagtc      |
| bcmo2a     |                | agaataaggatcatcattacagacg | ccagagtggattagtggaattt    |
| bcmo2b     |                | tcagacacctgtggggagac      | agggaacgaacacaggctct      |
| bcmo2c     |                | gacacctgttcagcgactcc      | caggctcagatgggaacaga      |
| nrf2       | bt059007       | ccggactcctcgccttcgga      | gtggatagttggcttgccttcgt   |
| aco        | dq364432       | ccttcattgtacctctccgca     | catttcaacctcatcaaagcaa    |
| d6fad_b    | gu207400       | tgacctgtggagagtgaggg      | aactttttagtagctgattccagct |
| elovl5b    | nm_001136552   | gcaaccttgacccaacagg       | ccttgctctacgcaaggga       |
| nfkb       | ca341859       | cagcgtcctaccaggctaaagagat | gctgttcgatccatccgcatat    |

#### 4.5.5 Analyse av LPS i plasma

Lipopolysakkarider (LPS) ble målt i samleprøver av plasma fra ekstrem pre-diettgrupper innen hver hoveddiett. LPS ble analysert i plasma i henhold til analyseprotokoll til analysekit ELISA Cat. No. KT-32191 fra KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY.

#### 4.5.6 Røntgenanalyse av ryggrad

Til røntgenanalyse ble det brukt 225 fisk som ble frosset inn ved avslutning av forsøket og sendt til Nofima Sunndalsøra for undersøkelse. Fisken fordelte seg slik: 0,2 % EPA + DHA (65 fisk), 1 % EPA + DHA (69 fisk), 1,7 % EPA+DHA TK-kontroll (91 fisk). Innen hver gruppe var det mellom 1 og 14 fisk per pre-diett (40-400g), med et gjennomsnitt på 5. Fisken ble røntgenfotografert i et semi-digitalt oppsett, med digital optimalisering og lagring av bildene. Det ble brukt lange bildeplater som bestod av to filmer som ble skjøtt sammen til ett bilde etter avlesning. Det var 1-2 fisk pr bilde. Ved avlesning ble det lagt på å registrere spesifikke misdannelser i ryggraden så vel som eventuelle mer uspesifikke avvik fra det normale.

#### 4.5.7 Mikroskopianalyse av skinn og tarm

Til histologisk analyse av skinn og tarm ble det brukt formalinfikserte vevsprøver som var tatt ved avslutning av forsøket. Vevsprøvene ble renskåret og støpt inn i parafin før det ble skåret tynne snitt. Snittene ble farget med hematoxylin og eosin (HE-farging) før undersøkelse i lysmikroskop. Snittene ble evaluert i flere runder. Første bedømmelse var blind, uten kjennskap til gruppetilhørighet. I denne runden ble variasjonen i materialet bedømt. I andre runde ble snittene bedømt gruppevis, med vekt på å finne fellestrekk for ulike grupper. Til slutt ble det tatt bilder av snittene og gjort målinger av ulike egenskaper som kunne tenkes si noe om forskjeller mellom gruppene. Følgende målinger ble gjort:

| Skinn                           | Tarm   |
|---------------------------------|--|
| Tykkelse av hudlaget            | Måling av høyde på tarmfolder                  |
| Tykkelse av basalcellelag       | Scoring av antall mucusceller                  |
| Antall mucusceller pr mm lengde | Vurdering av vakuolisering av tarmepitelceller |

#### 4.5.8 Metode for analyse av astaxanthin og idoxanthin i muskel

2 g muskel homogeniseres og tilsettes vann/metanol med BHT (3 ml) og 9 ml cloroform. Prøven ekstraheres for karotenoider på is og beskyttet mot lys i 40 min. Deretter sentrifugeres prøven (10 min, 3000 rpm). Etter sentrifugering tas 5 ml av cloroformfasen til inndamping i vannbad med nitrogengass til prøven er helt tørr. Prøven løses så i mobilfase (2 ml, 20 % aceton i n-hexan), prøven filtreres (0.45 µm) over i HPLC glass og leses av på en Spherisorb Phase Sep nitrile kolonne (250 mm x 4.6 mm, S5, flow 1.5 ml/min, trykk 50 kgf/cm<sup>2</sup>). Deteksjon ved VIS 470 nm, retensjonstiden er ca 3.9 min for trans astaxanthin og ca 4.6 min for cis astaxanthin, 6.1 min for cis idoxanthin og ca 7.9 min for trans idoxanthin. Responsfaktor for astaxanthin standard brukes til beregning av astaxanthin og idoxanthin.

#### 4.6 Formler

- **Spesifikk vekstrate** (% d<sup>-1</sup>);  $SGR = \ln (W_2/W_1) \times (t_2-t_1)^{-1} \times 100$ , hvor  $W_1$  og  $W_2$  er fiskevekt (g) ved tidspunktene (dag)  $t_1$  og  $t_2$ .
- **Vekstfaktor** (Thermal growth coefficient);  $TGC = (W_2^{1/3} - W_1^{1/3}) \times (T \times d)^{-1} \times 1000$  hvor  $(T \times d)$  døgnggradsummen for perioden.
- **Fôrintak** (g x kar<sup>-1</sup>) ble beregnet utfra utfôret mengde og oppsamlet fôrspill, justert for tørrstoff (TS) og recovery (gjenfangst):
- **Fôrfaktor** (Feed conversion ratio);  $FCR = \text{fôrintak, g} / \text{tilvekst, g}$   
Hvor tilvekst er (sluttbiomasse) + (biomasse av døde fisk) - (startbiomasse)
- **Leverindeks (HSI, hepatosomatisk indeks)**;  $HSI = \text{levervekt} / \text{rundvekt} \times 100$ ;
- **Hjerteindeks (CSI, cardiosomatisk indeks)**;  $CSI = \text{hjertevekt} / \text{rundvekt} \times 100$ ;

#### 4.7 Statistiske beregninger

Datamaterialet består av slakteregistreringer på individbasis, totalt 225 fisk. Av fisk som ble slaktet ved avslutning av forsøket på Dønna, hadde 65 fisk fått 0,2 % EPA+DHA, 69 fisk hadde fått diett med 1 % EPA+DHA, og 91 fisk hadde fått tilnærmet kommersiell kontrolldiett (TK=1,7 % EPA+DHA).

Individregistreringer fra alle fisk i aktuelle pre-dietter er brukt som grunnlag for statistiske beregninger for tilvekst og slakteparametre. Fem pre-dietter (ekstremdiettene) ble valgt ut for videre analyser, og i hver gruppe ble 6 individuelle prøver brukt. To og to prøver ble slått sammen slik at datamaterialet for statistisk analyse av pre-dietteffekter består av 3 analyseverdier (n=3). For effekt av hoveddietter (de tre diettene brukt i merder på Dønna), er det 15 analyseverdier (n=15) bak. Effekter av Pre-diett og Hoveddiett ble analysert ved hjelp av variansanalyse (ANOVA). Effekter av Pre-diett ble bestemt innen hver Hoveddiett-gruppe. Signifikante forskjeller mellom fôrgrupper ble rangert ved hjelp av Duncan's Multiple Range Test. Forskjeller ble ansett som signifikant når  $P < 0.05$ . Data ble analysert i

SAS programvare. Multivariat statistisk tilnærming (Principal Component Analysis, PCA), Unscrambler programvare (CAMO, Corvallis, OR, USA), versjon 10.3 ble benyttet for å sammenligne fettsyresammensetningen av de ulike fosfolipidklassene i ulike vev.

## 5 Resultater og diskusjon

### 5.1 Vekst og overlevelse

Tabell 5 viser gjennomsnittlig slaktevekt for pre-diettgruppene innen hver hoveddiett og gjennomsnittlig sluttvekt for hver hoveddiettgruppe. Det var ingen signifikante forskjeller i sluttvekten til laks i de ulike hoveddiettgruppene. En tendens til lavere vekt i gruppene føret med de laveste nivåene av EPA og DHA i føret, henholdsvis 3,3 kg sammenlignet med 3,6 kg i kontrollgruppen ble observert ( $p=0,06$ ), den samme tendensen kunne observeres innad i prediettgruppene innen hver merd. Pre-diettgruppe 2 % EPA + DHA skilte seg ut med lavere sluttvekt og lavere spesifikk vekstrate (SGR) (Tabell 6) enn de andre gruppene. Det var færre fisk igjen i denne pre-diettgruppen og dermed litt usikre data. Det var ingen signifikante forskjeller i SGR mellom hoveddiettgruppene.

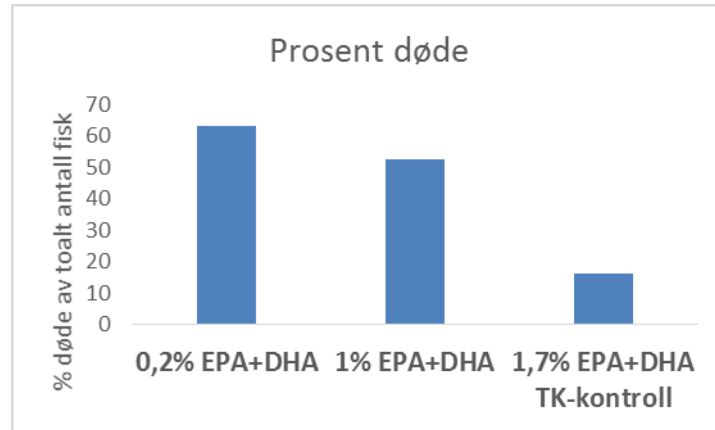
Tabell 5 Gjennomsnittlig sluttvekt (gram) til laks i prediettgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK- kontroll (2,2 % EPA + DHA) (pre-diettfase 40 gram til 400 gram) etter føring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til slaktestørrelse. Tabellen viser også gjennomsnittlig sluttvekt per hoveddiett.

| Sluttvekt, gram<br>Prediett\Hoveddiett | 0,2 % EPA + DHA         | 1 % EPA + DHA     | 1,7 % EPA+DHA<br>TK-kontroll |
|--|-------------------------|-------------------|------------------------------|
| 0% EPA + DHA                           | 3226 ± 255 <sup>a</sup> | 2888 ± 544        | 3423 ± 605                   |
| 2 % EPA                                | 3296 ± 228 <sup>a</sup> | 3370 ± 284        | 3786 ± 706                   |
| 2 % DHA                                | 3737 ± 246 <sup>a</sup> | 3419 ± 372        | 3545 ± 471                   |
| 2% EPA+DHA                             | 2328± 94 <sup>b</sup>   | 3460± 115         | 3487± 525                    |
| TK- kontroll                           | 3321 ± 287 <sup>a</sup> | 3686 ± 264        | 3599 ± 338                   |
| <b>Gjennomsnitt hoveddiett</b>         | <b>3278 ± 130</b>       | <b>3336 ± 185</b> | <b>3561 ± 213</b>            |

Tabell 6 Gjennomsnittlig SGR) til laks i prediettgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK- kontroll (2,2 % EPA + DHA) (prediettfase 40 gram til 400 gram) etter føring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til slaktestørrelse. Tabellen viser også gjennomsnittlig SGR per hoveddiett.

| SGR, tilvekst % pr dag<br>Prediett\Hoveddiett | 0,2 % EPA + DHA          | 1 % EPA + DHA      | 1,7 % EPA+DHA<br>TK-kontroll |
|---|--------------------------|--------------------|------------------------------|
| 0% EPA + DHA                                  | 0,40 ± 0,05 <sup>a</sup> | 0,26 ± 0,09        | 0,35 ± 0,10                  |
| 2 % EPA                                       | 0,43 ± 0,04 <sup>a</sup> | 0,40 ± 0,04        | 0,40 ± 0,12                  |
| 2 % DHA                                       | 0,42 ± 0,04 <sup>a</sup> | 0,32 ± 0,05        | 0,28 ± 0,07                  |
| 2 % EPA+DHA                                   | 0,24 ± 0,03 <sup>b</sup> | 0,36 ± 0,03        | 0,32 ± 0,09                  |
| TK- kontroll                                  | 0,40 ± 0,03 <sup>a</sup> | 0,39 ± 0,05        | 0,40 ± 0,03                  |
| <b>Gjennomsnitt hoveddiett</b>                | <b>0,39 ± 0,02</b>       | <b>0,35 ± 0,03</b> | <b>0,35 ± 0,03</b>           |

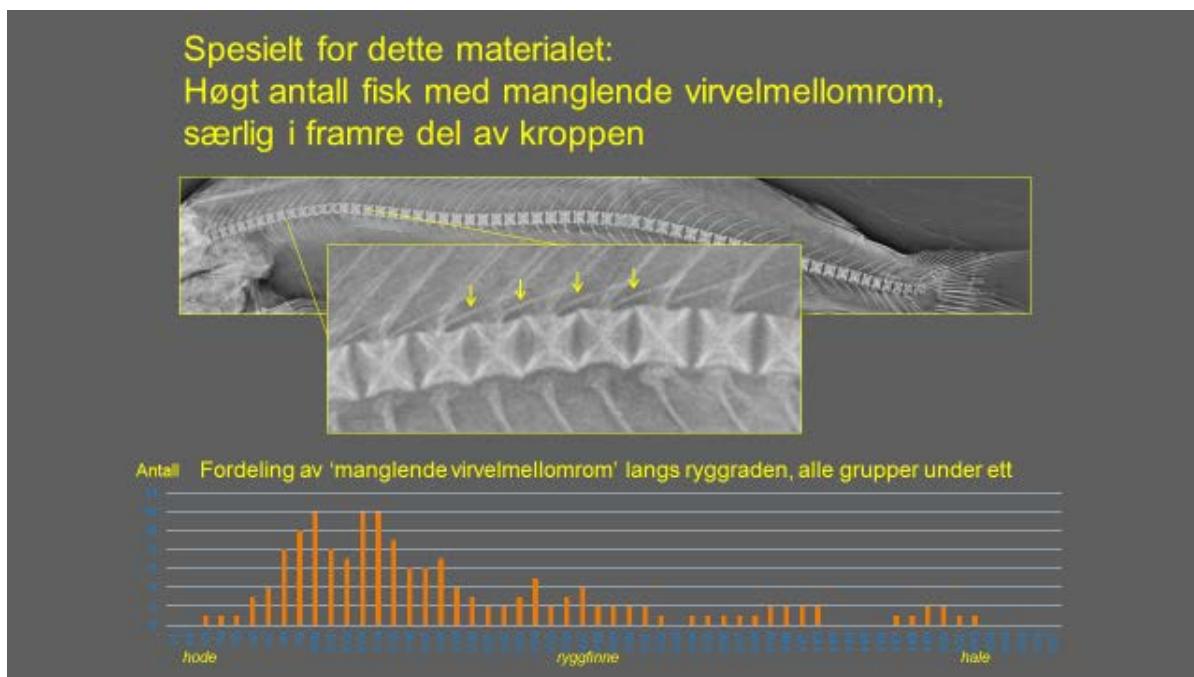
Figur 5 viser andel døde fisk i forsøksperioden i % av totalt antall fisk satt ut i hver merd. Den største andelen fisk døde etter to runder med avlusning i juli og i august, hvor det var relativt høye vanntemperaturer. Ca 60 % av fisken døde i omega-3 mangelgruppen (0,2 % EPA + DHA), ca 50 % i 1 % EPA+DHA gruppen og ca 15 % i kontrollgruppen med 1,7 % EPA+DHA i fôret.



