

Ernæringsbehov og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk

Del 1: Berggylt

Ingrid Lein, Gerd Marit Berge, André Sture Bogevik, Grete Bæverfjord, Kristin Hamre, Grete Hansen Aas, Trond Kortner, Katerina Kousoulaki, Åshild Krogdahl, Sofie Remø og Øystein Sæle





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

Nofima har om lag 370 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 Johnsenegate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Ernæringsbehov og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk Del 1 berggylt</p>	<p>ISBN 978-82-8296-694-8 (pdf) ISSN 1890-579X</p> <p><i>Rapportnr.:</i> 31/2021</p>
<p><i>Title:</i> Nutritional needs and feeding for optimal health and survival of cleanerfish Part 1 Ballan wrasse</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Ingrid Lein, Gerd Marit Berge, André Sture Bogevik, Grete Bæverfjord, Kristin Hamre (HI), Grete Hansen Aas (NTNU Ålesund), Trond Kortner (NMBU Veterinærhøgskolen), Katerina Kousoulaki, Åshild Krogdahl (NMBU Veterinærhøgskolen), Sofie Remø (HI) og Øystein Sæle (HI)</p>	<p><i>Dato:</i> 30.09.2021</p>
<p><i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 80+8</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 901331</p>
<p><i>Stikkord:</i> Rensefisk, berggylt, rognkjeks, ernæring, hovednæringsstoff, mikronæringsstoff, lipid, katarakt</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 12034</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Berggylt bør i alle livsstadier tilbys fôr som er prosessert ved lave temperaturer, som agglomerering eller kaldekstrudering, fordi dette gir bedre mineralisering og mindre deformiteter, og også redusert dødelighet hos berggylt yngel.</p> <p>Skal nivået av fett eller fosfolipider i fôr til berggylt økes bør dette skje i form av marine fosfolipider. Høyt fettinnhold og høy andel marine fosfolipider ga økt vekst hos berggylt, delvis som fett i muskel og lever, samt bedre tarmhelse. Økt innhold av marine fosfolipider i fôret kan muligens brukes som en strategi for å øke energireservene og velferdsstatusen hos berggylt i forkant av vintermånedene.</p> <p>Fordi det benyttes råvarer av høy kvalitet i fôr til berggylt er det lite behov for å tilsette ekstra vannløselige vitaminer, med unntak av vitamin C. Behovet for vitamin C dekkes ved 170 mg/kg tørt fôr.</p> <p>Enkelte mineraler er vanskelig tilgjengelige for berggylt sannsynligvis fordi den mangler mage med lav pH. Samspill mellom kobber og sink gjør at vi foreslår tilsetning på henholdsvis 15 og 90 mg/kg. For mangan anbefales opp til 16 mg/kg. Flere undersøkelser må til for å gi klare svar på behov for ulike vitaminer og mineraler hos berggylt.</p> <p>Krill og fjørfeprodukter er aktuelle råvarer som kan redusere innblandingen av kostbart torskemuskel- og rekemel i fôr til berggylt. Total utbytting av disse ingrediensene i fôr til berggylt på 30-70 g ga redusert overlevelse og signifikant lavere vekst. Innblandingsnivå og tilsetning av enkeltkomponenter må optimaliseres for å finne en kombinasjon som kan erstatte dagens standard.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>Feed for ballan wrasse should be processed at low temperatures to reduce the prevalence and severity of skeletal deformities in ballan wrasse. Increased content of marine phospholipids in the feed can possibly be uses as a strategy to increase the energy reserves in ballan wrasse. The requirement for micronutrients seems to be close to the recommended numbers for salmon. Krill and poultry products can be cheaper alternatives to cod muscle and shrimp meal in feeds for ballan wrasse. However, total replacements with poultry meal resulted in reduced survival and significantly lower growth. More research is needed to optimize both the optimal combination of different feed ingredients and the requirements for specific micronutrients.</p>	

Forord

Prosjektet «**Ernæringsbehov og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk**» ble opprettet med bakgrunn i et innspill til FHF fra Nofima, Nifes (nå HI), NMBU og NTNU Ålesund. Endelig prosjektbeskrivelse ble utformet etter innspill fra referansegruppen utnevnt av FHF.

Det har vært et stort og omfattende prosjekt, med mange forsøk og omfattende analysearbeid. Vi har derfor valgt å dele rapporten i to, en på rognkjeks og en på berggylt. Kapittel 2 – Innledning, og Kapittel 3 – Problemstilling og formål, er identisk i de to rapportene.

Prosjektet har hatt et totalbudsjett på 22.915.000 kr, alt finansiert av FHF.

Finansiert av:



FOU-partnere:



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet



Innhold

1	Sammendrag (både på norsk og engelsk)	1
2	Innledning	3
2.1	Faglig bakgrunn for prosjektet	3
2.2	Prosjektets omfang.....	4
2.3	Prosjektorganisering.....	5
2.3.1	Nøkkelkompetanse, ansvar og roller til personer i prosjektgruppen.....	5
3	Problemstilling og formål	7
3.1	Prosjektets effektmål	7
3.2	Prosjektets resultatmål	7
3.2.1	Hovedmål	7
3.2.2	Resultatmål for rognkjeks.....	7
3.2.3	Resultatmål for berggylt.....	8
3.3	Nytteverdi.....	8
4	Prosjektgjennomføring og resultater – forsøk med berggylt	9
4.1	Forteknologi berggylt	9
4.1.1	Materiale og metoder	9
4.1.2	Resultat og vurdering	13
4.2	Fett i fôr til berggylt, totalfett, nivå og type fosfolipid	23
4.2.1	Materiale og metoder	23
4.2.2	Resultater	27
4.2.2.1	Overlevelse	27
4.2.2.2	Vekst og biometri	27
4.2.3	Energimetabolisme og fettransport	33
4.2.4	Fettsyredistribusjon i lever og muskel.....	36
4.2.5	Røntgenevaluering	44
4.2.6	Histomorfologi.....	46
4.2.7	Konklusjoner.....	53
4.3	Mikronæringsstoff i fôr til berggylt	54
4.3.1	Materiale og metoder	54
4.3.2	Resultat.....	57
4.3.3	Diskusjon	66
4.4	Alternative råvarer i fôr til berggylt.....	68
4.4.1	Materiale og metoder	68
4.4.2	Resultat og vurdering	69
5	Oppnådde resultater	75
6	Hovedfunn	76
7	Leveranser	77
8	Referanser	79

1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Prosjektet har hatt som hovedmål å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring av rensefisk, og med dette bidra til å utvikle fôr som sikrer produksjon av rensefisk med god overlevelse, helse og velferd, noe som er en forutsetning for at rensefisken skal fungere effektivt som lusespisere.

I det første forsøket med berggylt ble det vist at bruk av standard ekstrudert fôr (høy prosess temperatur) i weaningperioden påvirket opptaket av viktige mineraler som fosfor og kalsium negativt, og førte til alvorlige skjelettdeformiteter og dårlig mineralisering. Hos større berggylt ga samme fôr økt dødelighet sammenlignet med agglomerert eller kaldekstrudert fôr som begge er prosessert ved lavere temperatur. Kaldekstrudering med justering av temperaturen kan utføres med samme utstyr som benyttes til standard ekstrudering av kommersielle fôr. Basert på disse resultatene anbefaler vi bruk av agglomerert eller kaldekstrudert fôr i alle livsstadier hos berggylt.

I forsøk med ulike fettnivåer, fosfolipidnivåer, og kilder til fosfolipid (marint/vegetabilsk) ble det vist at økning av vegetabilsk fosfolipid ga redusert tilvekst, og en tendens til høyere grad av betennelsesreaksjoner i tarmen. Dietter med høyt fettinnhold og høy andel marine fosfolipider ga derimot bedre tilvekst, dels som økt fett i muskelvev og lever, og ga også bedre tarmhelse. Ut fra disse resultatene mener vi at økt innhold av marint fosfolipid kanskje kan benyttes som en strategi for å øke energireservene og velferdsstatusen hos berggylt i forkant av vintermånedene.

Fordi berggylt ikke ser ut til å like smaken av fiskemel benyttes råvarer av høykvalitet, f.eks. torskemuskel. Det er derfor lite behov for å tilsette vannløselige vitaminer, med unntak av vitamin C. For vitamin C ble behovet nådd med 170 mg/kg fôr, noe som er betydelig lavere enn for rognkjeks.

Fordi berggylt mangler mage med lav pH er enkelte mineraler lite tilgjengelige. På grunn av et antatt sterkt samspill mellom kobber og sink foreslår vi en tilsetning på henholdsvis 15 og 90 mg/kg for disse. Maksimumsnivå for sink ser ut til å være ca. 90 mg/kg for å unngå å blokkere opptak av kobber, og 190 mg/kg for å unngå toksiske sinknivåer i fisken. For mangan ser behovet ut til å dekkes med ca. 16 mg/kg.

Røntgenundersøkelser gjort på fisk fra forsøk 2 (Fett/FL) og 3 (Mikronæringsstoffer) viste høy forekomst av ulike skjelettdeformiteter allerede ved oppstart av forsøkene, og det ble funnet liten effekt av de ulike behandlingene. Fisken i forsøk 1, 2 og 3 var alle produsert i kommersielle anlegg. Det er velkjent at skjelettdeformiteter er en utfordring i oppdrett av berggylt. Resultatene fra forsøk 1 (Prosessmetode), og forsøk 2 og 3 viser at det er et stort behov for en større innsats for å oppnå god mineralisering og beinutvikling i de tidlige livsstadier hos berggylt.

Krill og fjørfeprodukter er aktuelle råvarer som kan redusere innblandingen av kostbart torskemuskel- og rekemel i fôr til berggylt. Total utbytting av disse ingrediensene i fôr til berggylt på 30-70 g ga tilsynelatende redusert overlevelse og signifikant lavere vekst. Innblandingsnivå og tilsetning av enkeltkomponenter må optimaliseres for å finne en kombinasjon som kan erstatte dagens standard.

Dette har vært et pionerprosjekt når det gjelder næringsbehov hos berggylt, og bidrar med åpent tilgjengelig grunnleggende kunnskap om ernæring av berggylt som kan brukes i formulering og prosessering av fôr til berggylt. Det vil likevel være behov for videre arbeid for å få mer utfyllende kunnskap om næringsbehovene hos denne arten.

English summary

Feed for ballan wrasse should be processed at low temperatures to reduce the prevalence and severity of skeletal deformities in ballan wrasse. Increased content of marine phospholipids in the feed can possibly be used as a strategy to increase the energy reserves in ballan wrasse. The requirement for micronutrients seems to be close to the recommended numbers for salmon. Krill and poultry products can be cheaper alternatives to cod muscle and shrimp meal in feeds for ballan wrasse. However, total replacements with poultry meal resulted in reduced survival and significantly lower growth. More research is needed to optimize both the optimal combination of different feed ingredients and the requirements for specific micronutrients.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet

Prosjektet har hatt som hovedmål å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring av rensefisk, og med dette bidra til å utvikle fôr som sikrer produksjon av rensefisk med god overlevelse, helse og velferd, noe som er en forutsetning for at rensefisken skal fungere effektivt som lusespisere.