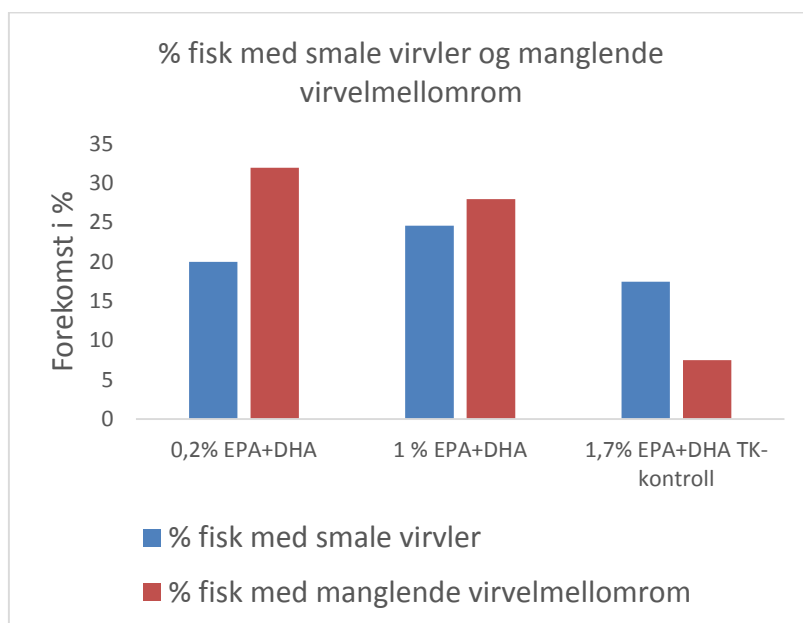
Figur 4 Gjennomsnittlig prosent døde fisk i de tre hoveddiettgruppene. Hovedandelen av fisken døde etter avlusning i juli og august.

## 5.2 Røntgenanalyser av ryggrad

Endringer i fettsyresammensetningen av fôret til laksen er neppe blant hovedårsakene til deformiteter, men kan være blant sekundærårsakene som vi har mindre kontroll over (som samspill med endringer i andre fôrkomponenter). Spørsmålet om og hva nivået av EPA og DHA i fôret betyr for fiskens beinutvikling er relativt ukjent og er en av årsakene til at det ble utført røntgenanalyse av all prøvefisk i dette prosjektet (Figur 5).



Figur 5 Røntgenanalyse av ryggrad og fordeling av manglende virvelrom langs ryggraden for alle diettgrupper under ett.



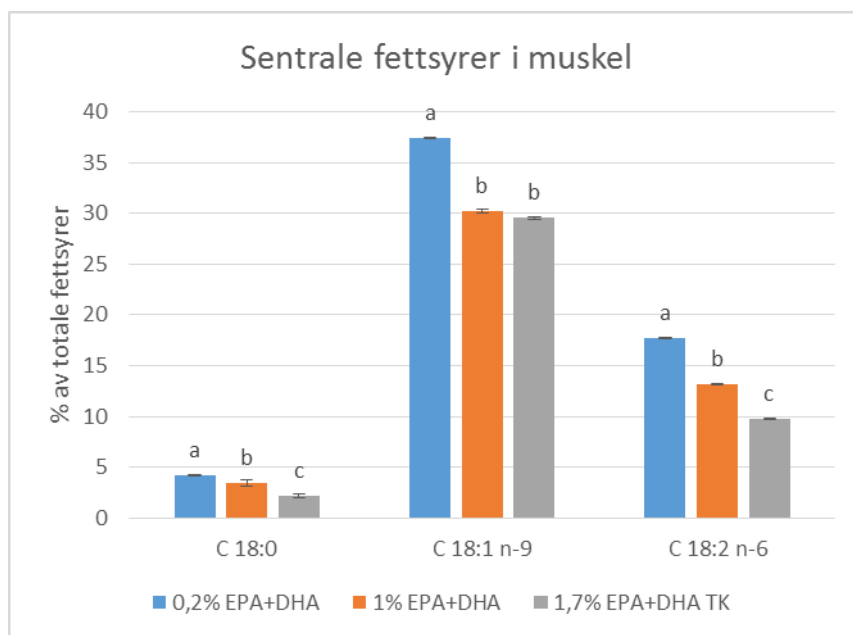
Figur 6 Røntgenanalyse av ryggrad og beregning av prosent fisk med manglende virvelmellomrom langs ryggraden og forekomst av fisk med smale virvler. 65 fisk i 0,2 % gruppen, 69 fisk i 1 % gruppen og 91 fisk i 1,7 % gruppen er røntgenfotografert.

Figur 6 viser at et relativt stort antall fisk hadde spesifikke virvelfeil. Et klart innslag av fisk i alle diettgrupper ble observert med smale virvler, noe som indikerer mangelfull mineralisering. Det kunne også observeres tydelige forskjeller i forekomst av andel fisk med manglende virvelmellomrom mellom de ulike hoveddiettgruppene, med høyest forekomst i 0,2 % EPA+DHA gruppen (32 %), ca 27 % i 1 % gruppen og 7 % i 1,7 % kontrollgruppen.

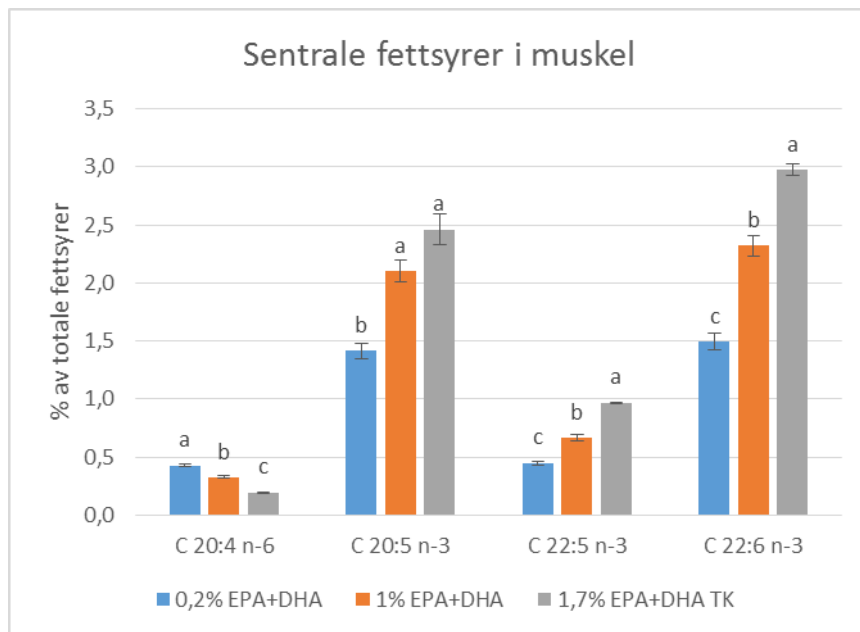
## 5.3 Muskel

### 5.3.1 Fettsyrer i muskel

Figurene 7 og 8 viser at fettsyresammensetningen av muskel i stor grad var påvirket av fettsyresammensetningen av hoveddietten i perioden fra 400 gram til 3,5 kg fiskestørrelse. Laks fôret med økende nivå av EPA og DHA i fôret i denne fasen hadde høyere nivå av disse fettsyrene i muskel. Fisk fôret på 0,2 % EPA+DHA i denne fasen hadde 2,9 % EPA og DHA sammenlignet med 5,5 % av disse fettsyrene i muskel til laksen fôret med TK dietten, noe som tyder på at laksen i mangelgruppen må ha hatt en betydelig egenproduksjon av EPA og DHA. Når nivåene av EPA og DHA reduseres i muskel, så øker nivåene av plantefettsyrer 18:2n-6 og 18:1n-9. Det er forholdsvis liten økning i 20:4n-6 i muskel.

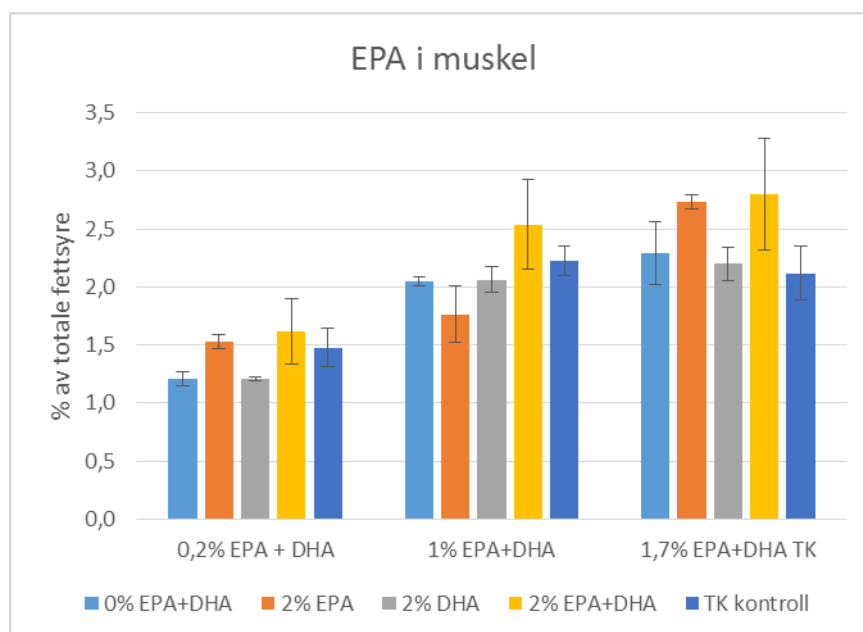


Figur 7 Effekt av hoveddiett på nivå av utvalgte fettsyrer i muskel (% av totale fettsyrer).



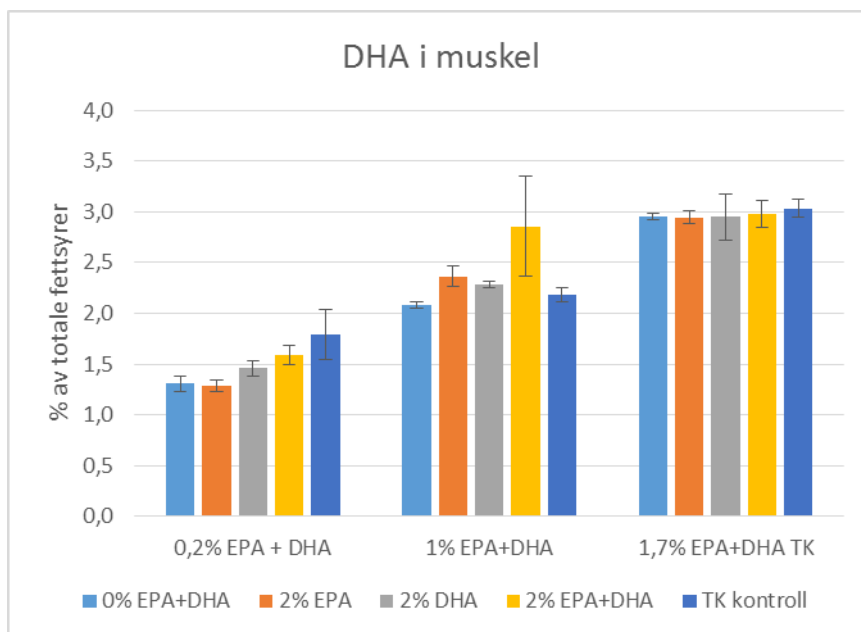
Figur 8 Effekt av hoveddiett på nivå av utvalgte fettsyrer i muskel (% av totale fettsyrer).

Figurene 9 og 10 viser gjennomsnittlig nivå av EPA og DHA (% av totale fettsyrer) i muskel til laks i prediettgruppene 0 % EPA+DHA, 2 % EPA, 2 % DHA, 2 % EPA+DHA og TK innen hver hoveddiettgruppe. Det var ingen signifikante effekter av predietter på fettsyresammensetning i muskel til laks, men tabellene viser en klar tendens til økende prosent EPA og DHA i muskel med økende nivå av disse fettsyrene i predietten i fasen fra 40 gram til 400 gram når fisken ble føret videre på henholdsvis 0,2 % og 1 % EPA og DHA i føret fram til slaktestørrelse på 3,5kg. Det var derimot ingen tendens til effekt av prediett i gruppen som ble føret med TK hoveddiett med 1,7 % EPA+DHA i føret i denne fasen. Tabeller over total fettsyresammensetning av muskel i de ulike diettgruppene er vist i vedlegg 1 til rapporten.



Figur 9 Effekt av pre-diett på nivå av EPA i muskel (% av totale fettsyrer).





Figur 10 Effekt av pre-diett på nivå av DHA i muskel (% av totale fettsyrer).

### 5.3.2 Astaxanthin

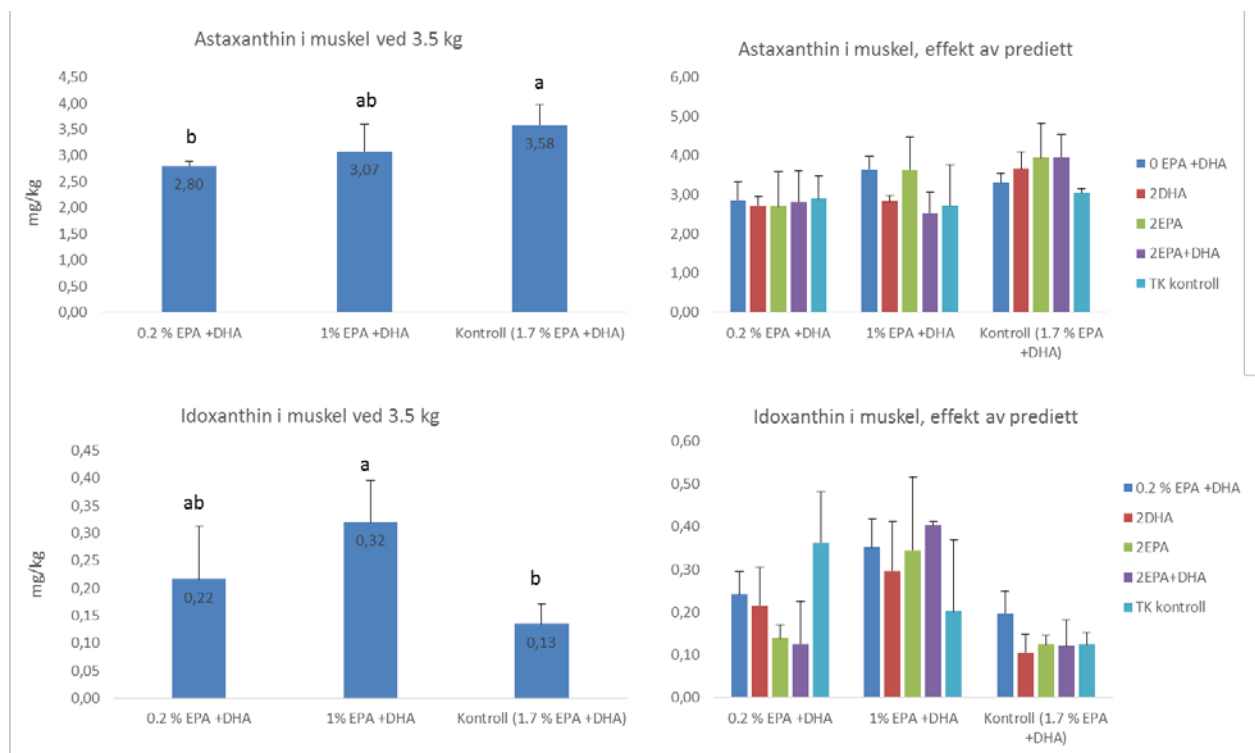
Langkjedete flerumettede fettsyrer er i flere studier vist å ha en positiv effekt på filet-farge hos laksefisk, men det er ikke kjent om dette skyldes positive effekter på opptak av astaxanthin i tarmen eller om det er en sammenheng med metabolsk omsetning av astaxanthin i tarm og lever. Astaxanthin er en kraftig antioksidant som er vist å ha en rekke positive effekter på helse og immunsystem i mennesker og pattedyr ved å redusere effekter av oksidativt stress, men det er foreløpig lite dokumentasjon i fisk. I dette forsøket fant vi en klar effekt av nivået av EPA og DHA i fôret i periode 2 (400-3500 g) på innholdet av astaxanthin i filet ved slaktevekt på rundt 3.5 kg ( $p=0.0052$ ). Fisk fôret med lavere nivå av EPA og DHA hadde lavere innhold av astaxanthin i fileten, men det var ingen signifikant sammenheng mellom kroppsvekt ved avslutning av forsøket og astaxanthin-konsentrasjon i filet ved avslutning av forsøket.