Rensefisk er en viktig ikke-medikamentell ressurs i bekjempelse av lakselus. I dag benyttes både villfanget og oppdrettet rensefisk i laksemerdene. Det gjøres en kraftig innsats for å øke produksjonen av oppdrettet rensefisk med mål om å dekke næringens behov. Rognkjeks og berggyllt er de to artene det satses på. Derfor er det for disse artene kunnskapsbehovet er mest akutt og der innsatsen bør konsentreres når det gjelder ernæring og fôring.

Riktig fôrsammensetning og fôringsstrategi er blant de fundamentale forutsetningene for god funksjon, helse og velferd hos alle dyr i fangenskap. Kunnskap om fôr og ernæring til rensefisk var i utgangspunktet mangelfull, og det var derfor tvingende nødvendig å styrke dette kunnskapsgrunnlaget. Økt kunnskap om fôr og ernæring kan bidra til at oppdrettet rensefisk etter hvert kan dekke laksenæringens behov, slik at det ikke blir nødvendig å benytte villfanget fisk i laksemerdene. Dette vil være positivt i forhold til forvaltning av ville bestander av leppefisk, og samtidig sikre bedre kontroll med helse og velferd, noe som vil bidra til å bedre næringens omdømme.

Rognkjeks og berggyllt er to arter med svært ulike fordøyelsessystem, noe som kan føre til forskjellige krav til fôr for de to artene. Mens berggyllt mangler magesekk og blindtarm, og har en kort tarm, har rognkjeks både mage, blindsekk og en relativt lang tarm. Rognkjeks har et godt utviklet fordøyelsessystem allerede ved klekking, og kan startfôres direkte på formulert fôr. Berggylltlarver har mindre størrelse, og er mindre utviklet ved startfôring, og må derfor startfôres med levende fôr. Rognkjeks er lite kresen, og ser ut til å akseptere de fleste aktuelle ingrediensene. Ved overgang til tørrfôr har berggyllt vist seg å være svært kresen med hensyn til smakelighet på fôret, noe som har medført at fôr til berggylltyngel produseres ved bruk av utvalgte marine ingredienser av høy kvalitet, og dermed høye kostnader (Kousoulaki, Bøgevik et al. 2015, Kousoulaki, Grøtan et al. 2021).

En god tarmfunksjon og helse er av avgjørende betydning for ethvert dyrs produksjon, helse og motstandskraft mot sykdom. Tarmen inneholder det største og kanskje mest komplekse immunogene organet i en dyreorganisme. Den har også en rekke andre strukturer og mekanismer som bidrar til at stoffer og organismer som kan true funksjon og helse, nøytraliseres. Tarmens immunforsvar kommuniserer aktivt med andre organer som utøver barrierefunksjoner som gjeller og skinn og også med hodenyre og milt. Det er derfor viktig å studere og dokumentere hvordan endringer i fôrsammensetning, fôringsregime og fôrets tekniske kvalitet kan påvirke disse funksjonene.

Rognkjeks kan vokse svært hurtig, noe som ikke nødvendigvis er positivt. Fisken blir raskt for stor til å fungere effektivt som lusespiser i merd. Berggyllt vokser derimot sakte, noe som anses som positivt i sjøfasen fordi den kan følge laksen gjennom hele produksjonen. Det er viktig å ta hensyn til at forskjellige arter har forskjellig behov, og dessuten at næringsbehov er en dynamisk størrelse som varierer med fôrfaktor, veksthastighet, livsstadium og miljøforhold.

Robust rognkjeks og berggylt med solid helse og ernæringsstatus er målet. Dette innebærer lav dødelighet og lite deformiteter i produksjonssyklusen, og er en forutsetning for at rensfisken skal trives i laksemerdene og gjøre jobben sin der. Dagens fôr blir hovedsakelig formulert ut fra antatt minimumsbehov for næringsstoffer, basert på erfaringer og kunnskaper om andre fiskearter og analyser av villfisk av samme art (Hamre, Nordgreen et al. 2013). Kunnskap om optimal sammensetning av fôr omfatter både balanse mellom hovednæringsstoffer, og behov for essensielle næringsstoffer og mikronæringsstoffer.

Denne type studier er svært ressurskrevende både med hensyn til gjennomføring av forsøk, fôrproduksjon, analyser og arbeidstimer. Prosjektet har derfor prioritert å legge ressursene på å klarlegge behov for makro- og mikronæringsstoffer, samt studier av hvordan de ulike fôrene påvirker fiskens tarmhelse og immunforsvar. For berggylt var også undersøkelse av alternative råstoffer til fôr et viktig tema.

Vi har valgt å vektlegge begge artene omtrent likt med hensyn til forsøksarbeid, selv om produksjonen av rognkjeks pr i dag er størst og kunnskapen om arten er minst. Dette fordi berggylt regnes som den mest effektive rensfisken av alle artene som i dag er i bruk, og den er også lite utsatt for sykdom. Utfordringen med å produsere et fôr som fungerer godt for berggylt er en viktig årsak til at produksjonen av berggylt er liten sammenlignet med rognkjeks. Dersom en lykkes med målene i dette prosjektet vil produksjonen av berggylt kunne forenkles og effektiviseres. Når det gjelder fôr og fôring i merd har vi lagt opp til at vi på bakgrunn av resultatene fra forsøkene som gjennomføres i prosjektet skal kunne designe fôr som er egnet for både rognkjeks og berggylt i sjø.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet startet i 2017, og avsluttes i 2021. Fordi en har jobbet med to arter som er nye i oppdrett har en støtt på enkelte utfordringer med tilgang og kvalitet på forsøksfisk noe som har medført forsinkelser. FHF har derfor innvilget en utsettelse på avslutning av prosjektet på ca. 1 år. Næringen (Mowi, Salmar, Havlandet Marin Yngel, Skjærneset fisk, og Lumarine AS) har raust bidratt med forsøksfisk av både rognkjeks og berggylt, og i tillegg øyerogn av rognkjeks for produksjon av forsøksfisk ved Nofima.

Prosjektet har totalt omfattet syv forsøk:

AP 1: Fôrteknologi og pelletkonsistens for berggylt

AP 2.1: Fett i fôr til berggylt: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av fett, ulik andel fosfolipider, og type fosfolipid påvirket tilvekst, velferd og helse hos berggylt.

AP 2.2: Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks: Forsøket undersøkte hvordan balansen mellom protein, fett og karbohydrat i fôret påvirker tilvekst, velferd og helse hos rognkjeks fra 1 til 40 gram.

AP 3.1: Mikronæringsstoff berggylt: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av mikronæringsstoffer i fôret påvirker tilvekst, velferd og helse hos berggylt.

AP 3.2: Mikronæringsstoff rognkjeks: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av mikronæringsstoffer i fôret påvirker tilvekst, velferd og helse hos rognkjeks.

AP 4.1: Råvarer i fôr til berggyllt: Forsøket undersøkte om alternative råvarer kan brukes i stedet for dyre råvarer som reke og torskemuskel.

AP 5: Katarakt: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av enkelte aminosyrer, vitaminer og astaxanthin påvirker utvikling av katarakt hos rognkjeks.

AP 6: Tarmhelse og immunforsvar: I denne arbeidspakken er tarmfunksjon, tarmhelse og immunforsvar blitt undersøkt ved prøver fra flere av forsøkene.

2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet er ledet av Nofima som har hatt det administrative ansvaret overfor FHF. Det har vært et tett samarbeid mellom partnere på tvers av ansvarsområder og arbeidspakker. Prosjektet har en relativt stor referansegruppe, dette med bakgrunn i den store interessen fra næringen for prosjektet ved oppstart.

Prosjektet er resultat av diskusjoner mellom forskere ved Nofima, Nifes/Havforskningsinstituttet, NMBU Veterinærhøgskolen og NTNU Ålesund, og bygger på kunnskapsbehov som er definert både av næringsaktørene selv, og av forskningsmiljøene.

Alle de totalt sju fôringsforsøkene er utført ved Nofima sin forskningsstasjon på Sunndalsøra. Alle forsøksfôr er produsert ved Nofima sitt fôrteknologisenter i Bergen.

Havforskningsinstituttet har hatt ansvar for næringsstoffanalyser, og NMBU Veterinærhøgskolen har hatt ansvaret for analyser av tarmfunksjon og -helse.

Diskusjon og rapportering av resultater har vært et samarbeid mellom partnerne.

NTNU Ålesund skulle opprinnelig delta i arbeid med rensefisk i laksemerder i sjø, men på grunn av høye kostnader med de mer grunnleggende forsøkene på land ble forsøksaktivitet i sjø tatt ut av prosjektplanen etter diskusjoner med FHF og referansegruppen. NTNU Ålesund har derfor kun deltatt som diskusjonspartner i faser av prosjektet.

2.3.1 Nøkkelkompetanse, ansvar og roller til personer i prosjektgruppen

Nofima:

Ingrid Lein: Oppdrett av marin yngel, inkludert rensefisk
Gerd Marit Berge: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk,
Katerina Kousoulaki: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk
Andre Sture Bogevik: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk
Grete Bæverfjord: Fiskehelse og røntgenanalyser

HI (Nifes):

Øystein Sæle: Fiskeernæring marin fisk
Kristin Hamre: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk
Sofie Remø: Fiskeernæring, helse og velferd
Elisabeth Holen: Immunologi

NMBU-Veterinærhøgskolen:

Åshild Krogdahl: Ernæring, tarmfunksjon og helse hos fisk

Trond Kortner: Ernæring, tarmfunksjon og helse hos fisk

Elvis Chikwati: Histopatologi og tarmhelse

PhD-student Weiwen Zhou: Ernæring, tarmfunksjon og helse hos fisk

NTNU Ålesund:

Grete Hansen Aas: Fiskeernæring og -velferd

Referansegruppe ved avslutning av prosjektet:

Kjetil Heggen - Lerøy Seafood Group ASA – leder av referansegruppen

Pål Skjold - Lerøy Seafood Group ASA

Helge Staven – SalMar ASA

Nina Iversen – Namdal Rensefisk AS

Henriette Glosvig – Mowi Norway AS

Unni Austefjord – Mowi Norway AS

Henny Førde – Måsøval Fiskeoppdrett AS

Halvard Hovland – Havlandet Marin Yngel AS

Det har vært noe utskiftning av medlemmer i referansegruppen i løpet av prosjektperioden.