Astaxanthin omsettes også metabolsk i laksen, til ulike reductive metabolitter, og oksidativt til vitamin A. I det reductive sporet reduseres og elimineres hydroksylgruppene i flere trinn til  $\beta$ -carotene. Første trinn i denne omsetningen er idoxanthin. Det er vist tidligere at det er en høyere omsetning av astaxanthin til idoxanthin i liten laks og når laksen nærmer seg kjønnsmodning. Det er også en hypotese om at omsetningen til idoxanthin øker når laks er utsatt for stressende miljøbetingelser. I dette forsøket så vi at nivået av idoxanthin i muskel var lavest i laks som hadde fått mest EPA og DHA i fôret fra 400 g til 3.5 kg ( $p<0.0001$ ) (figur 11). Det var ingen signifikant effekt av prediett, men det var en samspillseffekt mellom diett i periode 1 og 2 ( $p=0.0382$ ), slik at i periode 2 var det laksen som fikk fôr med 1 % EPA og DHA som hadde høyest innhold av idoxanthin i fileten (figur 11 b). Det var ingen sammenheng mellom fiskevekt og mengde idoxanthin i filet.

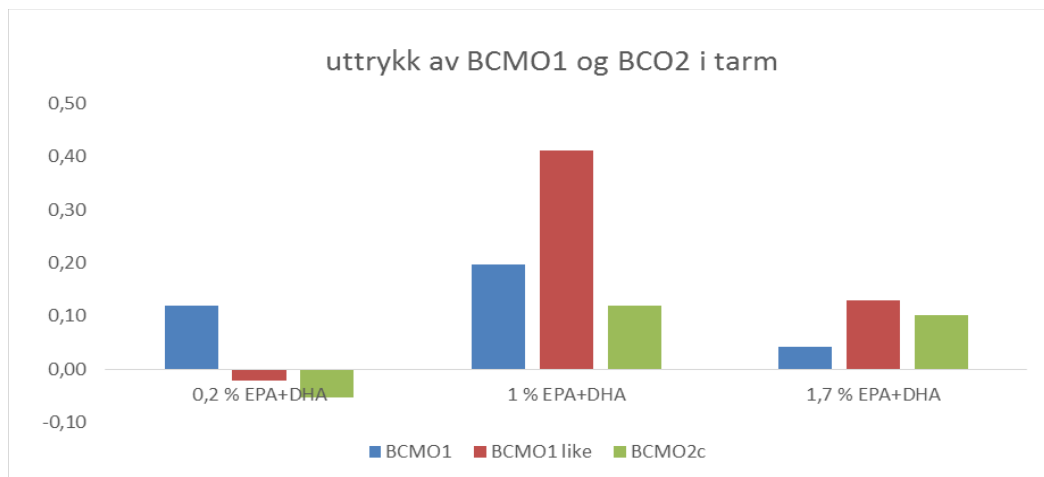
Det er ikke kjent om denne reductive omsetningen har en funksjonell betydning eller er en forutsetning for syntese av vitamin A i laksefisk. Første trinn i syntesen av vitamin A i pattedyr er symmetrisk spalting av  $\beta$ -carotene katalysert av enzymet  $\beta,\beta$ -carotene-15,15'-monokisid oksigenaser (BMCO1) som har høyest uttrykk i tynntarmen i pattedyr. BMCO1 er også involvert i regulering av lipidomsetning i pattedyr, og uttrykket av BMCO1 er regulert via PPAR $\gamma$  som er viktig for regulering av fettmetabolisme,

både i fisk og pattedyr. Det kan derfor være en link mellom fettmetabolisme og metabolisme av karotenoider også i fisk. I tillegg finnes det både i fisk og pattedyr et annet enzym (BMCO2) som også spalter karotenoider oksidativt, men som har en bredere substratspesifisitet enn BMCO1. Disse oksygenasene er også antatt å være viktige i reguleringen av metabolisme av astaxanthin og andre karotenoider. I laks finnes det flere ulike varianter av disse enzymene, og de er hovedsakelig uttrykt i lever og tarm, og i mindre grad i muskel. I dette forsøket så vi på genuttrykk i tarm av to varianter av BMCO1 og en BCO2 (figur 12).

Selv om det ikke var signifikante forskjeller mellom diettgruppene, ser det ut som det kan være en oppregulering av den ene BMCO1-homologen (BCMO1 like) i laks fôret med 1 % EPA og DHA sammenlignet med de andre behandlingene. Det var også i denne behandlingen hvor idoxanthin-konsentrasjonen i muskel var høyest, men om det er en biologisk sammenheng her eller om det skyldes en tilfeldighet kan man ikke avgjøre på bakgrunn av dette forsøket.



Figur 11 Astaxanthin konsentrasjon (øverst) og idoxanthin i muskel hos laks slaktet på ca 3.5 kg og fôret ulike nivå av EPA og DHA fra 40 g til 3500 g. Grafene til venstre viser effekt av diett fra 400 g, grafene til høyre viser også alle de ulike prediетtkombinasjonene.

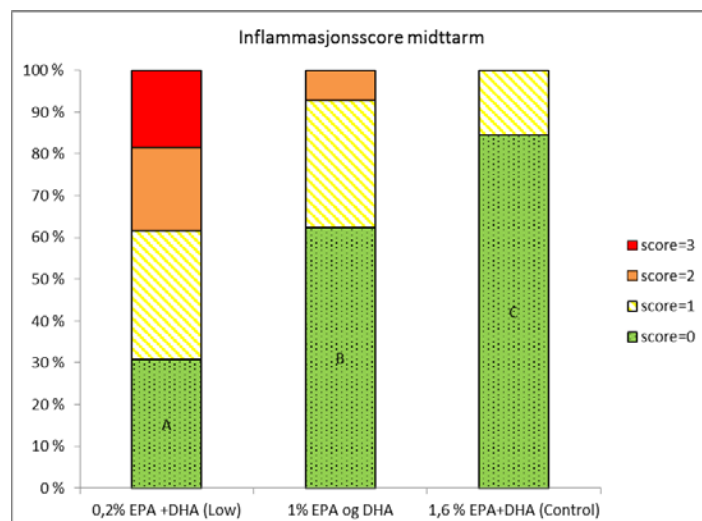


Figur 12 Uttrykk av BCMO1 og BCMO2 i tarm hos laks fôret ulike nivå av EPA og DHA i hoveddiettgruppene.

## 5.4 Tarm

### 5.4.1. Inflammasjonsscore

Figur 13 viser i hvor stor grad midtarmen til laks i de ulike hoveddiett gruppene var rød og svullen i henhold til scoringsmetode utviklet av Biomar (det var ingen signifikante effekter av predietter, og av den grunn vises kun effekter av hoveddietter). Alvorlig grad av inflammasjon ble observert i ca 20 % av individene i gruppen fôret det laveste EPA og DHA nivået i fôret (0,2 %) (rød farge). Moderat grad av inflammasjon ble observert både i 0,2 % og 1 % gruppene (oransje), henholdsvis 20 % og 10 %. Sparsom grad av inflammasjon (gul) ble observert i alle tre hoveddiettgrupper, ca 30 % i mangelgruppen, 20 % i 1 % gruppen og ca 10 % i kontrollgruppen TK fôret det høyeste nivået av EPA+DHA i fôret.

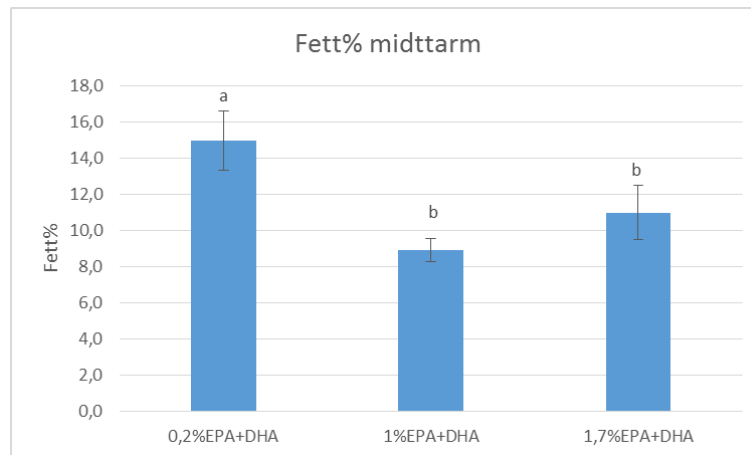


| ANOVA      |       |                         |                      |
|------------|-------|-------------------------|----------------------|
| Hoveddiett |       |                         |                      |
| p-verdi    |       |                         |                      |
| score 0    | 0,005 | Low < 1% = Control      | 0=ingen inflammasjon |
| score 1    | 0,4   |                         | 1=sparsom            |
| score 2    | 0,09  | Low ≥ 1% ≥ Control      | 2=moderat            |
| score 3    | 0,07  | (Forekommer bare i Low) | 3=alvorlig           |

Figur 13 Inflammasjonsscore midttarm i hoveddiettgruppene (i henhold til metode utviklet av Biomar). All fisk i merdene ble benyttet til scoringen, 65 fisk i 0,2 % gruppen, 69 fisk i 1 % gruppen og 91 fisk i 1,7 % gruppen.

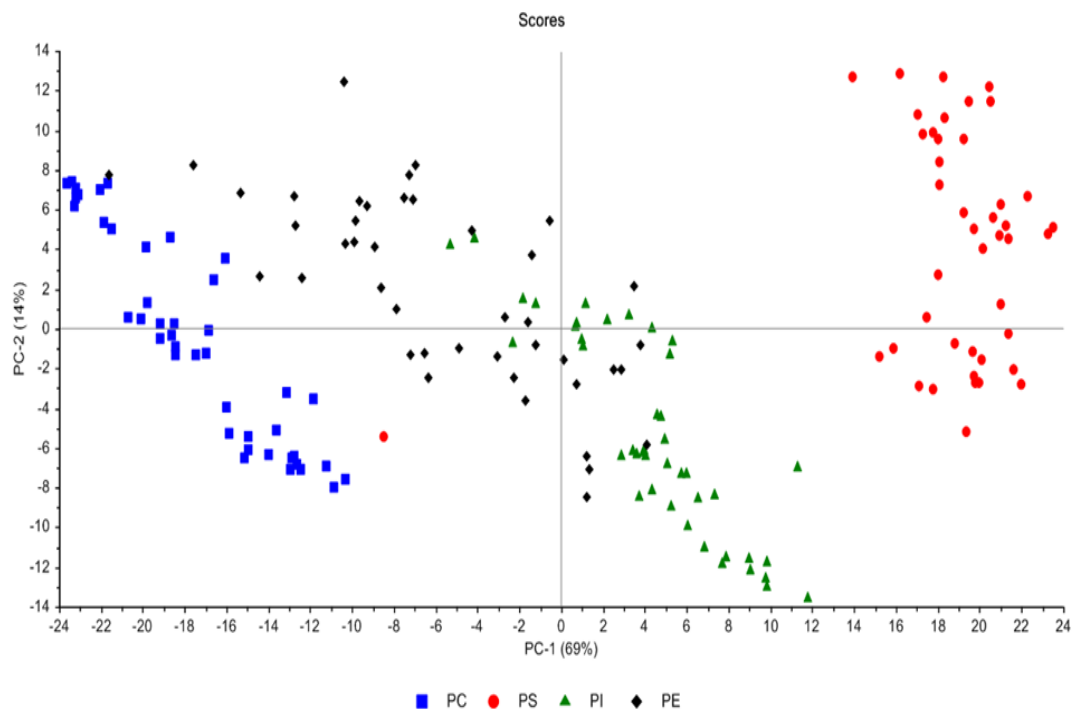
### 5.4.1 Fett % og fettsyresammensetning av lipidklasser i tarm

Figur 14 viser at laks fôret med 0,2 % EPA+DHA i hoveddietten fra 400 gram fram til 3,5 kg hadde signifikant høyere fettnivå i midttarm enn laks fôret med henholdsvis 1 % og 1,7 % av disse fettsyrene i fôret. Det var ingen effekt av prediett (fettsyresammensetning av fôret i fasen fra 40g til 400 g) på fett % i slaktefisk (resultater ikke vist).

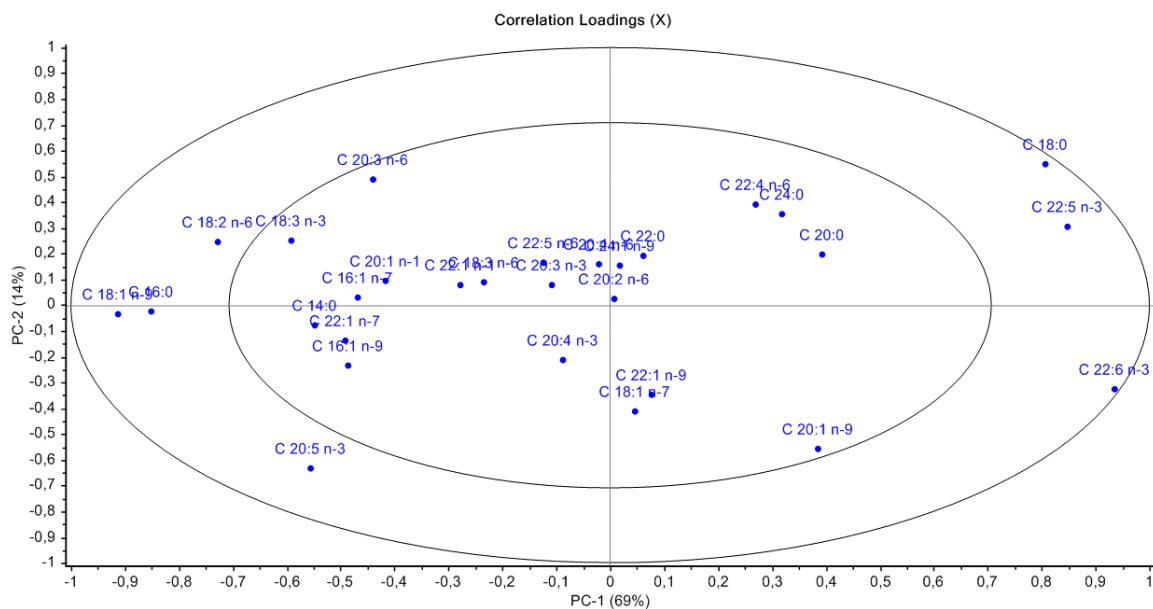


Figur 14 Fett % i midttarm til laks fra tre hoveddiettgrupper (det ble ikke observert predietteffekt på fett %.)