3 Problemstilling og formål

3.1 Prosjektets effektmål

Bruk av rensefisk har vært, og er, en viktig brikke i bekjempelse av lakselus, men det har over flere år vært problematisk at dødeligheten har vært høy for både rognkjeks og berggylt. Det er derfor nødvendig å skaffe kunnskap om alle faktorer som kan bidra til bedre velferd, helse og overlevelse hos rensefisk. Ernæring er sannsynligvis en av de viktigste faktorene, og mer kunnskap på dette området vil kunne medvirke til produksjon av rensefisk som fungerer bedre som lusespisere. Bedre velferd og overlevelse hos rensefisken er også en forutsetning for å få fortsatt samfunnsmessig aksept for å bruke rensefisk i laksemerdene framover.

Kunnskap om ernæringsbehovet hos dyr i oppdrett er grunnleggende for å kunne produsere friske dyr. Åpent tilgjengelig kunnskap om ernæring av rensefisk har vært begrenset, derfor forventes det å ha det stor nytteverdi at prosjektet framskaffer slik kunnskap. Dette vil kunne bidra til et bedre grunnlag for produksjon av fôr som næringen kan ta i bruk.

Prosjektet skal komme næringen til nytte ved å:

- Bidra til økt overlevelse, helse og velferd hos rognkjeks og berggylt gjennom optimalisering av fôrsammensetning.
- Gi kunnskap om artsspesifikke ernæringsbehov hos rognkjeks og berggylt.
- Bidra til å bedre næringens omdømme gjennom bedre overlevelse, helse og velferd hos rensefisken.
- Bidra til at næringen på en forsvarlig måte blir selvforsynt med oppdrettet rensefisk med god overlevelse og helse.
- Prosjektet vil gi informasjon som kan benyttes direkte i produksjonen av fôr til rensefisk.
- Prosjektet skal bidra til bedre overlevelse og helse hos rensefisken, og dermed bidra til bedre resultat hos oppdrettere både av rensefisk og laks

3.2 Prosjektets resultatmål

3.2.1 Hovedmål

Prosjektet har som mål å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring og fôring for å kunne utvikle fôr og fôringsstrategier som sikrer at vi produserer rensefisk med god overlevelse, helse og velferd, og som fungerer effektivt som lusespisere.

3.2.2 Resultatmål for rognkjeks

- 1) Klarlegge effekter av ulik balanse mellom protein, fett og karbohydrater gjennom flere livsstadier hos rognkjeks.
- 2) Klarlegge behov for vitaminer og mineraler hos rognkjeks.
- 3) Klarlegge faktorer i fôr som kan påvirke rognkjeksens evne til osmoregulering, spesielt med tanke på katarakt.

3.2.3 Resultatmål for berggylt

- 1) Klarlegge hvordan ulik teknologi i fôrproduksjonen påvirker vekst og utvikling hos berggylt, med spesiell vekt på tilvekst, overlevelse og utvikling av deformiteter.
- 2) Undersøke effekter av fettnivå og -kvalitet i fôr til berggylt.
- 3) Klarlegge behov for vitaminer og mineraler hos berggylt.
- 4) Undersøke alternative råvarer i fôr til berggylt, for om mulig å kunne produsere billigere fôr.

3.3 Nytteverdi

Prosjektet har gitt ny kunnskap som vil bidra til bedre tilpasset fôr til både berggylt og rognkjeks. Det har kommet fram ny kunnskap om behov for hovednæringsstoffer og mikronæringsstoffer hos begge arter. For rognkjeks er det kommet ny kunnskap om effekt av antioksidanter og aminosyrer i fôret på katarakt. For berggylt er også alternative, og billigere fôrråstoff undersøkt i tillegg til effekt av prosesseringsmetoder i forbindelse med produksjon av fôr til tidlige stadier hos berggylt. Det siste viste at ekstrudering av fôret ved lavere temperatur enn standard har svært positiv effekt på overlevelse og beinutvikling hos berggylt. Denne informasjonen er allerede tatt i bruk hos kommersielle produsenter av fôr til rensefisk.

Det må understrekes at dette er blant de første systematiske ernæringsstudiene som har vært utført med rognkjeks og berggylt. Arbeidet har delvis vært påvirket av at kvaliteten på forsøksfisk ikke har vært tilfredsstillende, og dette kan til en viss grad ha påvirket resultatene. Likevel mener prosjektgruppen at dette er et pionerarbeid som har resultert i mye ny og grunnleggende kunnskap om ernæring hos disse to artene som kan benyttes inn mot både forskning og kommersiell produksjon av fôr til rensefisk.

4 Prosjektgjennomføring og resultater – forsøk med berggylt

Alle fôringsforsøk er utført ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra, i småskala enheter. Dette ble valgt for å ha kontrollerte forhold i forsøkene, og med en forutsetning om at hovedtrekkene i næringsbehov vil være de samme også når fiskene overføres til merder i sjø. Forsøk med rensefisk i laksemerder er mer krevende fordi mange ytre faktorer kan påvirke resultatene, og når formålet er å undersøke grunnleggende næringsbehov, var det ønskelig å redusere andre faktorer enn det som var knyttet til fôrsammensetning i dette prosjektet. Det vil senere være nødvendig å undersøke hvordan ulike miljøfaktorer også kan påvirke næringsbehov.

Produksjon av forsøksfôr ble gjort ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Til berggylt valgte vi å benytte kaldekstrudert fôr til de tre siste forsøkene med bakgrunn i resultatene i det første forsøket med berggylt (AP1). Gjennomføringen av prosjektet har vært avhengig av forsøksfisk fra kommersielle aktører.

4.1 Forteknologi berggylt

Vi beskriver to forsøk hvor effekt av fôrteknologi på overlevelse, vekst og utvikling hos berggylt ble undersøkt. Forsøk 1 omfatter overgangen fra levende fôr til tørrfôr (weaning), og ble gjennomført i samarbeid mellom Nofima og Mowi. En stor del av analysene og resultatbearbeidingen er utført i regi av CleanFeed. Resultatene fra weaning-forsøket danner grunnlaget for forsøket med større berggylt (Forsøk 2). Arbeidet fra denne arbeidspakken er publisert som open access-artikkel, og detaljene kan finnes der (Kousoulaki, Grøtan et al. 2021) (<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114830>).

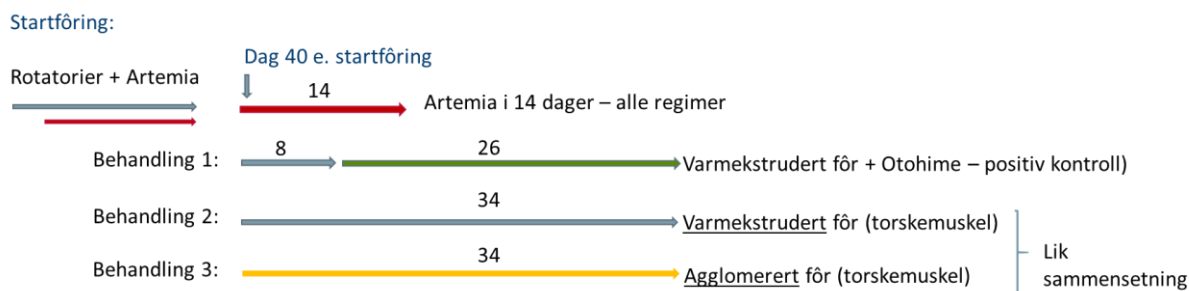
4.1.1 Materiale og metoder

Forsøk 1: Weaningforsøk – overgang fra levendefôr til tørrfôr

Bakgrunnen for dette forsøket er tidligere erfaringer med at ekstrudert fôr ser ut til å forårsake alvorlige skjelleitdeformiteter hos berggylt, spesielt i hodet.

Fôringsregime, fôrformulering og produksjonsmetodikk

Forsøket sammenlignet tre ulike fôringsregimer i overgangen fra levende fôr til tørrfôr. En kommersiell weaning-protokoll brukt som positiv referanse (Behandling 1, Figur 1). Larvene i alle tre regimene fikk *Artemia* i tillegg til tørrfôr de første 14 dagene. Referansegruppen fikk varmekstrudert Nofima-fôr i 8 dager før skifte til et kommersielt kaldekstrudert fôr (OTOHIME). I behandling 2 og 3 fikk larvene forsøksfôr som hadde lik sammensetning (Tabell. 1), men var prosessert forskjellig, dvs. enten varmekstrudert (WEx) eller agglomerert (Agg). De tre fôringsregimene er vist i Figur 1.



Figur 1 Fôringsregime i Forsøk 1 (weaning).

Det er tidligere vist at berggyllt ikke liker smaken av fôr som inneholder konvensjonelt fiskemel eller fiskeolje. Derfor ble forsøksfôrene (Nofima-dietten) produsert med mel fra torskemuskel, reke, krill og akkar. Samme resept ble brukt i Forsøk 1 og 2, og sammensetningen av fôrene er vist i Tabell 1.

Tabell 1 Sammensetning i fôrene produsert av Nofima.

	g/100g
Rekemel	28,5
Torskemuskel	45,15
Krill hydrolysat	6,6
Pregleflo	7,5
Krillolje	3,5
Hvete	3,5
Vitaminer	2,27
Mineraler	1,85
Cholin klorid	0,5
Aquate	0,4
Tau, Met, Lys	0,2
Carophyll pink (10 %)	0,03

Fôringsforsøk

40 dager etter klekking ble 200 larver med en snittvekt på 34,5 mg fordelt i hvert av 15 kar med volum 200 liter. Larvene ble fôret etter de tre regimene som er vist i Figur 1, dvs. 3 kar per behandling. Fram til dag 14 ble alle behandlinger co-fôret med 25 000 *Artemia*/kar, deretter ble de kun fôret med formulert fôr. Karene hadde gjennomstrømning, og ingen luftbobling. Det ble brukt naturlig lysregime med lys som slapp gjennom transparent tak. Vannmengden ble gradvis økt fra 0-400 ml/min på dag 20. Larvene ble håndfôret tre ganger daglig i starten, deretter med belteautomat når en så at de gikk etter de formulerte fôrene. Karbunnen ble rensed daglig. Oksygen ble sjekket daglig, og holdt på 96-100 %. Gjennomsnittlig temperatur var 16 + 0,5°C. Forsøket varte i 34 dager. Tilvekst, overlevelse og andel fisk med deformiteter ble registrert ved forsøksavslutning. Fiskelarvene ble ved oppstart og avslutning av forsøket analysert for protein, lipider, mineraler, fettsyrer og totale og frie aminosyrer.

Beinmorfologi og CT-skanning

Micro-CT skanning ble gjort med en SkyScan 1275 X-ray microtomograph (Bruker MicroCT, KONTICH, Belgium). Parameterne ble justert for hver prøve for å optimalisere bildene. For innstillinger se (Kousoulaki, Grøtan et al. 2021).

Forsøk 2 Yngelforsøk (11-40 g)

I Forsøk 2 ble fôret produsert etter samme resept som for Forsøk 1. De tre fôrene ble imidlertid produsert på tre ulike måter: 1) ekstrudert under standard betingelser; 2) kaldekstrudert eller 3) agglomerert. Fôrene ble produsert ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Agglomerert fôr ble produsert som beskrevet i (Kousoulaki, Bøgevik et al. 2015). Forskjellen på de to ekstruderte fôrene er at innstillingene for ekstruderen, hovedsakelig damp og temperatur, er forskjellige (Tabell 2). De ekstruderte fôrene ble produsert med en Wenger TX-52 co-rotating twin-screw extruder med en kapasitet på 150 kg/time. Innstillingene på ekstruderen var «normale», dvs. at produksjonen kan oppskaleres i en fôrfabrikk.

Tabell 2 Ekstruderingsbetingelser ved produksjon av forsøksfôrene.

	Kald ekstrudering	Varm ekstrudering
<i>Prekondisjonering</i>	220	220
Hastighet (rpm)		
Damp (kg/h)	4-6	7-8
Vann (kg/min)	0,150 - Kald	0,150 - Varm
Temperatur (°C)	55-60	85
<i>Ekstruder</i>		
Dyseåpning (mm)	1,25	1,25
Knivhastighet (rpm)	1354	1441
Hastighet (rpm)	160	400
Skjærkrefter (kW)	3,5	5,7
Mekanisk energi/SME (kg/h)	0	0
Vann (kg/min)	0,350	0,330
Trykk ved Head no. 5 (bar)	14	7,8
Trykk ved Head no. 7 (bar)	16	11,7

De tre ulike produksjonsmetodene resulterte i fôr med ulik hardhet: 3,2, 7,7 og 10,1 Newton for agglomerert, kaldekstrudert og varmekstrudert fôr. Testen ble gjort ved hjelp av en tekstur analysator (TA-HDi®, Stable Micro Systems Ltd, Surrey, UK). Denne består av en lastearm med en sylindrisk probe med flat ende (70 cm diam.). Pelletene ble knust enkeltvis mellom proben og bunnplaten.

Fôringsforsøk

I dette forsøket ble det brukt berggytt fra MOWI sitt påvekstanlegg på Fosen. Etter transport med bil til Sunndalsøra ble fisken tilvent forsøkskarene i 14 dager før forsøksstart. I denne perioden fikk fisken samme kommersielle fôr (Ohtohime C2) som før transport til Sunndalsøra. 150 fisk ble fordelt til hvert av totalt 9 forsøkskar. Fisken var i gjennomsnitt 11,4 gram ved innsett. Forsøkskarene hadde et volum på 150 liter, diameter 50 cm, konisk bunn og grå vegger. Karene hadde transparent lokk med åpning for fôring. I hvert kar var det plassert et «mini-skjul» for å gi fisken mulighet til å gjemme seg eller hvile. Alle kar var utstyrt med belteautomat, og et separat lyspunkt (24 t lys) plassert like over lokket. Sjøvannet var filtrert (20 µm) og UV-behandlet. Gjennomsnittlig vanntemperatur var 15,2 °C (13,5-15,3 °C), vanngjennomstrømming 4 l/minutt og oksygenmetning ble holdt på 75-100 %. Gjennomsnittsvekt for forsøksfisk ved start var 12,9 gram. Død fisk ble registrert og fjernet daglig, og total dødelighet beregnet. Det ble målt vekt og lengde på 25 fisk ved start og slutt av forsøket. Ved avslutning av

forsøket ble det også tatt blodprøver, prøver av tarm og lever for tarmstudier, og prøver av hel fisk for kjemiske analyser.

Blod – kjemiske analyser

Ved avslutning ble blodprøver analysert for laktat, glukose, magnesium, kolesterol og triacylglyceroler i serum ved bruk av Pentra C400 HORIBA, HORIBA Medical, Montpellier, Frankrike.

Tarm-mucosa - enzymaktivitet og genekspressjon

Ved avslutningen av forsøket ble prøver av tarmvev analysert for leucine aminopeptidase (LAP) som beskrevet i (Krogdahl and Bakke-McKellep 2005). Enzymaktiviteten er vist som spesifikk aktivitet, per mg protein i homogenat, og som total aktivitet per enhet kroppsvekt.

Ved avslutning av forsøket ble det også gjort ekspresjons-profilering av et panel på 12 gener som spiller en nøkkelrolle i tarmens immun- og fordøyelses funksjon.

Histologi av lever og tarm

Seksjoner av tarmkanalen og leveren fra 36 individer fra avslutningen av forsøket ble preparert og farget med H&E. Seksjonene fra hvert individ ble inndelt og merket som IN1 (fremre avsnitt) IN2, IN3 og IN4 (bakerste avsnitt). Tarmseksjonene ble evaluert ved bruk av mikroskopi. I evalueringen ble det lagt vekt på morfologiske endringer assosiert med betennelsesreaksjoner i tarm-mucosa. Andre morfologiske trekk som er unike for berggytt ble også registrert og gradert under den histologiske evalueringen. Grad av endringer i tarmmorfologi ble gradert etter et skåringssystem med en skala fra 0-4 hvor 0 er normal; 1, milde endringer; 2, moderate endringer, 3; markerte endringer, og 4. alvorlige endringer.

Velferdsskår

Data fra velferdsskåring (25 fisk/kar) ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere gjennomsnittsverdiene til en sumindeks pr kar. Gjennomsnittsverdi for hver egenskap og sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer pr kar.

Kjemiske analyser begge forsøk

Både fôrøksfôrene og hel fisk ble analysert for kjemisk innhold ved bruk av standard metoder: protein, tørrstoff, aske, lipid, fettsyreprofil, salt, Ca, Mg, Na og K, total aminosyre og frie aminosyrer inkludert taurin og anserin, astaxantin og total stivelse og grad av gelatinisering i stivelsen. (Se OA-artikkel (Kousoulaki, Grøtan et al. 2021) for detaljer i analysemetoder).

Statistikk begge forsøk

Biologiske faktorer (overlevelse, lengde/vekt mm) og analysedata ble analysert med en-veis variansanalyse (ANOVA), Microsoft Excel og SPSS 10.0 for Windows. Effekt av behandling blir omtalt som signifikante når $P < 0,05$, mens indikasjoner ble diskutert når $P < 0,1$. Forskjeller i histologiske skår ble analysert ved bruk av Ordinal logistic regresjon run i R statistical package (version 3.6.2; 2019) innen RStudio interphase (versjon 1.2.5033, 2019). Forskjeller ble testet basert på odds ratios, og konfidensintervall hos forsøksgruppene som fikk høyere histologiskår enn fisk fôret med agglomerert fôr. Genekspressjonsdata ble analysert ved bruk av Graphpad Prism version 8.1.2. Diett og tarmregion (IN1 og IN4) ble evaluert som klassevariable i en to-veis ANOVA med interaksjon, og videre evaluert

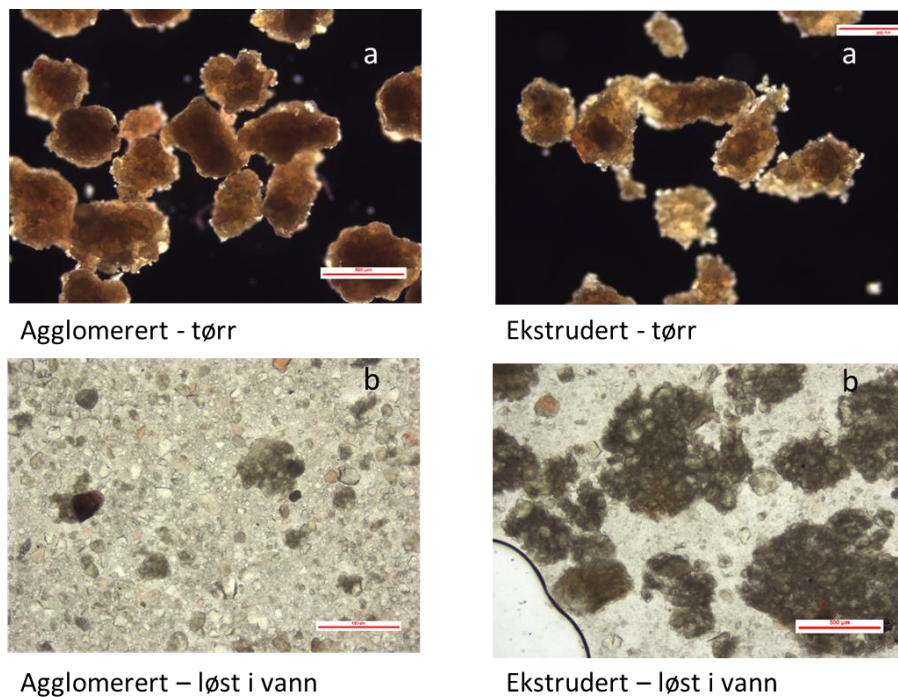
med en post-hoc Sidak's multiple comparisons test. Alle data ble evaluert for homogenitet av variansen og normalitet av resten med bruk av «residual by predicted» plot og histogram. Når nødvendig ble dataene transformert før en andre evaluering. Forskjellene ble betraktet som signifikante når $P=0,05$, og $0,05 < P < 0,1$ er rapportert som trender.

4.1.2 Resultat og vurdering

Forsøk 1: Weaningforsøk – overgang fra levendefôr til tørrfôr.

Teknisk kvalitet på forsøksfôrene

Selv om WEx og Agg-fôrene hadde identisk formulering fungerte de forskjellig som weaningfôr. Forskjellen mellom de to fôrene var produksjonsprosessen. WEx ga mineralmangel, og som en konsekvens av dette mange larver med skjelettdeformiteter. Agg skåret best for alle weaning-parametere sammenlignet med WEx. OTOHIME som ble bruk som referanse og AGG er mykere fôr som er produsert ved lav temperatur og lave nivå av gelatinert stivelse. Disse løser seg lettere i vann sammenlignet med WEX (Figur 2).



Figur 2 Fôrsøksfôrene i tørr form (A) og oppbløtt (B) etter en løselighetstest. Bildene er tatt under lupe. Under testen ble 0,5 g fôr ble løst i 5 ml vann, og ristet kraftig hvert 20 minutt i 1 time.