Det ble utført en prinspal komponent analyse (PCA) i Unscrambler for å få en oversikt over hvordan sammensetningen av de mest sentrale cellemembranfosfolipidklassene (Figur 15), Phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl inositol (PI) og phosphatidylserine (PS) i midttarmen til laksen påvirkes av de ulike diettene. Hele datasettet ble benyttet, det vil si, vi inkluderte både pre-diettgrupper og hoveddiettgrupper i analysen. I figur 15 ser vi tydelig at analysen deler prøvene inn i 4 helt klare grupperinger for PC, PE, PI og PS, noe som viser at sammensetningen av de ulike lipidklassene er særegen for hver gruppe (de har særegen sammensetning uavhengig av diettgruppe). Ved å plotte de ulike scorene i henhold til prinspal komponentene (PC), ser vi etter fettsyrer i dataene som spesifikt kan relateres til egenskaper ved de ulike fosfolipidklassene og vi kan se etter fellestrekk ved de ulike prøvene i de 4 ulike lipidklassene (Figur 16). I denne figuren ser vi at det er 8 fettsyrer (20:5n-3, 22:6n-3, 18:1n-9, 16:0, 22:5n-3, 18:0, 18:2n-6, 20:4n-6) som grupperer seg helt klart ut mot kantene i ytre sirkel som signifikant forskjellig mellom de ulike lipidklassene i de ulike diettgruppene. Det er utført PCA analyse av dietteffekter spesifikt innen de ulike fosfolipidklassene, disse plottene vises ikke her, men finnes i vedlegg 2 til rapporten. Her har vi valgt å ta ut de 8 fettsyrene som fordeler seg signifikant forskjellig mellom de ulike fosfolipidklassene for presentasjon av diett effekt (figurene 17, 18 og 19).

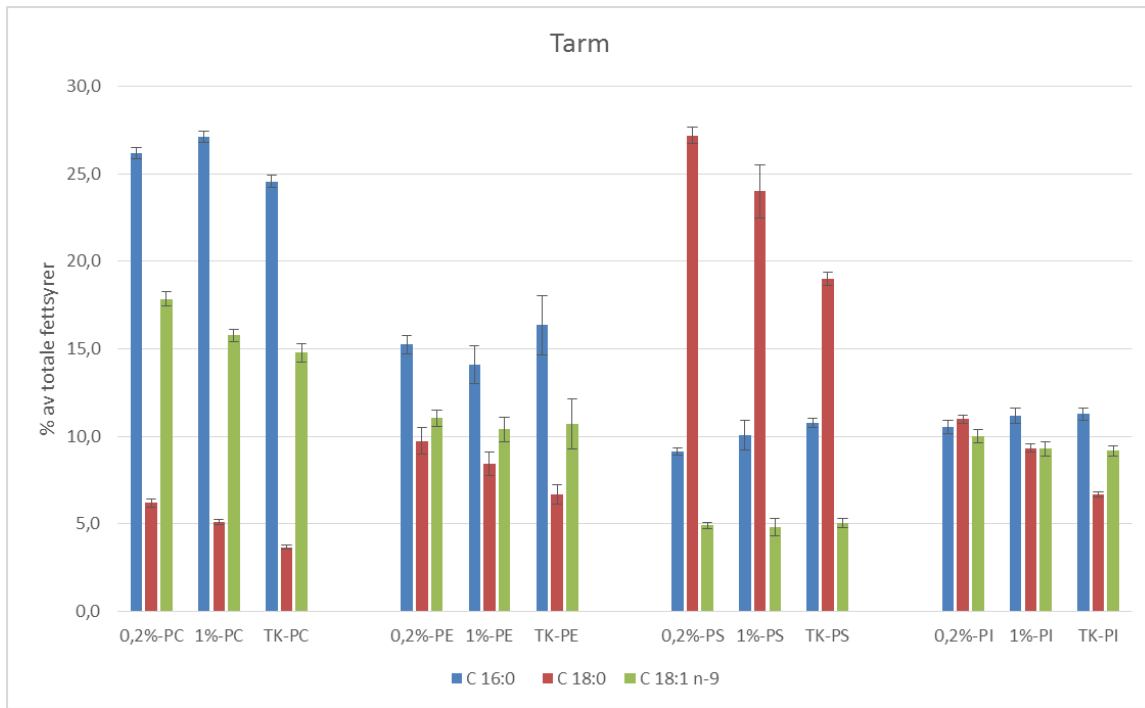


Figur 15 Multivariatanalyse (PCA plot, principal component analyses) av lipidklassesammensetning av midtarm til laks fôret ulike pre-dietter og hoveddietter. Analysen viste ingen signifikante effekter av pre-dietter, det fokuseres derfor kun på effekter av hoveddietter i presentasjonen. PC=phospatidylcholine, PS= phospatidylserine, PI=phospatidyl inositol, PE=phospatidyletanolamine.



Figur 16 Multivariatanalyse (Loading plot, principal component analyses) som beskriver kjennetegn ved fettsyresammensetningen i lipidklassene PC, PE, PS og PI i midtarm til laks fôret ulike pre-dietter og hoveddietter. Fettsyrer som legger seg i ytre ring (20:5n-3, 22:6n-3, 18:1n-9, 16:0, 22:5n-3, 18:0, 18:2n-6, 20:4n-6) finnes i signifikant forskjellig nivå i de ulike lipidklassene uavhengig av diett.

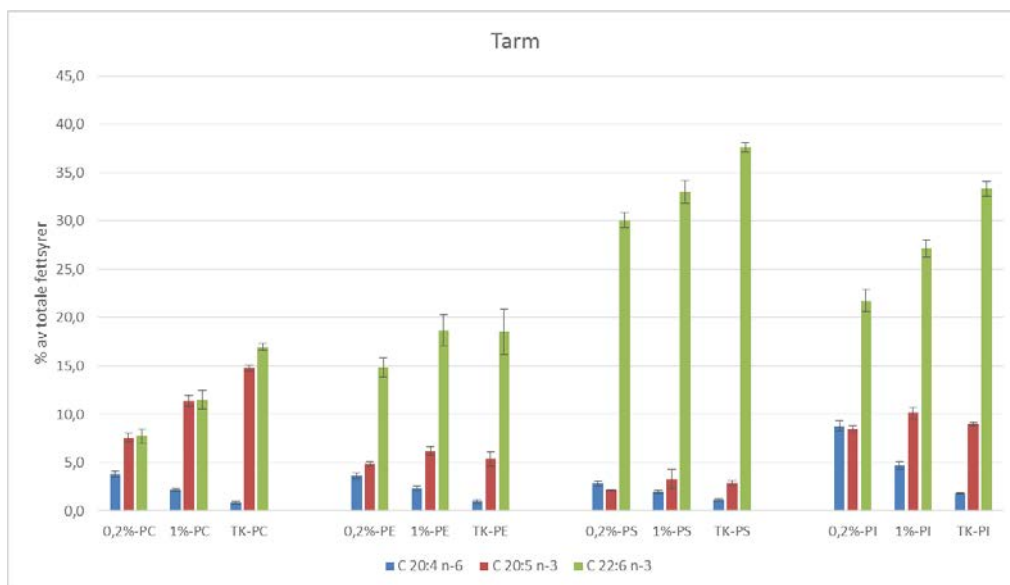
Figur 17 viser at PC og PE i tarm kjennetegnes ved et høyt nivå av fettsyrene 16:0 og 18:1n-9. PS kjennetegnes ved et høyt nivå av 18:0, mens PI har mer lik fordeling mellom fettsyrene 16:0, 18:0 og 18:1n-9. Som vi ser av figurene, så er sammensetningen av disse fettsyrene relativt konserverv i de ulike fôrgruppene, spesielt 16:0, 18:1n-9 og 18:0 øker i fôret når mengden EPA og DHA reduseres, noe som også gjenspeiles ved et høyere nivå av disse fettsyrene i membranlipidene.



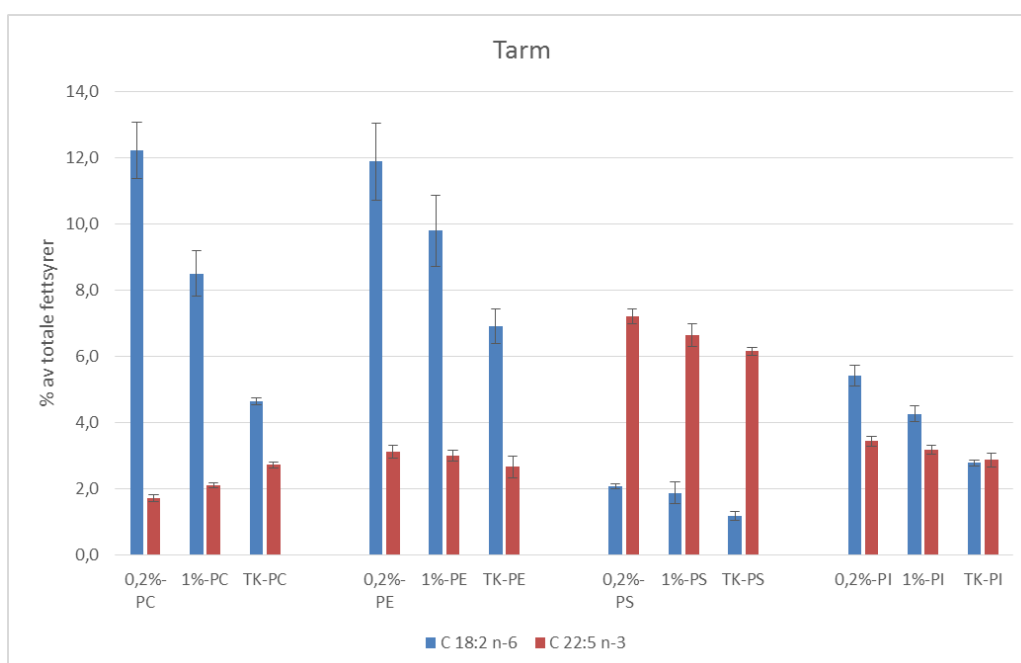
Figur 17 Viser hvordan fettsyrene 16:0, 18:0 og 18:1n-9 fordeler seg i de ulike lipidklassene PC, PE, PI og PS og videre hvordan disse fettsyrene påvirkes av fettsyresammensetningen av hoveddiettene 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+DHA og TK med 1,7 % EPA+DHA. Det var ingen signifikant effekt av prediett (ikke vist).

Figur 18 viser at alle lipidklasser i tarm er relativt rike på 22:6n-3, men PS kjennetegnes spesielt med et meget høyt nivå av denne fettsyren og relativt lave nivåer av 20:4n-6 og 20:5n-3. Både PI og PC er relativt rike på 20:5n-3. 20:5n-3 er relativt konserverv i de ulike lipidklassen bortsett fra i PC hvor nivået reduseres med redusert nivå av denne fettsyren i fôret. Nivået av 22:6n-3 reduseres i alle lipidklasser, spesielt PI og PC, når nivået reduseres i fôret. Når nivået av DHA reduseres, økes nivået av arakindonsyre (ARA, 20:4n-6), spesielt i PI. ARA i PI er den lipidklassen som er forløper for proinflammatoriske eikosanoider og denne endringen i sammensetningen kan dermed resultere i økt betennelsesrisiko i tarmen.

Figur 19 viser at PC og PE er rik på fettsyren 18:2n-6 og at denne fettsyren øker i disse membranfosfolipidene når DHA synker. 22:5n-3 øker i PS ved synkende nivå EPA og DHA i fôret, noe som tyder på at denne fettsyren til en viss grad erstatter DHA i denne lipidklassen når DHA reduseres. Reduksjon av DHA i PS er kjent for å gi økt risiko for oksidativt stress i membranlipidene.



Figur 18 Viser hvordan fetttsyrene 20:4n-6, 20:5n-3 og 22:6n-3 fordeler seg i de ulike lipidklassene PC, PE, PI og PS og videre hvordan disse fetttsyrene påvirkes av fetttsyresammensetningen av hoveddiettene 0,2 % EPA + DHA, 1% EPA+DHA og TK med 1,7 % EPA+DHA. Det var kun en fetttsyre (20:5n-3) som var signifikant påvirket av pre-diett i PS, med signifikant høyere nivå i grupper fôret med prediettene 2 % EPA, 2 % DHA og 2 % EPA+DHA sammenlignet med 0 % og TK (ikke vist).



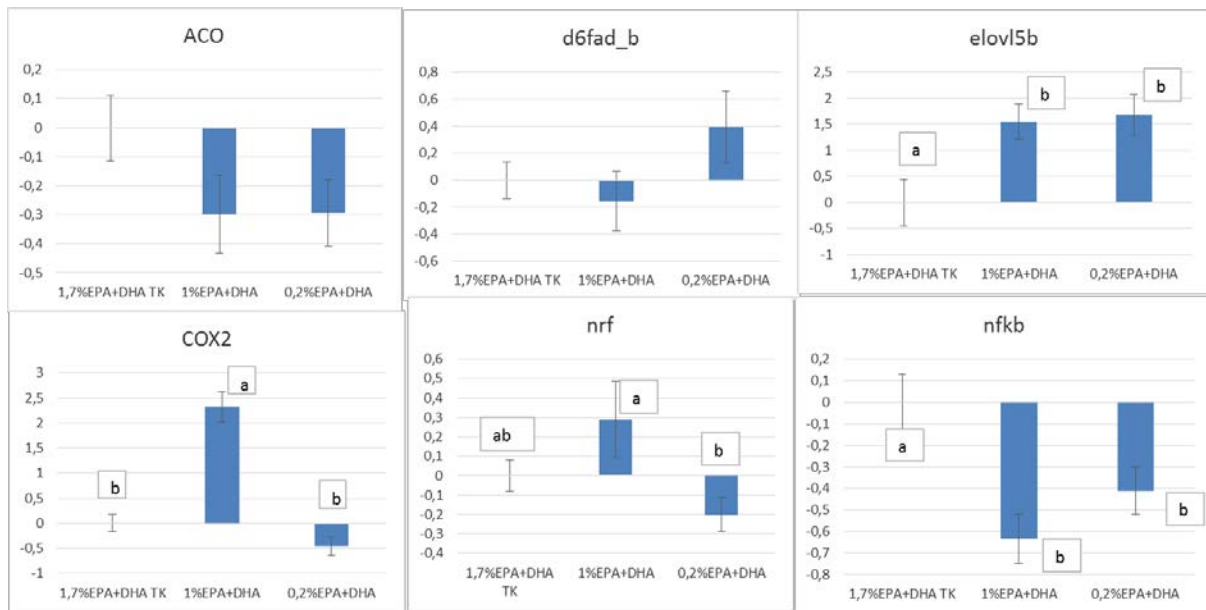
Figur 19 Viser hvordan fetttsyrene 18:2n-6 og 22:5n-3 fordeler seg i de ulike lipidklassene PC, PE, PI og PS og videre hvordan disse fetttsyrene påvirkes av fetttsyresammensetningen av hoveddiettene 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+DHA og TK med 1,7 % EPA+DHA. Det var ingen signifikant effekt av prediett (ikke vist).

#### 5.4.2 Genuttrykk i tarm

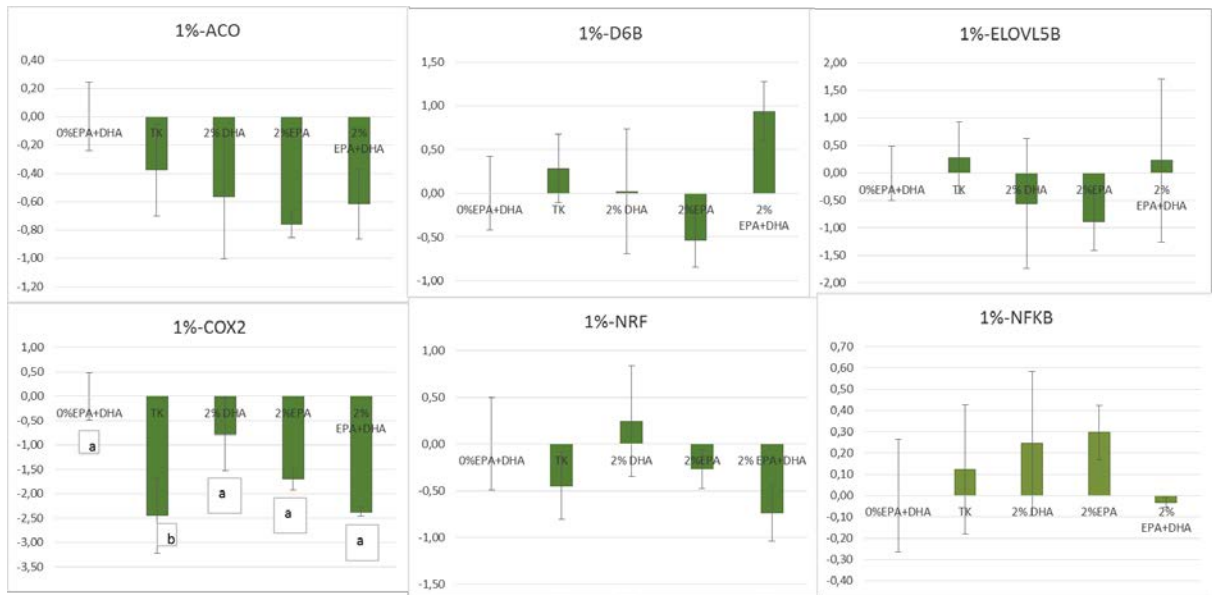
Figur 20 viser at redusert nivå av EPA og DHA i fôret, fører til økt uttrykk av gener involvert i kjedeforlenging (ELOV-5b) og desaturering (6fadb, tendens) av 18:3n-3 til EPA og DHA, i overenstemmelse med tidligere publisert litteratur (Kjær et al.,2008, Ruyter et al., 1999 ). Noe som



viser at laksens egen kapasitet til å syntetisere EPA og DHA fra 18:3n-3 øker når nivået av EPA og DHA i fôret reduseres. Sammenlignet med kontrollgruppen (TK), så viser dataene en signifikant oppregulering av COX2 og nedregulering av NF-kB i gruppen fôret med 1 % EPA + DHA, noe som kan tyde på at fettsyresammensetningen i fôret påvirker laksens evne til å håndtere oksidativt stress og betennelsessituasjoner. Figur 21 viser også signifikant predietteffekt på uttrykk av COX2 i 1 % hoveddiettgruppen ved at økende nivå av EPA og DHA i fôret i tidlig livsfase fra 40g til 400 gram har nedregulert uttrykket. Både Hoveddiett og prediett resultatet tyder på at EPA og DHA nivået har en antiinflammatorisk effekt i tarmen ved å nedregulere COX2.



**Figur 20** Hoveddietteffekter i midttarm. Uttrykk av utvalgte gener involvert i regulering av fettsyremetabolismen (peroksisomal fettsyre oksidasjon (ACO), d6fad<sub>b</sub> ( $\Delta$ -6 fettsyre desaturase<sub>b</sub>) og elongase involvert i kjedeforlengelsen av fettsyrer (elov5<sub>b</sub>) og gener involvert i oksidativt stress og inflammasjon, cyclooxygenase 2 (COX2) involvert i syntesen av proinflammatoriske eikosanoider i midttarm til laks fra tre hoveddiettgrupper (det ble ikke observert predietteffekt på fett%). NRF (Nuclear respiratory factor 1) er en transkripsjonsfaktor som inngår i reguleringen av en rekke gener involvert i oksydative stress responser. NF-kB er en transkripsjonsfaktor som styrer ekspresjonen av et stort antall gener involvert i immunrespons, betennelse, celleoverlevelse og nydanning av celler.

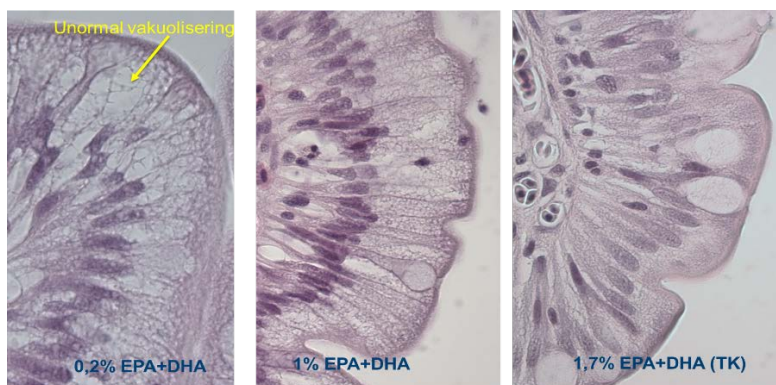


**Figur 21** Predietteffekter i midttarm. Uttrykk av utvalgte gener involvert i regulering av fettsyremetabolismen (peroksisomal fettsyre oksidasjon (ACO), *d6fad6* ( $\Delta$ -6 fettsyre desaturase<sub>6</sub>) og elongase involvert i kjedeforlengelsen av fettsyrer (elov5<sub>6</sub>) og gener involvert i oksidativt stress og inflammasjon, cyclooxygenase 2 (COX2) involvert i syntesen av proinflammatoriske eikosanoider NRF (Nuclear respiratory factor 1) er en transkripsjonsfaktor som inngår i reguleringen av en rekke gener involvert i oksydative stress responser. NF- $\kappa$ B er en transkripsjonsfaktor som styrer ekspresjonen av et stort antall gener involvert i immunrespons, betennelse, celleoverlevelse og nydanning av celler. Resultatene viser genuttrykk i midttarm til laks fra fem prediett grupper innen hoveddiettgruppe 1 % EPA+DHA. Predietteffekter vises kun i hoveddiettgruppe 1 % EPA +DHA, da det var kun i denne gruppen det ble funnet signifikante predietteffekter.

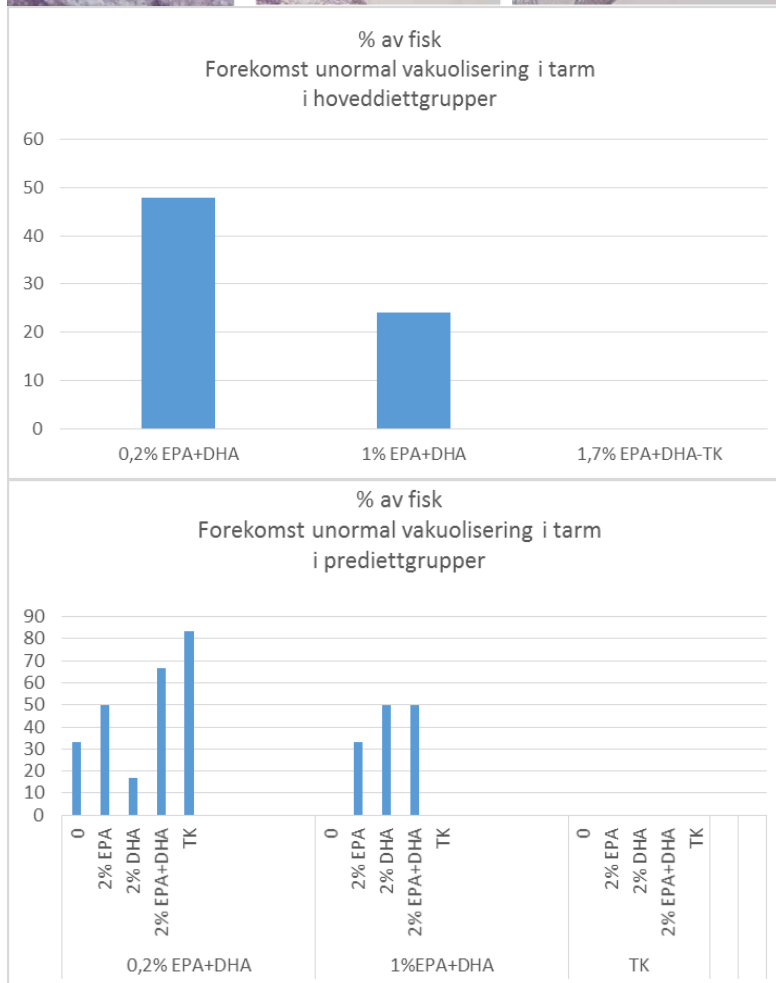
### 5.4.3 Mikroskopi av tarm

Figur 22 Mikroskopibilder fra midttarm viser at laks fôret med de to laveste nivåene av EPA+DHA (0,2 % og 1 %) hadde økt forekomst av unormal vakuolisering sammenlignet med kontrollgruppen (TK) fôret med 1,7 % EPA+DHA. Hvilken betydning denne unormale vakuoliseringen har for tarmens funksjon vet vi ikke, men funnene er sammenfallende med økt grad av visuelt observert svulne og røde tarmar i de samme diettgruppene (figur 13)

Det var ingen signifikante pre-dietteffekter på vakuolisering grunnet store individvariasjoner. Men fra figuren som viser predietteffekter ser vi at denne unormale vakuoliseringen ikke forekommer når fisken er fôret på lave nivåer av omega-3 i tidligste livsfase for så å overføres til kontroldietten (1,7 % EPA+DHA) i sjøfasen. Hvis derimot individer som er fôret på lave omega-3 nivåer i tidlige livsfaser overføres til de lave omega-3 diettene 0,2 % EPA+DHA og 1 % EPA+DHA, så forekommer unormal vakuolisering.

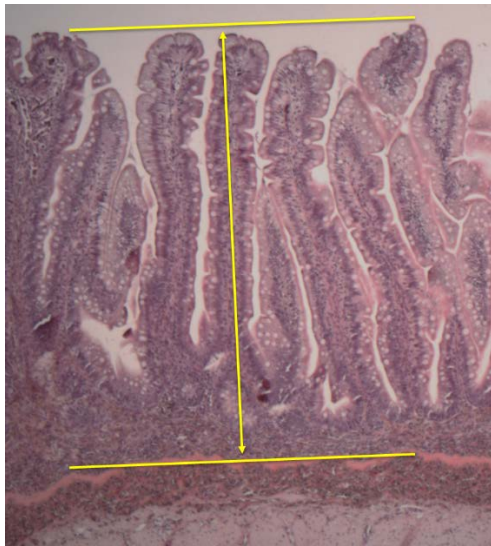


Observasjon av unormal vakuolisering i tarmepitelceller (absorptive celler) vha mikroskopi (60X)



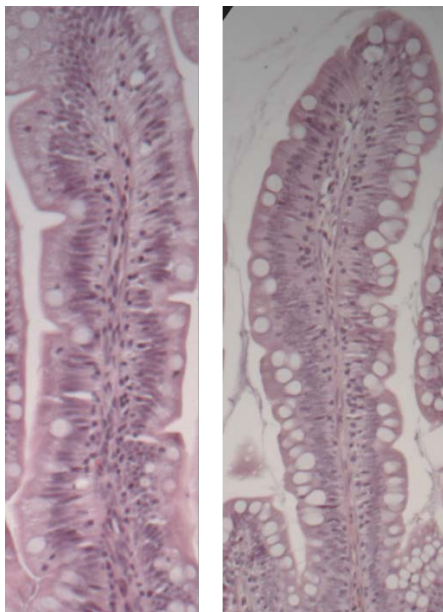
Figur 22 Mikroskopi av tarmepitelceller i midttarm. Mikroskopibilder viser eksempelbilder av midtarmen til laks i de ulike hoveddiettgruppene, unormal vakuolisering i 0,2 % gruppen, moderat økt vakuolisering i 1 % gruppen og normal grad av vakuolisering i 1,7 % TK gruppen. Under vises kvantifisering av grad av unormal vakuolisering i tarmepitelceller fra laks i 3 hoveddiettgrupper og i 5 prediettgrupper innen hver hoveddiett.

Figurene 23 og 24 viser foldhøyde og antall slimceller til midttarm i de ulike hoveddiettgruppene. Det var ingen signifikante forskjeller i foldhøyde og antall slimceller mellom diettgruppene.



| Fôr i sjø    | Foldhøyde mm |
|--------------|--------------|
| 0,2% EPA+DHA | 1,3 ± 0,12   |
| 1% EPA+DHA   | 1,3 ± 0,20   |
| 1,7% EPA+DHA | 1,4 ± 0,29   |

Figur 23 Mikroskopi og analyse av foldhøyde (4X) midttarm. Mikroskopibildet viser et eksempelbilde av midttarmen til laks i forsøket. Tabellen til høyre viser målt foldhøyde i de ulike hoveddiettgruppene.



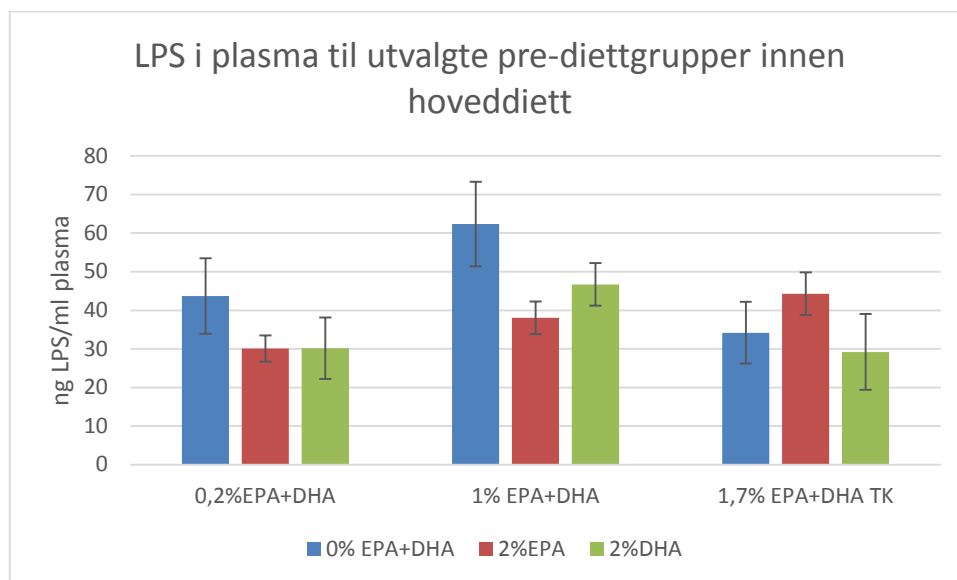
| Fôr i sjø    | Scoring av antall slimceller (0-6) |
|--------------|------------------------------------|
| 0,2% EPA+DHA | 3,3 ± 0,82                         |
| 1% EPA+DHA   | 3,4 ± 1,00                         |
| 1,7% EPA+DHA | 3,7 ± 0,76                         |

Figur 24 Mikroskopi og analyse av antall slimceller (4X) i midttarm. Mikroskopibildet viser et eksempelbilde av midttarmen til laks i forsøket. Tabellen til høyre viser gjennomsnittlig antall slimceller i midttarm i de ulike hoveddiettgruppene.