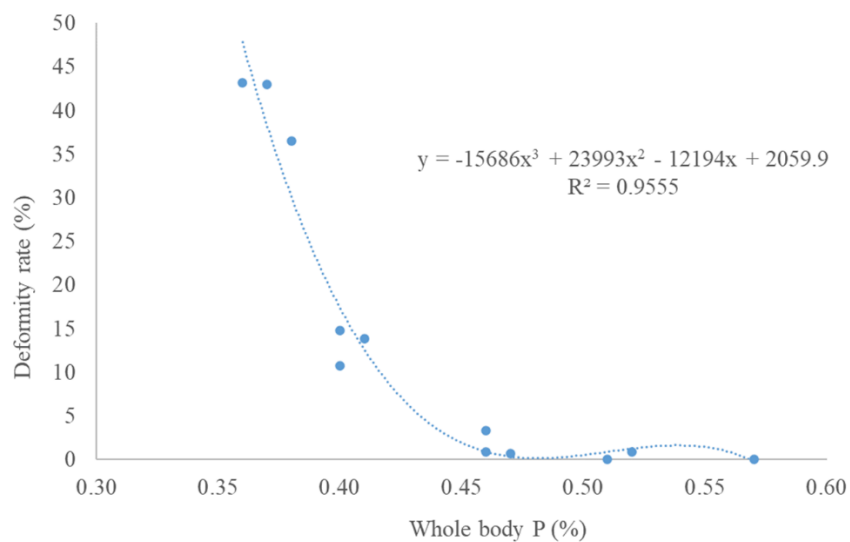
Generell prestasjon

Overlevelse, tilvekst, og andel fisk med deformiteter og finneskader er presentert i tabell 3. Det var ingen statistisk sikre forskjeller mellom behandlingene i vekt ved avslutning av forsøket. Det må imidlertid tas med i betraktningen at overlevelse og andel «tapere» påvirker gjennomsnittlig sluttvekt. Såkalt «taperfisk» kan overleve en periode, men tar opp svært lite fôr, og hadde derfor svært lav vekt ved avslutning av forsøket. Disse ville trolig ikke overlevd videre. Fisk som gikk på det kommersielle fôrregimet (WEx 8 dager + OTOHIME 26 dager) var størst ved avslutning av forsøket, men hadde lavest overlevelse. Som observert tidligere (Kousoulaki, Migaud et al. 2018) utviklet fisk som gikk hele forsøksperioden på ekstrudert fôr med torskemuskel (WEx) mye skjelettdeformiteter (Tabell 3) mens

fisk som ble weanet enten etter den kommersielle protokollen eller med agglomerert fôrsøksfôr (Agg) hadde normal utvikling av hodeskallen.

Mineralisering i kropp

Vi observerte flere signifikante forskjeller i kjemisk sammensetning av larvene på de tre ulike fôringsregimene (Tabell 4). Noen av forskjellene var ventet med bakgrunn i kjemisk sammensetning av fôrsøksfôrene, f.eks. for aminosyreprofil. Den kommersielle dietten OTOHIME hadde 4-6 % høyere innhold av lipider sammenlignet med WEx og Agg. Selv om WEx og Agg har samme formulering med hensyn til total P, Ca og Mg som er viktige mineraler i beinstrukturen, fant vi at disse to fôrene resulterte i signifikante forskjeller i P og Ca i helkropp ved avslutning av forsøket. Fisk foret med WEx viste ingen økning i P i hel kropp i løpet av forsøket mens det var en signifikant økning i både P og Ca i hel kropp hos fisk fôret med AGG ($P < 0,05$) (Tabell 4). Mg, Zn og Fe fulgte samme mønster som P og Ca, men forskjellene var ikke alltid statistisk sikre. Forsøksgruppene med lavere mineralnivå i helkropp ved avslutning av forsøket hadde også større andel fisk med skjelettdeformiteter (Tabell 3). Det var en signifikant positiv korrelasjon mellom P i helkropp og deformitetsrate i gruppen (Figur 3).



Figur 3 Forhold mellom totalt fosforinnhold i hel kropp hos ferdig weanede berggylltarver og forekomst av skjelettdeformiteter i hodeskallen.

Tabell 3 Vekst, overlevelse, deformiteter og finnestatus hos berggyltlarver som har gått på ulike fôr og fôringsregimer. Verdiene er gjennomsnitt ± standard avvik (n=3).

Weaning protokoll	WEx 8 dager + OTOHIME 26 dager	WEx 34 dager	Agg 34 dager	1-WAY ANOVA (P-verdi)
Prosessering av fôr	Ekstrudert + Agglomerert	Ekstrudert	Agglomerert	
Ant. Fisk start	200	200	200	-
Antall fisk slutt	119	126	139	ns
Startvekt (g)	0,035	0,035	0,035	-
Sluttvekt (g)	0,40±0,01	0,36±0,03	0,37±0,08	ns
SGR	7,18±0,11	6,81±0,22	6,86±0,59	ns
Overlevelse - tapere (%)	48±9,22	60±9,67	64±13,71	ns
Deformiteter (%)	0,28 ^a ±0,49	40,86 ^c ±3,79	1,61 ^a ±1,46	0,000
Normal fisk (%)	48,0 ^{ab} ±9,2	34,3 ^a ±8,4	62,7 ^b ±13,2	0,047
Finneslitasje (%)	33	0	33	-

*Tall i samme linje med ulike hevede bokstaver er signifikant forskjellige etter Duncan post-hoc test (P<0,05)

ns: non-signifikant

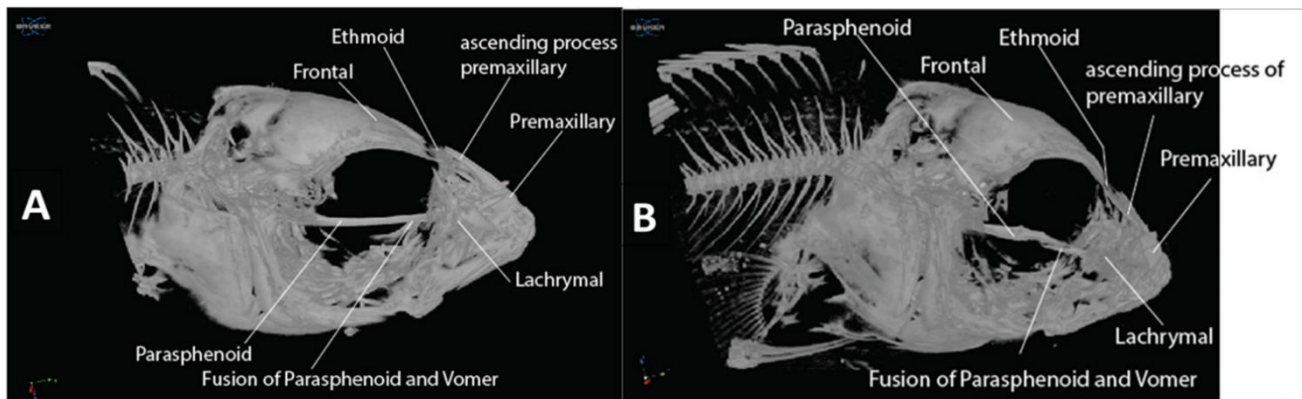
Tabell 4 Kjemisk sammensetning av berggytlarver før og etter weaning med ulike dietter.

Fôrregime		Start	WEx+ OTOHIME	WEx	Agg	Anova* P verdi
Fôrteknologi			Ekstrudering + agglomerering	Ekstrudering	Agglomerering	
Vann %	%	81,5 ^{ab} ±0,2	81,2 ^a ±0,6	81,8 ^b ±0,1	82,0 ^b ±0,1	0,050
Protein	%	12,6 ^a ±0,2	13,9 ^b ±0,4	14,6 ^c ±0,1	14,0 ^b ±0,2	0,000
Fett	%	3,0±0,1	2,4±0,4	2,3±0,6	2,3±0,7	ns
Aske	%	2,33 ^{ab} ±0,21	2,90 ^c ±0,10	2,20 ^a ±0,10	2,57 ^b ±0,06	0,001
Ca	%	0,39 ^b ±0,02	0,61 ^d ±0,01	0,35 ^a ±0,02	0,53 ^c ±0,02	0,000
P	%	0,43 ^c ±0,01	0,53 ^e ±0,03	0,37 ^a ±0,01	0,46 ^d ±0,01	0,000
Ca/P		0,89 ^a ±0,027	1,17 ^c ±0,002	0,95 ^b ±0,027	1,14 ^c ±0,031	0,000
Mg	%	0,042±0,001	0,044±0,001	0,034±0,006	0,037±0,001	0,093
Zn	ppm	22,0 ^b ±1,00	20,5 ^{ab} ±0,71	19,0 ^a ±1,00	21,0 ^b ±1,00	0,029
Fe	ppm	10,3±3,56	10,5±0,71	6,5±1,01	9,9±6,56	ns
Cu	ppm	2,77±1,61	1,65±0,07	2,20±0,62	1,63±0,15	ns
Sum FAA ¹	%	1,06 ^{AB} ±0,05	1,15 ^B ±0,24	0,91 ^{AB} ±0,14	0,83 ^A ±0,08	0,082
Sum total AA ²	%	11,53 ^a ±0,46	13,18 ^b ±0,24	13,72 ^{bc} ±0,56	13,30 ^b ±0,18	0,000
sum total IAA ³	%	5,68 ^a ±0,26	6,78 ^b ±0,15	7,12 ^{bc} ±0,29	6,90 ^b ±0,08	0,000

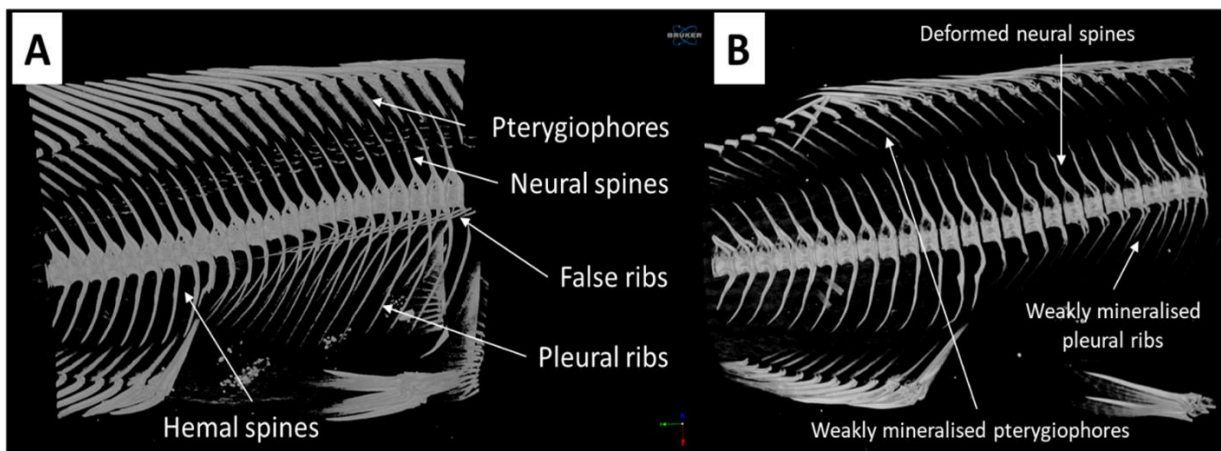
* Tall i samme linje med ulike små eller store bokstaver er signifikant forskjellige eller har tendens til forskjeller. Det er brukt parvis sammenligning med Duncan post-hoc test ($P < 0.05$); ns: ikke signifikant; ¹Frie aminosyrer; ²Aminosyrer; ³Ikke essensielle aminosyrer.

Beinmorfologi

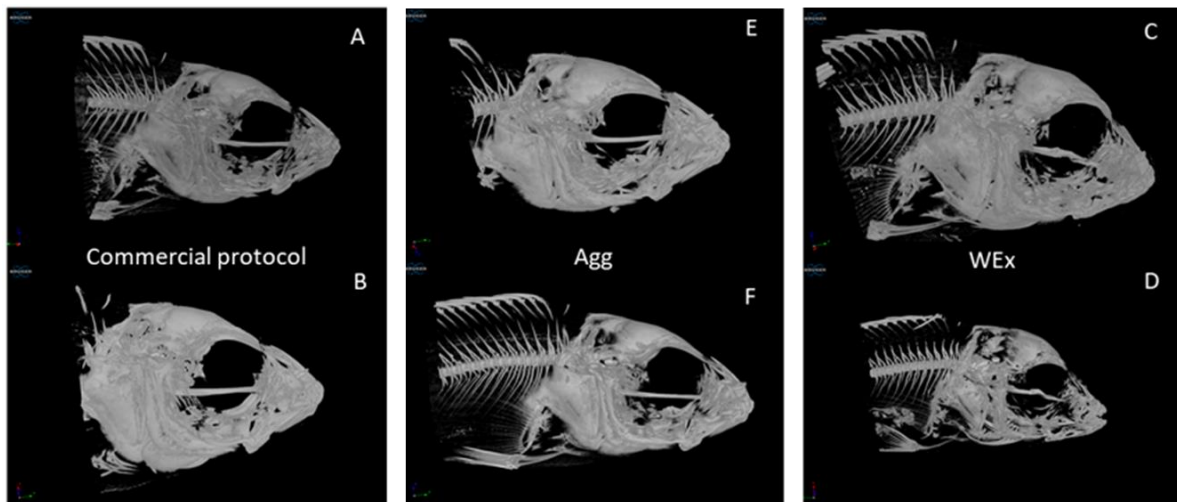
Morfologien av hode og rygg hos weanet yngel ble undersøkt med CT-skanning. Fisk fôret etter den kommersielle protokollen (Figur 4A, og Figur 6A og B), og Agg (Figur 6E og F) hadde normalt lange hoder, mens fisk fôret med WEx (Figur 4B og Figur 6C og D) hadde kortere hode, sammenpresset kjeveområde, og en skarpere vinkel ned mot munnen. Disse hadde også en lavere mineraliseringsgrad, enkelte tilfeller brukket ganeben (parasphenoid). Kombinasjonen av lav P-tilgjengelighet i den ekstruderte dietten sammen med hurtig vekst hos larvene førte til svakere bein og mange skjelettdeformiteter i fisken etter weaning (Figur 5).



Figur 4 CT-scan av kraniet hos berggylltarver. A viser godt mineralisert fisk, og B fisk med dårlig mineralisering. Den siste har skarp vinkel i neseområdet, komprimert munnområde, og brukket ganeben (parasphenoid).



Figur 5 CT-scan av skjelettpartier hos berggylltarver som er A: god mineralisert B: dårlig mineralisert. Den siste har kort, dårlig mineralisert pterygiophorer, kort, deformert og dårlig mineraliserte pleurale ribben og neuralbuer og usynlige falske ribben.



Figur 6 CT-scan bilder av kraniet hos representative berggylltarver som har gått på ulike fôr. A og B: Kommersiell protokoll (WEx (Nofima) 8 dager + OTOHIME (agglomerert) i 24 dager; E og F: Agg (agglomerert) Nofimafôr hele perioden, dvs. 32 dager; C og D: Varmekstrudert Nofimafôr (WEx) hele perioden.

Aminosyrer og lipid i hel kropp

Det var en statistisk sikker økning i proteininnhold i hel kropp fra start til ferdig weaning for alle behandlingene ($P < 0,001$), og også en reduksjon i lipid ($P > 0,05$). Den ekstruderte dietten (Wex) ga signifikant høyere innhold av protein i hel kropp sammenlignet med fisk fôret Agg. Fisk med høyere nivå av mineraler (unntatt Cu) hadde også høyere innhold av total aske. Uavhengig av totalt proteinnivå, var det ingen sikre forskjeller mellom behandlinger når det gjelder de mest essensielle aminosyrene i helkropp ved avslutning av forsøket.

Behandling påvirket nivå av frie aminosyrer i hel kropp. Fisk fôret det kommersielle regimet (WEx + OTOHIME) hadde for eksempel høyest sluttvekt (ikke sign.) ved avslutning av forsøket, og også 2-3 ganger høyere nivå av fri metionin, leucine, isoleucin og fenylalanin på slutten av forsøket. Dette kan ikke forklares med nivået i diettene, men kan trolig vise bedre næringsstatus hos denne fisken.

Forsøk 2 Yngelforsøk (11-40 g)

Generell ytelse

Dødelighet, tilvekst, leverindeks (HSI) og kondisjonsfaktor er vist i tabell 5. Vekten ble tredoblet i løpet av forsøksperioden, men det var ingen statistisk sikre forskjeller mellom behandlingene. Gruppen som ble fôret med ekstrudert fôr hadde signifikant lavere overlevelse enn de som fikk kaldekstrudert eller agglomerert fôr. Fisk som fikk ekstrudert fôr hadde også signifikant høyere HSI sammenlignet med de to andre forsøksgruppene, noe som er et tegn på suboptimal lipidmetabolisme. Relativ levervekt er ofte påvirket av variasjon i sammensetningen av fôret, dvs. ingredienser, innhold av essensielle næringsstoffer, antinæringsstoffer andre komponenter (Caballero-Solares, Xue et al. 2018, Hansen, Kortner et al. 2020). I snitt utgjorde leveren 1,9 % av kroppsvekten.

Tabell 5 Vekst, overlevelse, deformiteter og finnestatus hos berggylt som har gått på ulike fôr og fôringsregimer. Verdiene er gjennomsnitt \pm standard avvik? (n=3).

	Agg	CEx	WEx	ANOVA (P*)
Startvekt (g)	11,4 \pm 0,1	11,4 \pm 0,0	11,4 \pm 0,1	ns
Sluttvekt (g)	37,2 \pm 5,8	36,2 \pm 2,3	33,5 \pm 4,0	ns
Gaffellengde (cm)	11,8 \pm 0,3	12,2 \pm 0,1	11,5 \pm 0,6	ns
SGR	0,93 \pm 0,12	0,92 \pm 0,05	0,85 \pm 0,09	ns
Dødelighet (%)	37,3 \pm 6,1 ^a	41,3 \pm 5,3 ^a	57,3 \pm 2,9 ^b	0,006
Snittvekt prøvefisk (g)	51,9 \pm 2,24	55,5 \pm 2,21	48,3 \pm 6,66	ns
HSI (hos prøvefisk)	1,74 \pm 0,03 ^a	1,88 \pm 0,10 ^a	2,06 \pm 0,09 ^b	0,009
Kondisjonsfaktor (prøvefisk)	3,10 \pm 0,25	3,06 \pm 0,04	3,11 \pm 0,16	ns

* Tall på samme linje med forskjellige små eller store bokstaver er signifikant forskjellige fra hverandre i følge parvis sammenligning med post-hoc test (P<0,05); ns: ikke signifikant.

Kroppssammensetning

Vi fant ingen statistisk sikre forskjeller i mineralisering i hel kropp hos større berggylt, selv om det var tendenser til forskjeller ved avslutning av forsøket. Dette skiller seg fra det vi fant i weaningforsøket, med unntak av K som var lavere i WEX-gruppen enn i CEx-gruppen (Tabell 6). Vi så samme trend for andre mineraler, med høyest mineralinnhold i helkropp hos fisk fra CEx, middels for Agg, og lavest innhold i fisk fôret med Wex (pair sample T test: P<0,01) (Tabell 6).

Tabell 6 Tørrstoff i hel kropp og mineralsammensetning i berggylyngel som gitt fôr som er prosessert på ulike måter, og dermed har ulike fysiske egenskaper.

	Agg	CEx	WEx	ANOVA (P*)
Tørrstoff % (g/100g)	30,6\pm1,2	31,4\pm1,1	30,9\pm0,7	ns
Ca (mg/kg)	10300 \pm 2402	10800 \pm 1311	9967 \pm 929	ns
Na (mg/kg)	1400 \pm 0	1500 \pm 173	1333 \pm 58	ns
K (mg/kg)	3667 \pm 58 ^{ab}	3900 \pm 200 ^b	3567 \pm 58 ^a	0,042
Mg (mg/kg)	423 \pm 25	443 \pm 31	417 \pm 31	ns
P (mg/kg)	6800 \pm 1153	7333 \pm 802	6500 \pm 436	ns

* Tall i samme linje som har ulike små eller store bokstaver er signifikant forskjellige etter en parvis sammenligning med Dun post-hoc test (P<0,05); ns: ikke signifikant.