#### 5.4.4 LPS i plasma

Lipidklasse analysene viste at når DHA nivået i fôret ble redusert, så ble denne fettsyren i membranfosfolipidene i midttarm i stor grad erstattet med n-6 fettsyren 20:4n-6 arakidonsyre, spesielt i PI. Siden n-6 fettsyrer er kjent for å være pro-inflammatoriske kan det være at disse har hatt betydning for utviklingen av den observerte inflammasjonsscoren i tarm. Flere studier fra pattedyr har identifisert mekanismer som forbinder tarmbakteriefloraen med fettlever og utvikling av metabolsk induisert inflammasjon, inkludert tarm-barriere dysfunksjoner. I slike tilstander observeres ofte en økning i

plasmanivået av lipopolysakkarid (LPS). LPS fra tarmmicrobiota kan lekke over i blodbanen som resultat av lekkasjer/skader på tarm, noe som igjen vil føre til økt inflammasjonsrisiko. Mikroskopibildene viste ingen synlige skader på tarm og heller ikke tydelig tegn på inflammasjon. Det er mulig at man må analysere med mer detaljerte analyser som f.eks. elektronmikroskopi og immunomerking for å kunne konkludere vedrørende eventuelle effekter av fettsyrer på tarm-barriere dysfunksjoner og metabolsk induert inflammasjon i laks, men figur 25 viser at det ble påvist relativt høye nivåer i av LPS i plasma i alle diettgrupper når laksen var 3.5 kg. Til sammenligning var nivåene i plasma mer enn 10 ganger så høye som når fisken var 400 gram (før utsett i sjø, resultater ikke vist her). Vi er ikke kjent med at LPS tidligere er målt i plasma til laks og har av den grunn ingen studier å sammenligne med. Til tross for at det ikke ble observert signifikante predietteffekter, kan figuren tyde på at laks fôret med 0% EPA+DHA i prediettfasen fra 40 gram til 400 gram hadde høyere nivå av LPS i plasma dersom den ble videreført på lave nivåer av EPA og DHA i sjøvannsfasen sammenlignet med laks fôret med 1,7 % EPA+DHA. I samme gruppe ble det også observert predietteffekt mht. fettinnhold i lever (figur 26). Dataene kan tyde på at omega-3 nivået i fôr til laks i tidlig livsfase kan ha betydning for tarm-barriere funksjon i seinere livsfaser og muligens sammenheng med tarmmicrobiota. Men her er det nødvendig med mer detaljerte studier for å kunne konkludere.



Figur 25 LPS i plasma til utvalgte predietter innen de 3 hoveddiettgrupper.

### 5.4.5 Innvollfettsscore

Tabell 7 viser at hoveddiettgruppen fôret med 0,2 % EPA og DHA i dietten fra 400 gram til 3,5 kg har mer fett rundt innvoller enn fisk fôret med 1 % eller tilnærmet kommersiell kontroll ( $p=0,06$ )

Tabell 7 Gjennomsnittlig scoring for mengde innvollfett på en skala fra 1-5 i laks i prediettgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK- kontroll (2,2 % EPA + DHA) (pre-diettfase 40 gram til 400 gram) etter fôring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til slaktestørrelse. Tabellen viser også gjennomsnittlig mengde innvollfett per hoveddiett.

| Score innvollfett, skala 1-5<br>Prediett\Hoveddiett | 0,2 % EPA + DHA        | 1 % EPA + DHA          | 1,7 % EPA+DHA<br>TK-kontroll |
|---|------------------------|------------------------|------------------------------|
| 0% EPA + DHA  | 4,0 ± 0,4              | 2,3 ± 0,4              | 2,7 ± 0,4                    |
| 2 % EPA   | 3,8 ± 0,5              | 3,0 ± 0,3              | 3,2 ± 0,7                    |
| 2 % DHA   | 3,3 ± 0,4              | 2,6 ± 0,3              | 2,8 ± 0,4                    |
| 2 % EPA+DHA   | 3,0 ± 0,6              | 3,0 ± 1,0              | 3,0 ± 0,4                    |
| TK- kontroll  | 4,0 ± 0,3              | 3,0 ± 0,3              | 3,1 ± 0,4                    |
| Gjennomsnitt  | 3,7 ± 0,2 <sup>a</sup> | 2,7 ± 0,2 <sup>b</sup> | 3,0 ± 0,2 <sup>b</sup>       |

## 5.5 Lever

### 5.5.1 Leverindeks

Tabell 8 viser ingen signifikante forskjeller i HSI mellom hoveddiettgruppene. Det var en signifikant effekt av prediett i 0,2 % EPA + DHA gruppen, hvor fisken som var fôret på 2 % DHA fôret i tidlige livsfaser hadde signifikant lavere HSI enn de som var fôret på 2 % EPA og 2 % EPA + DHA.

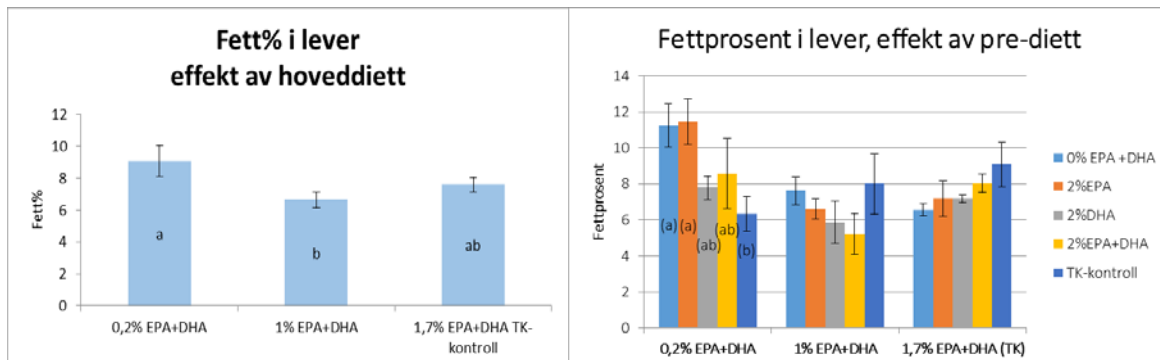
Tabell 8 Gjennomsnittlig leverindex (HSI) i laks i pre-dietttgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK-kontroll (2,2 % EPA + DHA) (pre-diettfase 40 gram til 400 gram) etter fôring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til slaktestørrelse. Tabellen viser også gjennomsnittlig mengde HSI per hoveddiett.

| Leverindeks (HSI)<br>diett\Hoveddiett | 0,2 % EPA + DHA           | 1 % EPA + DHA | 1,7 % EPA+DHA<br>TK-kontroll |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------|------------------------------|
| 0% EPA + DHA                          | 1,22 ± 0,06 <sup>ab</sup> | 1,29 ± 0,09   | 1,29 ± 0,09                  |
| 2 % EPA                               | 1,40 ± 0,07 <sup>a</sup>  | 1,24 ± 0,04   | 1,17 ± 0,07                  |
| 2 % DHA                               | 1,14 ± 0,05 <sup>b</sup>  | 1,34 ± 0,07   | 1,17 ± 0,04                  |
| 2 % EPA+DHA                           | 1,44 ± 0,09 <sup>a</sup>  | 1,20 ± 0,13   | 1,22 ± 0,06                  |
| TK- kontroll                          | 1,22 ± 0,09 <sup>ab</sup> | 1,23 ± 0,05   | 1,23 ± 0,05                  |
| Gjennomsnitt                          | 1,27 ± 0,04               | 1,28 ± 0,03   | 1,22 ± 0,03                  |

### 5.5.2 Fett % lever

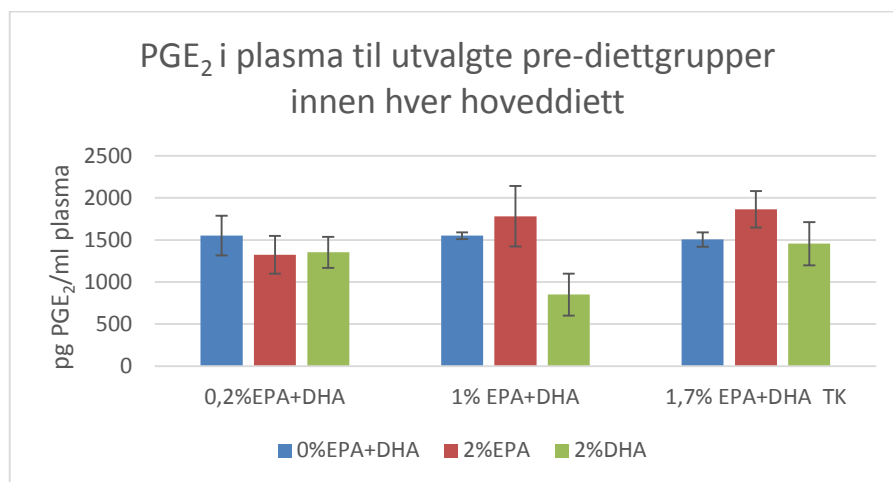
Figur 26 viser signifikant høyere fettprosent i lever til laks fôret med laveste nivå av EPA og DHA i fôret fra 400 gram til 3,5 kg fiskestørrelse. Figuren viser videre at det er pre-dietten i tidlig livsfase som har

størst betydning for det økte fettnivået i 0,2 % gruppen ved slaktestørrelse. Pre-diettgruppene føret med 0 % EPA+ DHA + 2% EPA har høyere fettprosent i lever når fisken når slaktestørrelse.



Figur 26 Fettprosent i lever i pre-diettgruppene 0% EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK- kontroll (2,2 % EPA + DHA) (prediettphase 40 gram til 400 gram) etter føring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til slaktestørrelse. Figuren viser også gjennomsnittlig mengde leverfett per hoveddiett.

Det proinflammatoriske eikosanoidet PGE<sub>2</sub> produseres i stor grad i lever og er kjent for å øke i konsentrasjon med økende n-6 fettsyrer i plasmamembranen. Figur 27 viser ingen signifikante effekter på konsentrasjonen av PGE<sub>2</sub> i plasma til laks i de ulike diettgruppene.

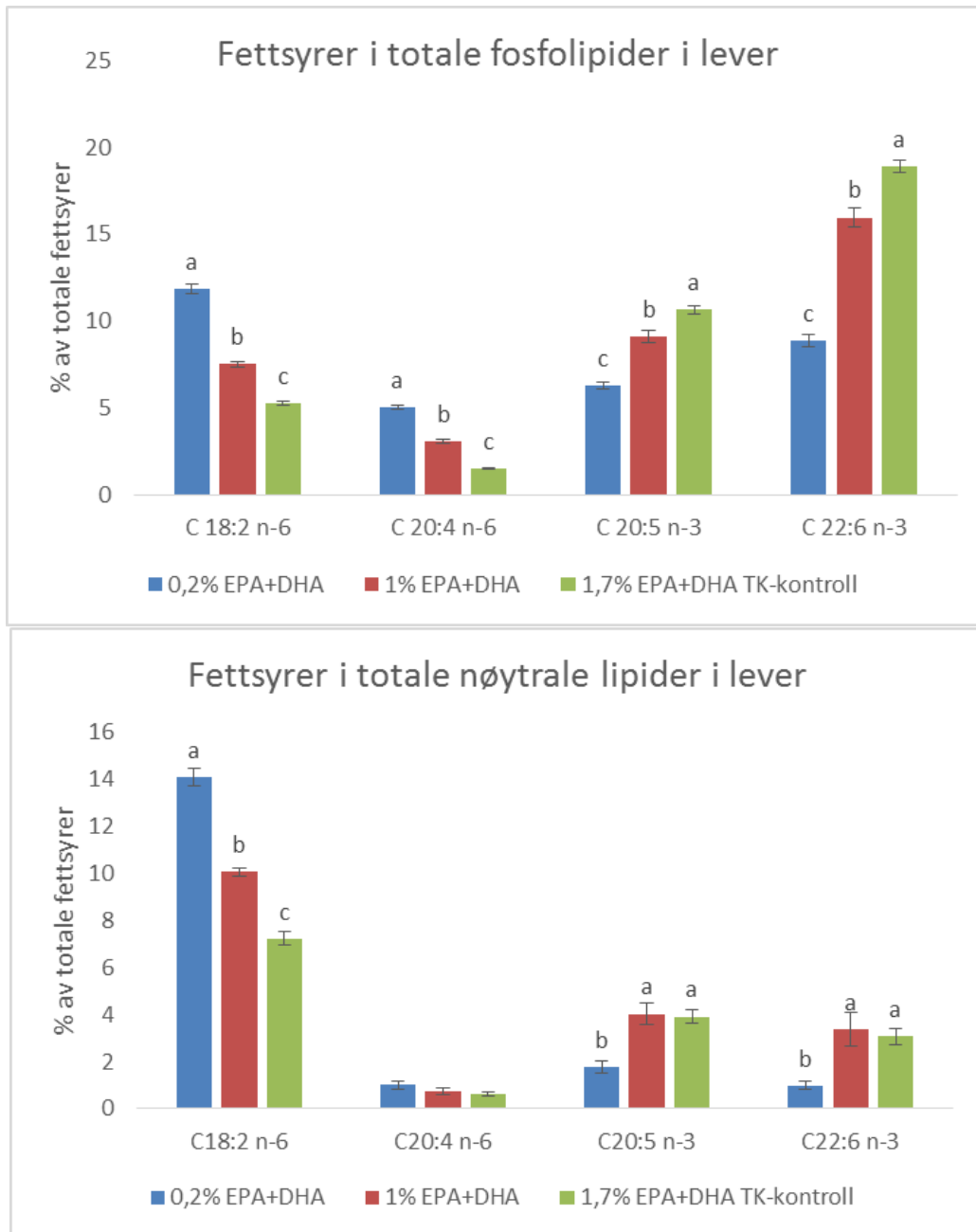


Figur 27 PGE<sub>2</sub> i plasma i prediettgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA og 2 % DHA (pre-diettphase 40 gram til 400 gram) etter føring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til slaktestørrelse.