Blodanalyser

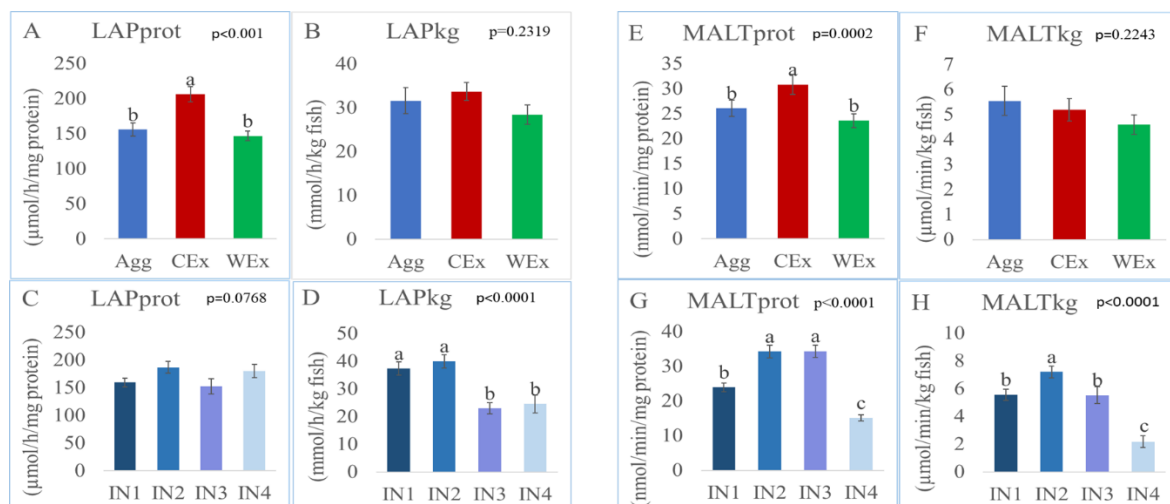
Det var ingen statistisk sikre forskjeller mellom forsøksgruppene når det gjelder kjemisk innhold i serum, men det var tendens til høyere fett-nivåer i fisk fôret med Wex (P=0,1). Videre var det en signifikant korrelasjon mellom serum triglyserider og kolesterol som indikerer at denne gruppen brukte mer lipider som energi sammenlignet med de andre to gruppene. Sammen med suboptimal mineralisering og lavere relativ essensiell til ikke-essensielle aminosyrenivåer i hel fisk tyder dette på at både proteiner og mineraler er mindre tilgjengelige i ekstrudert pellet hos berggylt, mens tilgjengeligheten av lipider kan være høyere. Serumanalysene samsvarer med høyere HSI i fisk fôret med CEx, noe som indikerer høyere lipidakkumulering i leveren hos fisken som fikk denne behandlingen. Det at fisken som gikk på de to ekstruderte behandlingene hadde høyere HSI enn fisk fôret med aggregert fôr kan indikere suboptimal kapasitet når det gjelder utnyttelse av lipider i fôr.

Tarmvekt

Den relative vekten av tarmseksjonene var signifikant forskjellige, og avtok fra fremre til bakre del, fra 0,55 til 0,29 %. Totalt utgjør tarmen 1,6 av kroppsvekten, noe som er mye lavere enn hva som observeres i Atlantisk laks (Kortner, Penn et al. 2016, Li, Kortner et al. 2019). Det ble ikke funnet effekt av diett på tarmvekt. Hos Atlantisk laks er det godt kjent at relativ vekt av tarmseksjonene varierer med variasjon i nivå av næringsstoff og antinæringsstoffer i fôret, og kan fungere som en nyttig biomarkør for responser induert av fôrsammensetning (Hansen, Kortner et al. 2020, Krogdahl, Kortner et al. 2020, Li, Kortner et al. 2020).

Enzymaktivitet i tarmvev

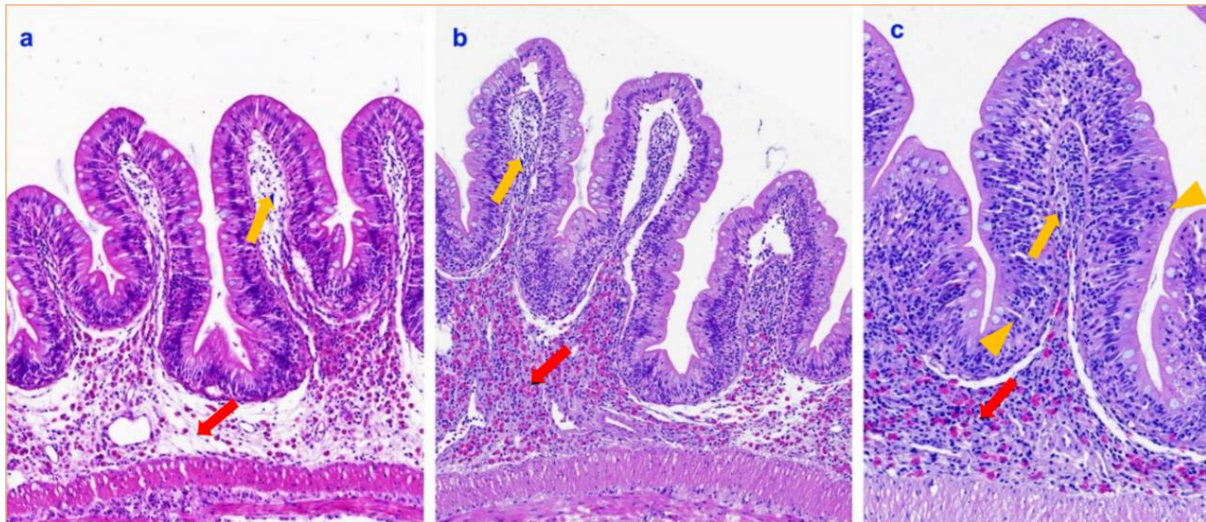
Kapasiteten av LAP og maltase i de ulike tarmavsnittene ble undersøkt (Figur 7). Aktivitet og kapasitet som ble målt samsvarer med de vi har funnet i tidligere studier (Krogdahl, Sæle et al. 2014). Spesifikk aktivitet av LAP (U/mg protein) og maltase var høyere i fisk fôret CEx sammenlignet med fisk fra de to andre forsøksgruppene. Resultatene for enzymenes kapasitet (U/kg fisk) viste ingen statistisk sikre forskjeller. Tarmen er et svært dynamisk organsystem som tilpasser seg endringer i sammensetningen av fôret for å optimalisere fordøyelsesprosessen. Våre resultater kan støtte hypotesen om at proteiner i den ekstruderte dietten (CEx), og også karbohydratfraksjonen var mindre tilgjengelige for fisken som kan ha respondert med å kompensere ved å produsere mer proteolytiske og maltose fordøyende enzymer.



Figur 7 Effekt av diett (Agg=agglomerert, CEx=kaldekstrudert, WEx=varmekstrudert) på aktiviteten av leucine aminopeptidase (LAP) og maltase (MALT) i de ulike tarmavsnittene (IN, avsnitt 1-4).

Histo-morfologiske observasjoner

Morfologiske endringer forbundet med betennelsesreaksjoner i tarmen var det som utmerket seg mest i den histologiske bedømmelsen i dette studiet. Endringene var tydeligst i IN-3 og IN-4, men noen få fisk hadde også milde til moderate betennelser i de fremre områdene av IN-1 og IN-2. Endringene som ble registrert var økt infiltrasjon av immunceller i submukosa (Figur 8) og lamina propria, og økt intraepitelal infiltrasjon av lymfocytt-lignende celler og eosinofile granulocytter (EGCs). Det ble ikke observert signifikante effekter av diett i tarmavsnittene IN-1, IN-2 og IN-4. Fiskegruppen som ble fôret CEx hadde signifikant færre individer med intraepitelial infiltrasjon av immunceller i IN-3 avsnittet, sammenlignet med fisk fôret Agg og WEx.



Figur 8 Representative bilder av morfologiske trekk ved histologiske bedømmelse av tarmavsnitt IN-3 i yngelforsøket (Forsøk 2). *Bilde a: normal morfologi, b: økt infiltrasjon av immunceller i submucosa (røde piler) og lamina propria (oransje piler, lymfocytter og EGCs). C: Markert infiltrasjon av EGCs og lymfocytt-lignende celler i epitellaget (oransje trekant).*

Genekspresjon

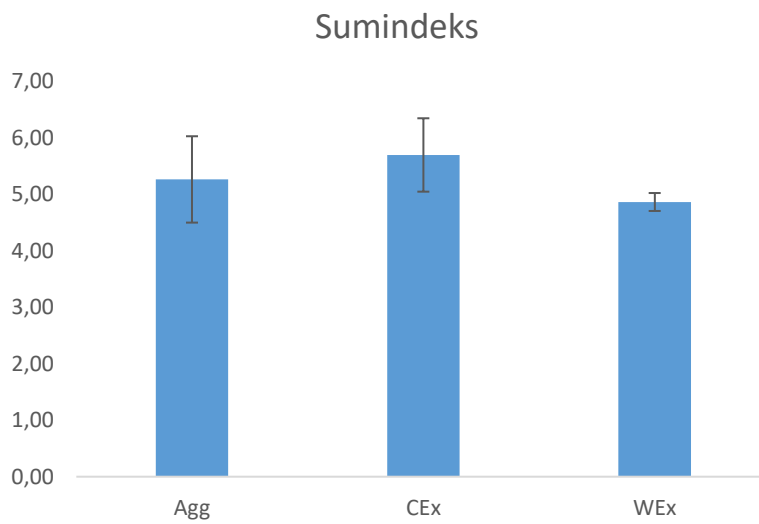
Generelt var det ingen tydelige forskjeller mellom forsøksgruppene når det gjelder uttrykksnivå for viktige immun- og fordøyelsesrelaterte gener i tarmen. For detaljerte resultater henvises det til <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114830>. Det eneste unntaket var økt genuttryknivå av lysozym (*lyz*) i IN4 for fisk føret den kaldekstruderte dietten (WEx), noe som sammenfaller med at denne gruppen hadde forhøyet dødelighet sammenlignet med de to andre forsøksgruppene. Lysozym er en sentral del av det medfødte immunforsvaret og har en viktig antimikrobiell funksjon. Generelt ser genekspresjonsanalysene ut til å samsvare med de andre tarmrelaterte analysene ved avslutning av forsøket, og indikerer få effekter av diett på generell helse og funksjonell status i tarmen. Uttrykksnivået av mange gener var svært forskjellige mellom fremre (IN1) og bakre (IN4) tarmavsnitt, noe som trolig reflekterer ulike funksjoner i de ulike tarmavsnittene. Gener relatert til fordøyelse, som vitamin C transportøren (*slc23a1*), fettsyretransportøren (*cd36*) og kolesterolsyntesegenene *sqle* og *cyp51a1* hadde høyere uttrykksnivå i IN1 enn i IN4. Disse observasjonene samsvarer med en studie av (Lie, Tørresen et al. 2018) som viste at fordøyelses-relaterte gener hadde høyere uttrykksnivå i det fremre tarmavsnittet med en gradvis reduksjon bakover tarmen. Tilsvarende rapporterte (Le, Shao et al. 2019) at det fremre tarmavsnittet står for henholdsvis 74 %, 86 % og 50 % av absorpsjonen av protein, karbohydrater og totalfett. Flere gener relatert til immunfunksjon og cellevekst og utvikling (*lyz*, *mmp13*, *pcna*) hadde derimot høyere uttrykksnivå i det bakre tarmavsnittet (IN4). Det høye uttrykksnivået av vannkanalen aquaporin 8 (*aqp8*) i IN4 samsvarer med observasjoner gjort av Le et al. (2019), og skyldes trolig at dette tarmavsnittet spiller en viktig rolle både for absorpsjon av vann og for ekskresjon av ammonium.

Velferdsskår

Ved registrering av velferdsskår var det i hovedsak slitasje på brystfinner som var tydelig (Tabell 7). Sumindeks er vist i figur 9. Det var ingen signifikante forskjeller i velferdsskår mellom de tre gruppene.

Tabell 7 Ytre velferdsskår finner.