### 5.5.3 Fettsyrer i totale polare og nøytrale lipidklasser i lever

Figur 28 oppsummerer effektene av hoveddiettene på sentrale fettsyrer i polare (fosfolipider) og nøytrale (triglyserider) levelipider. Figuren viser at DHA og EPA, i prosent av totale fettsyrer, reduseres med redusert mengde av disse fettsyrene i føret. Parallelt med nedgangen i EPA og DHA øker spesielt

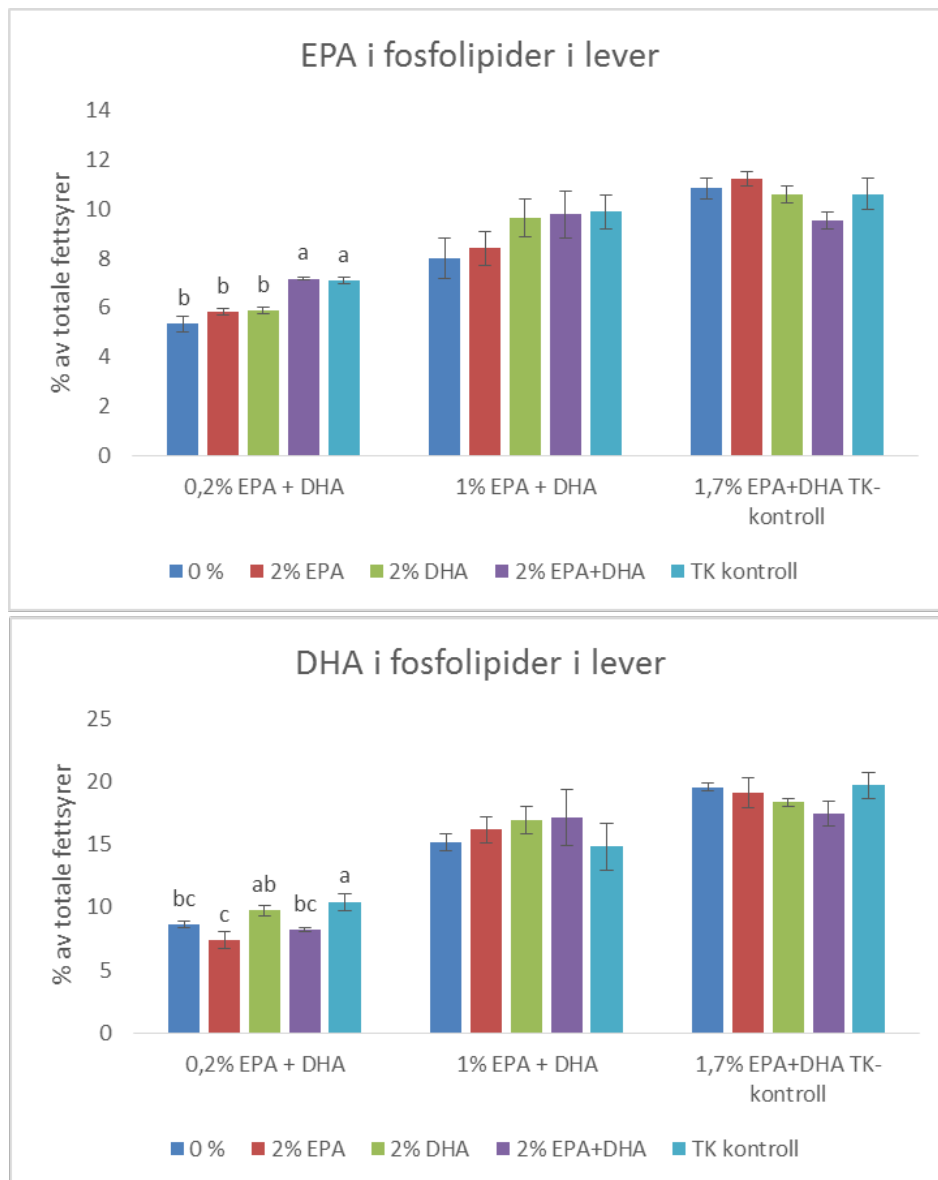
18:2n-6 i triglyserider og også 20:4n-6 i fosfolipider. (Total fettsyresammensetning av de ulike diettgruppene er presentert i vedlegg 1)



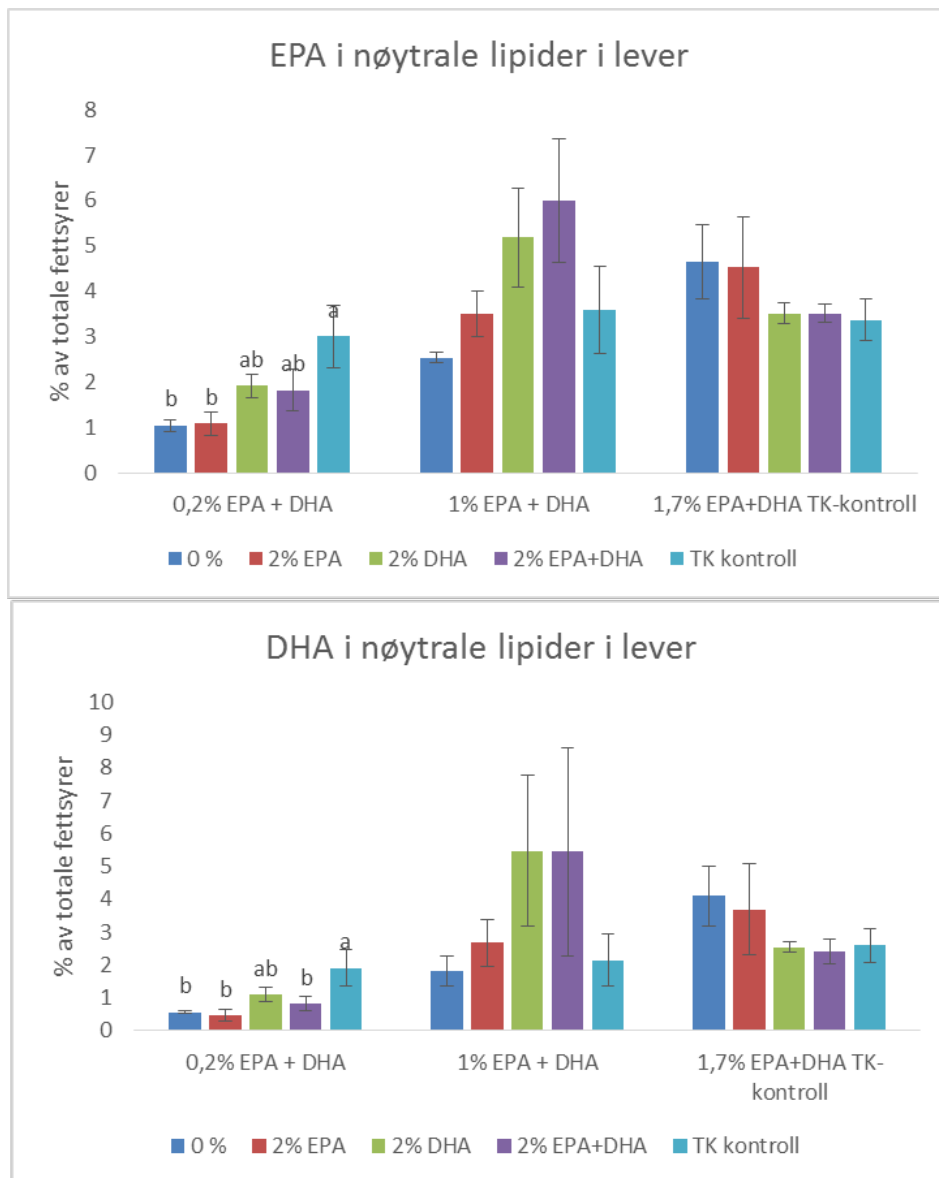
Figur 28 Noen fettfetsyrer i fosfolipider og i nøytrale lipider i lever i hoveddiettgruppene 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til 3.5kg.



Figurene 29 og 30 viser nivåene av EPA og DHA i nøytrale lipider og polare lipider i predinettgruppene 0 % EPA, 2 % EPA, 2 % DHA, 2 % EPA+ DHA og TK innen hver av hoveddiettgruppene 0,2 % EPA+DHA, 1 % EPA+DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK). Resultatene viser signifikante predietteffekter på nivåene av EPA og DHA innen hoveddiettgruppe 0,2 % EPA+DHA. Dataene tyder dermed på at lever er følsom for førsammensetningen i de tidligere livsfaser når den føres med lave nivåer av EPA og DHA i senere livsfaser.



Figur 29 EPA og DHA i fosfolipider i lever, gjennomsnitt av pre-diettgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK- kontroll (2,2 % EPA + DHA) (pre-diettfase 40 gram til 400 gram), etter føring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til 3.5kg.



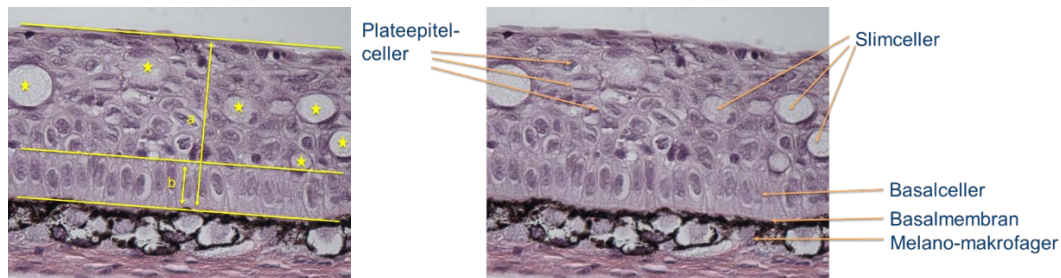
**Figur 30** EPA og DHA nivå i nøytrale lipider i lever, gjennomsnitt av pre-diettgruppene 0 % EPA + DHA, 2 % EPA, 2 % DHA og TK- kontroll (2,2 % EPA + DHA) (pre-diettfase 40 gram til 400 gram), etter fôring med tre hoveddietter 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) fra 400 gram til 3.5 kg.

## 5.6 Skinn

Det er kjent fra pattedyr at ved essensiell fettsyremangel, så vil ikke huden være det prioriterte organet for konservering av disse livsviktige fettsyrene, noe som fører til hudproblemer som f.eks. eksem. Huden er et av de første tegnene på fettsyremangel i menneske, noe som er en av grunnene til at det ble foretatt en del analyser av skinnet til laksen i dette forsøket. Det er ikke tidligere kjent om skinnet er følsomt for essensiell fettsyremangel i fisk.

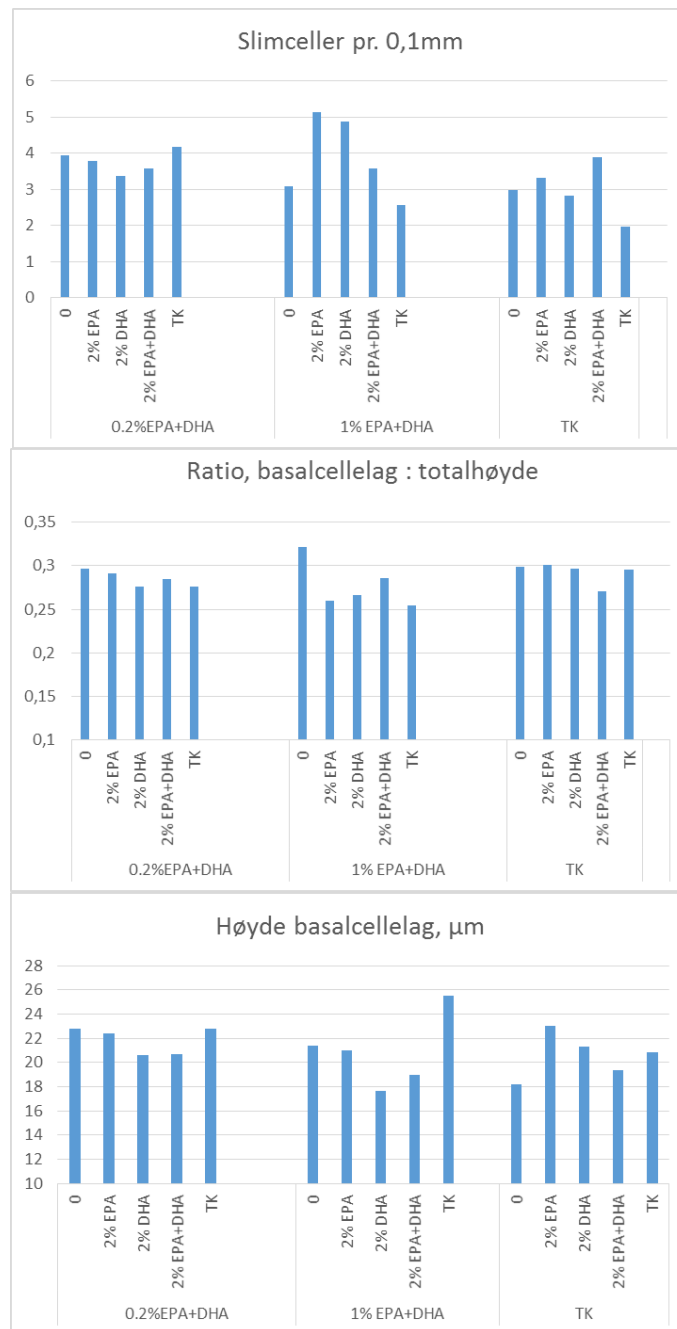
### 5.6.1 Skinn histologi

Slimproduksjonen i skinn er en del av fiskens første barriere mot ytre mekanisk påvirkning og beskyttelse mot mikrober. I tidligere livsfaser tydet våre data på at DHA nivået i predietten hadde betydning for antall slimceller i skinn og vi ønsket å undersøke hvorvidt dette var tilfellet også når fisken nådde en slaktevekt på 3.5 kg (Figur 31).



Figur 31 Mikroskopi og analyse av antall slimceller (4X) i skinn (\*). Antall slimceller i snittet omregnes til antall per 0,1mm. Tykkelse av epidermis (a), tykkelse av basalcellelaget (b) og ratio a:b beregnes. Mikroskopibildet viser et eksempelbilde av skinnet til laks i forsøket.

Resultatene viste store individuelle forskjeller i antall slimceller, tykkelse av epidermis og basalcellelaget, og det ble ikke funnet tydelige effekter av fôr på disse måleparameterne i skinn når fisken var 3,5 kg (Figur 32). Selv om det ikke var signifikante effekter på antall slimceller når laksen var 3,5 kg, var det flest antall individer i DHA predietgruppen som hadde flest slimceller ved 3,5 kg, noe som kan tyde på at fôring i tidlig livsfase kan ha betydning for antall slimceller i skinnet.

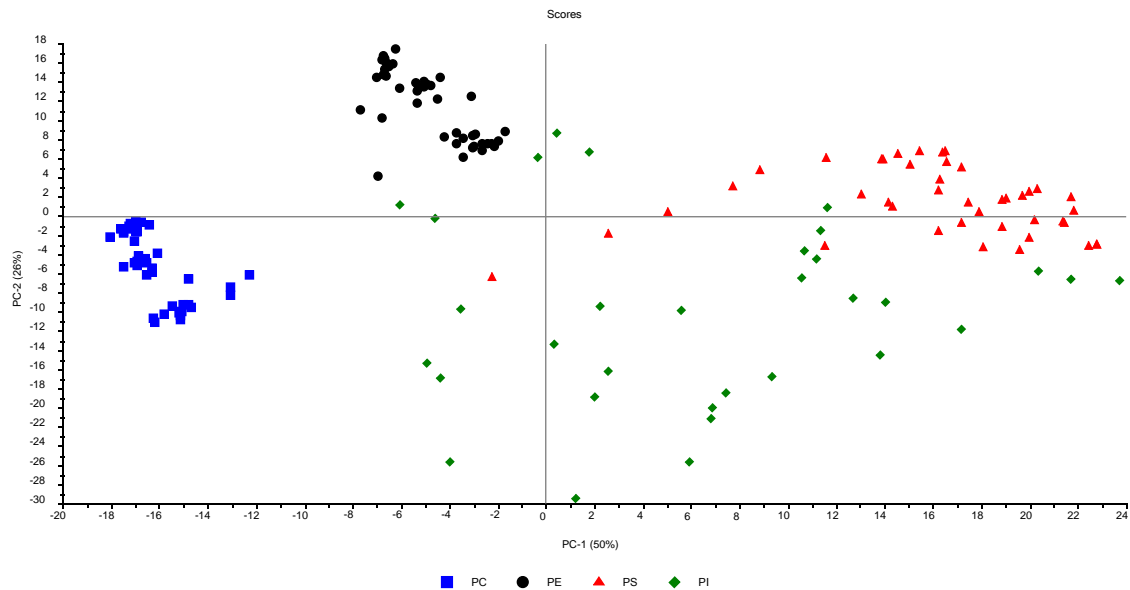


Figur 32 Viser antall slimceller i snittet omregnet til antall per 0,1mm. Tykkelse av epidermis i  $\mu\text{m}$ , Tykkelse av basalcellelaget og ratio basalcellelag:totalhøyde. Analysene viser både effekt av hoveddiett og prediett.

## 5.6.2 Fettsyrer i skinn

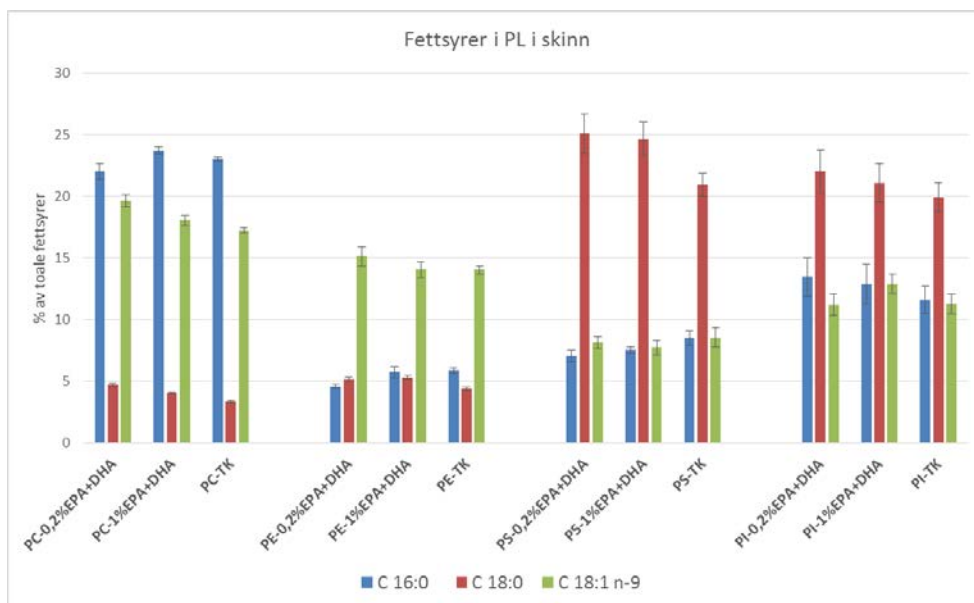
Det ble utført prinsipal komponent analyse (PCA) i Unscrambler for å få en oversikt over hvordan sammensetningen av de mest sentrale cellemembranfosfolipidklassene, PC, PE, PI og PS i skinn til laksen påvirkes av de ulike diettene. Hele datasettet ble benyttet, det vil si, vi inkluderte både prediettgrupper og hoveddiettgrupper i analysen. I figur 33 ser vi tydelig at analysen deler prøvene inn i 4 helt klare grupperinger for PC, PE, PI og PS, noe som viser at sammensetningen av de ulike lipidklassene er særegen for hver gruppe (de har særegen sammensetning uavhengig av diettgruppe). Ved å plote de ulike scorene i henhold til prinsipal komponentene (PC), ser vi etter fettsyrer i dataene som spesifikt

kan relateres til egenskaper ved de ulike fosfolipidklassene og vi kan se etter fellestrekk ved de ulike prøvene i de 4 ulike lipidklassene (Figur 34). I denne figuren ser vi at det er 6 fettsyrer (20:5n-3, 22:6n-3, 18:1n-9, 16:0, 18:0 og 20:4n-6) som grupperer seg helt klart ut mot kantene som signifikant forskjellig mellom de ulike lipidklassene i de ulike diettgruppene. Det er utført PCA analyse av dietteffekter spesifikt innen de ulike fosfolipidklassene, disse plottene finnes i vedlegg 2. Her har vi valgt å ta ut de 6 fettsyrene som fordeler seg signifikant forskjellig mellom de ulike fosfolipidklassene og kun presentere diett effekten på disse i figurene 34 og 35.

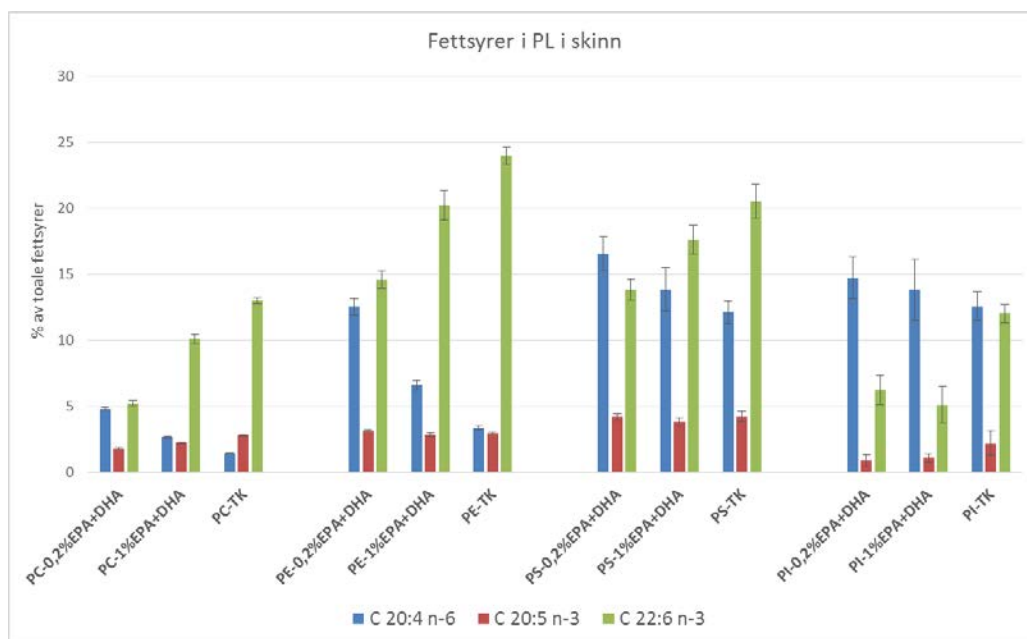


**Figur 33** *Multivariatanalyse (PCA plot, principal component analyses) av lipidklassesammensetning av skinn til laks fôret ulike pre-dietter og hoveddietter. Analysen viste ingen signifikante effekter av pre-dietter, det fokuseres derfor kun på effekter av hoveddietter i presentasjonen. PC=phospahtidylcholine, PS=phospatidylserine, PI=phospatidyl inositol, PE=phospatidyletanolamine.*





Figur 35 Viser hvordan fettsyrene 16:0, 18:0 og 18:1n-9 fordeler seg i de ulike lipidklassene PC, PE, PI og PS og videre hvordan disse fettsyrene påvirkes av fettsyresammensetningen av hoveddiettene 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+DHA og TK med 1,7 % EPA+DHA.



Figur 36 Viser hvordan fettsyrene 20:4n-6, 20:5n-3 og 22:6n-3 fordeler seg i de ulike lipidklassene PC, PE, PI og PS og videre hvordan disse fettsyrene påvirkes av fettsyresammensetningen av hoveddiettene 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+DHA og TK med 1,7 % EPA+DHA.

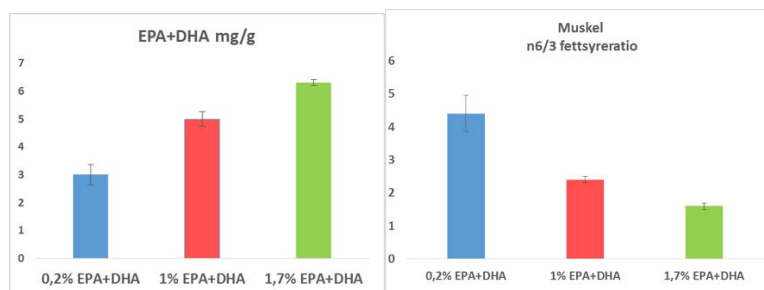
## 6 Konklusjon

### Overlevelse i sjø

Resultater fra prosjektet tyder på at 1 % EPA og DHA i fôret, et nivå som tidligere var ansett som nedre behovsnivå, er for lavt til at fisken kan opprettholde god helse under krevende miljøbetingelser. Laks fôret på 1 % EPA og DHA eller lavere, døde i betydelig større grad enn laks fôret med 1,7 % av disse fettsyrene i fôret når fisken ble utsatt for gjentatt håndteringsstress som avlusning ved høye vanntemperaturer.

### Muskel

**Fettsyre:** Laks fôret på 0,2 % EPA+DHA i vekstfasen fra 400 gram til 3,5 kg hadde 2,9 % EPA og DHA sammenlignet med 5,5 % av disse fettsyrene i muskel til laks fôret med TK dietten. Når nivåene av EPA og DHA reduseres i muskel, så øker nivåene av plantefettsyrene 18:2n-6 og 18:1n-9.



Figur 37 EPA+DHA nivå (mg/g) og n6/n3 fettsyre ratio i muskel i hoveddiettgruppene 0,2 % EPA + DHA, 1 % EPA+ DHA og 1,7 % EPA+DHA (TK kontroll) i 3.5 kg laks.

Ser vi på de kvantitative verdiene (figur over), så inneholder 0,2 % gruppen ca 0,3 gram EPA+DHA per 100 g muskelfilet (NKS), 1 % gruppen 0,5 gram EPA+DHA per 100 gram og tilnærmet kommersiell kontrollgruppe 0,6 gram EPA+DHA per 100 gram filet.

Dersom man tar utgangspunkt i at mennesker har behov for 250 mg EPA+DHA per dag, så vil man få dekket dagsbehovet for disse essensielle fettsyrene ved å spise 100 gram filet til laks fôret med 0 % EPA + DHA i fôret i perioden fra 40 gram til 400 gram og deretter med 0,2 % i fôret fram til 3,5 kg. Dette tyder på at det meste av EPA og DHA som finnes i muskel har laksen produsert selv fra 18:3n-3 (ALA). 0,2 % gruppen har en n6/n3 ratio på 4,5 sammenlignet med ca 1 i TK gruppen, noe som betyr at laksen i 0,2 % gruppen bidrar med mer n-6 fettsyrer enn n-3 fettsyrer til det humane kostholdet. Selv om laksen er en stor egenprodusent av EPA og DHA både i 0,2 % og 1 % gruppene, så tyder dataene fra dette prosjektet for øvrig på at disse nivåene i fôret er for lave til å sikre laksen god helse under krevende miljøforhold.

### Farge

Laks fôret på 0,2 % dietten hadde lavere astaxanthin nivå og høyere idoxanthinnivå i muskelfilet enn laks fôret på kontroldietten. Resultater fra tidligere livsfaser tyder på at DHA kan være involvert i regulering av carotenoidmetabolismen i laksen.



### **Fettdeponering i indre organer**

Mangel på EPA og DHA fører til økt fettakkumulering i midttarm og lever. Dette kan utgjøre en risikofaktor for utvikling av metabolsk induisert lavere-grads inflammasjon.

### **Tarm**

Lave nivåer av EPA og DHA i fôret førte til reduksjon av de antiinflammatoriske fettsyrene EPA og DHA i tarmens fosfolipider og økning av de pre-inflammatoriske fettsyrene 18:2n-6 og 20:4n-6. Det ble observert røde og svulne tarmer og unormal vakuolisering. I tillegg ble det observert LPS i plasma, som kan indikere skader på midttarm og lekkasje av lipopolysakkarid fra tarmmicrobiota til blodbanen. Dette er en tilstand som i humanmedisin er kjent for å øke inflammasjonsrisikoen (dette må verifiseres).

### **Skinn**

Multivariatanalyse av membranlipidene fra skinn viser at disse er mindre konserverte i skinnen enn i tarm og lever. Når omega-3 nivået i fôret reduseres, så har det ganske dramatisk effekt de ulike fosfolipidene i skinnen ved at DHA i veldig stor grad erstattes av arakindonsyre (20:4n-6). Mikroskopianalyser viste ingen store forskjeller i skinnmorfologien annet enn en tendens til at DHA i tidlige livsfaser ser ut til å kunne øke antallet slimceller.

I pattedyr vil mangel på omega-3 fettsyrer i stor grad påvirke skinnhelse og føre til bl.a eksem. Det er viktig å finne ut om lave nivåer av EPA og DHA også påvirker skinnfunksjonen til laksen. Denne studien har vist at lave nivåer av omega-3 i fôret har stor innvirkning på sammensetningen av membranlipidene.

### **Røntgen**

Lave EPA og DHA nivåer i fôret førte til manglende virvelmellomrom i ryggrad.

## 7 Leveranser

### Foredrag på konferanser:

- Bente Ruyter. Ernæring og fiskehelse. Invitert innledningsforedrag. Det 12. norske Fiskeernæringsseminar i Bergen 5. og 6. november. 2015.
- Bente Ruyter. Omega-3 fettsyrer, eksempler fra sentrale forskningsspørsmål. AquaNor, 18. august 2015, Trondheim. Felleskonferansen FHF og NFR.
- Bente Ruyter, Gerd Marit Berge, Marta Mira Bou, Grete Bæverfjord, Trygve Sigholt og Trine Ytrestøyl. Lave omega-3 nivåer i fôr og fiskehelse. FHF's fiskehelsesamling Bergen, Flesland 1-2 September 2015.

### Andre presentasjoner:

- Bente Ruyter. Cermaq seminar. Betydningen av omega 3 fettsyrenivå i fôr til laks. 24. november. 2015, Alta, Foredrag.
- Bente Ruyter. Lave omega-3 nivåer i fôr og fiskehelse, Dialogmøte 21. Januar. 2015, Gardermoen, Foredrag.
- Bente Ruyter. Omega-3 og fiskehelse, Dialogmøte 25. november. 2015, Bergen, Foredrag
- Bente Ruyter. Omega-3 og fiskehelse, Dialogmøte 19. mai. 2016, Bergen, Foredrag.

**Nofima Næringsnytte 2015:** Artikkel, hva er nok omega-3 for laksen.

### Andre nyhetsoppslag:

#### Nytt oppslag i massemedia

| Mediets navn  | Type innslag                                       | Dato (ååååmmdd) |
|---------------|--|-----------------|
| Kyst.no       | Lite omega 3 gjør fisken syk                       | 20150902        |
| Forskning.no  | Laksehjerte slår utenom kroppen                    | 20150317        |
| ILAKS         | Man kan ikke uten videre øke mengden omega-3 i fôr | 20150818        |
| kyst.no       | Høyere lakseoverlevelse med nok omega 3            | 20150814        |
| IntraFish     | Omega-3 nivået i fôret påvirker fiskehelsen        | 20150902        |
| Phys.org      | Utilisation of feed ingredients rationally         | 20140113        |
| Adresseavisen | Fiskemel og fiskeolje i fôret er erstattet         | 20160422        |
| Forskning.no  | Hvor mye plantekost tåler fisken                   | 20130101        |

## 8 Referanser

- Folch. J., Lees. M. & Stanley. G.H.S. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of biological chemistry*. 226. 497-509.
- Kjær, M.A., Todorcevic, M., Torstensen, B.E., Vegusdal, A., Ruyter, B. (2008) Dietary n-3 HUFA Affects Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Capacity and Susceptibility to Oxidative Stress in Atlantic Salmon. *Lipids*, 43 (9): 813-827.
- Mason. M.E., Eager. M.E. & Waller. G.R. (1964) A Procedure for the Simultaneous Quantitative Determination of Glycerol and Fatty Acid Contents of Fats and Oils. *Analytical Chemistry*. 36. 587-590.
- Ruyter. B., Rosjo. C., Einen. O. & Thomassen. M.S. (2000a) Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*. 6. 119-127.
- Ruyter. B., Rosjo. C., Einen. O. & Thomassen. M.S. (2000b) Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*. 6. 109-117.
- Ruyter. B. & Thomassen. M.S. (1999) Metabolism of n-3 and n-6 fatty acids in Atlantic salmon liver: stimulation by essential fatty acid deficiency. *Lipids*. 34. 1167-1176.
- Torstensen B.E., Ruyter, B., Sissener, N.H., Østbye, T.-K., Waagbø, R., Jørgensen, S.M., Ytteborg, E., Rud, I., Liland, N., Mørkøre, T., Dessen, J.E. (2013). Utredning av Fett for Fiskehelse, Effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse og velferd (robust fisk). Rapport til FHF, juni 2013.
- Ytrestøl, T., T.S. Aas, and T. Åsgård. 2015. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*. 448:365-374.