	Agg	CEx	WEx	p-verdi
Ryggfinne	0,93 ± 0,33	0,97 ± 0,17	0,83 ± 0,12	0,91
Halefinne	1,47 ± 0,11	1,58 ± 0,16	1,53 ± 0,04	0,78
Brystfinner	2,33 ± 0,37	2,75 ± 0,33	2,08 ± 0,29	0,41
Gattfinne	0,53 ± 0,13	0,40 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,57



Figur 9 Sumindeks for velferdsskåring av berggyllt gitt for med ulik produksjonsteknologi.

4.2 Fett i fôr til berggylt, totalfett, nivå og type fosfolipid

I et tidligere FHF-prosjekt, LeppeProd, ble det gjort (Hamre, Nordgreen et al. 2013) en screening med ulik balanse mellom fett, protein og karbohydrat til liten berggylt (1-5 g) (Hamre, Nordgreen et al. 2013). På dette stadiet hadde fisken best tilvekst når fôret inneholdt ca. 65 % protein, 12 % lipid og 16 % karbohydrat. I LeppeProd ble det også vist at veksthastigheten økte når mer enn 45 % av fettene i fôret var polart. I forsøket ble fosfolipidnivået i fôrene balansert ved bruk av økende nivå soyalectin. Optimal balanse kan imidlertid variere med ulike kvaliteter av protein- og lipidkilder (nøytrale eller polare og marine versus vegetabilsk), og behovet for ulike næringsstoffer endres etter all sannsynlighet også med fiskestørrelse og vanntemperatur.

4.2.1 Materiale og metoder

Forsøksdesign og fôr

I dette forsøket bygget vi videre på resultater fra LeppeProd, og planla et forsøk der vi undersøkte to nivåer av totalfett, to nivåer av polart fett (fosfolipider, PL) og to type fosfolipider (marint *versus* vegetabilsk). Forsøket ble designet som et faktorielt forsøk, med 2 gjentak for hver behandling (2 fettnivå x 2 PL-nivå x 2 PL-type x 2 gjentak), totalt 16 kar. Sammensetning av forsøksfôr er vist i Tabell 8, og analysert innhold i Tabell 9.

Tabell 8 Formulering av forsøksfôr.

	Diett1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8
PL-type	Vegetabilsk				Marint			
Lipidnivå i fôr (%)	12		20		12		20	
PL-nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50
Rekemel	28	28	28	28	28	28	28	28
Torskemuskel	32,24	32,24	22,73	22,73	32,15	32,18	22,77	22,73
Krill hydrolysat	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Hvetegluten	11	11	11	11	11	11	11	11
Tapioka	9,4	9,4	10,5	10,5	9,5	9,5	10,5	10,5
Krillolje	0	0	0	0	1,4	4,75	3,73	9,35
Rapsolje	3,97	0,81	10,09	4,83	3,73	0	9,45	1,98
Epax olje	2,09	2,09	2,18	2,18	1,59	0,36	0,82	0
Rapslesitin (tørr)	1,34	4,5	3,54	8,8	0,67	2,25	1,77	4,38
Biomas	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Kolesterol	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Kolinklorid	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tau+Lys	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
Vitaminer	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73
Mineraler	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MAP	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Yttrium	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sum	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabell 9 Fôrsammensetning (analysert).

		Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8
PL-type		Vegetabilsk				Marint			
Lipidnivå i fôr (%)	beregnet	12		20		12		20	
PL-nivå % av lipid	beregnet	25	50	25	50	25	50	25	5
Protein (N*6,25)	%	60,2	59,9	51,2	52,7	59,5	61,7	54	50,2
Lipid (Bligh & Dyer)	%	13	12,6	20,6	20,2	13,8			
Vann	%	8,1	9,8	10,1	8,5	8,4	7	6,2	12,3
Fosfor (total)	%	1,4	1,4	1,2	1,3	0,98	1,5	1,2	1,4
Fosfor (løselig)	%	0,66	0,69	0,6	0,82	0,73	0,83	0,62	0,77
Triacylglycerol	g/100g ekstrahert fett	73	46	78	56	66	38	70	38
Diasylglyserol	"	<0,5	0,5	<0,5	<0,5	0,5	1	<0,5	0,8
Monoacylglycerol	"	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Frie fettsyrer	"	2,3	2,2	1,1	1,1	3,3	7,7	2,6	4,8
Kolesterol	"	3,5	3,6	2	2,1	3	4,4	2,5	2,7
Kolesterol estere	"	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Fosfatidyletanolamin*	"	4	6,4	5,3	8,9	3,9	7,1	4	6,5
Fosfatidylinositol**	"	2,8	6,3	3,1	6,9	2,3	3,7	2,2	3,9
Fosfatidylserin**	"	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fosfatidylcholin**	"	13,6	21,1	10,6	17,5	15,4	25,2	15,2	24,9
Lyso-fosfatidylcholin**	"	1,8	2,8	1,3	2,1	2,3	3,7	2,0	4,2
Fosfatidinsyre**	"	0,8	1,7	0,8	1,7	0,7	1,0	0,5	1,0
Andre fosfolipider**	"	6,0	10,0	5,4	10,0	5,6	8,7	5,1	7,8
Sum polare lipider	"	29	48	27	47	30	49	29	48
Sum nøytrale lipider	"	79	52	81	59	73	51	75	46
Sum lipider	"	108	101	108	106	103	101	104	95
14:0	"	0,9	0,9	0,5	0,5	1,5	3,3	1,9	3,6
16:0	"	6,7	7,2	5,8	6,2	7,8	11,4	8,2	11,2
16:1 n-7	"	2,4	2,6	1,7	1,7	2,8	4,2	2,6	3,7
16:2 n-4	"	0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
16:3 n-4	"	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1
18:0	"	1,3	1,1	1,4	1,1	1,3	1,1	1,4	1,1
18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	"	26,6	20,6	38,6	31	26,6	16,2	35,5	21,6
18:2 n-6	"	9,9	9,7	13,5	12,8	9,6	6,9	11,9	7,8
18:3 n-3	"	2,9	1,8	4,6	3,2	2,8	1,1	4,2	1,9
18:3 n-6	"	0,1	0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
18:4 n-3	"	0,6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,8	0,5	7
20:0	"	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
20:1 (n-9)+(n-7)	"	2	1,5	1,3	1,1	1,7	1,7	1,3	1,3
20:2 n-6	"	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
20:3 n-3	"	0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0	0	0
20:3 n-6	"	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:4 n-3	"	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3
20:4 n-6	"	1	1	0,7	0,7	0,9	0,8	0,5	0,4

20:5 n-3 (EPA)	"	10,9	11,6	7,7	8	10,5	10,2	6,9	7,7
21:5 n-3	"	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
22:0	"	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1
22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	"	1	0,8	0,5	0,5	0,7	0,7	0,5	0,6
22:4 n-6	"	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0	0	0
22:5 n-3	"	0,5	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3
22:6 n-3 (DHA)	"	4,8	5	2,9	3,1	4,9	6,4	3,7	4,6
24:1 n-9	"	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sum SFA	"	9,1	9,4	8	8	10,9	15,9	11,8	16,1
Sum MUFA	"	32,1	25,6	42,2	34,4	31,9	22,9	40	27,3
Sum PUFA (n-6) fettsyrer	"	11,2	11	14,4	13,7	10,9	8	12,7	8,5
Sum PUFA (n-3) fettsyrer	"	20,5	20,3	16,4	15,5	19,8	19,5	16	15,7
Sum PUFA fettsyrer	"	31,8	31,4	30,8	29,2	30,8	27,8	28,9	24,5
omega-6/omega-3		0,55	0,54	0,88	0,88	0,54	0,41	0,79	0,54
Sum EPA + DHA	"	15,7	16,6	10,6	11,1	15,4	16,6	10,6	12,3
Sum identifiserte fettsyrer	"	73	66,4	81	71,6	73,6	66,6	80,7	67,9
Sum uidentifiserte fettsyrer	"	3,2	3,7	2,3	2,6	3,4	4,5	2,8	3,3
Anisidin i B&D ekstrakt		25	28	14	30	22	25	26	16
Peroxid i BI&D eks.	meq peroksid/kg olje	57	48	21	17	43	17	11	12

**Biolab; **Spectral service. Resultatene fra begge labbene er kombinert og 'andrePL' fraksjonen hos Spectral kan delvis overlappet med fosfatidyletanolamin som var identifisert hos Biolab men ikke hos Spectral. Dette kan delvis forklare at total identifiserte fettsyrer er i de fleste prøvene over 100%.*

Fiskeforsøk

Berggylt til forsøket ble produsert av Havlandet Marin Yngel (HMY) i Florø. Fisken ble transportert til Sunndalsøra med tankbil og fordelt i forsøkskar ved ankomst til stasjonen. Fisken fortsatte på samme kommersielle fôr (Otohime C2) som før transport. Etter 5 uker ble antall fisk standardisert til 75 fisk per kar, og 1 uke senere ble forsøksfôrene introdusert. Gjennomsnittsvekten av fisken ved forsøksstart var 16,3 gram. Totalt ble det satt ut fisk i 16 kar. Forsøksenhetene var 150 liters grå kar, runde (d=50cm) med konisk bunn, karene var dekket med et gjennomsiktig lokk med åpning for fôring. Alle kar hadde belteautomater for utfôring, og et separat lyspunkt (konstant lys 24 timer) plassert på lokket over hvert kar. Vannet var filtrert til 10 µm og UV-behandlet. Gjennomsnittlig vanntemperatur gjennom forsøket var 15,2 °C (14,7-15,6 °C), vanngjennomstrømmingen 4 L/minutt, og oksygenmetning ble holdt på 80-100 %.

Forsøket ble avsluttet etter 114 dager. Fisken var fôret fram til prøvetaking. Vekt og lengde ble målt for alle individer i alle kar. Det ble tatt blodprøver, innvoller og lever ble dissekert ut og veid, og det ble frosset prøver av lever, muskel og ulike tarmavsnitt på flytende nitrogen, 6 fisk per kar. Prøver av tarmavsnitt fra de samme 6 fiskene ble fiksert på formalin for histologiske undersøkelser. På dag 2 ble det tatt nye prøver av tarmavsnitt, men da fra fisk som var sultet i ett døgn, 6 fisker per kar. Lengde og vekt ble målt for alle restfisk, og det ble tatt velferdsscore på 30 fisk per kar. 20 fisk per kar ble røntgenfotografert.

Analyser og beregninger

Data fra velferdsskåring ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere gjennomsnittsverdiene til en sumindeks per kar. Sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer pr kar.

Lever og muskel ble analysert for fettsyrer i nøytralt og polart fett. Serumprøver ble analysert for triglyserider, fosfolipider, kolesterol og glukose (Pentra C400, fosfolipider: kit fra DiaSys).

Røntgen

Ved oppstart av forsøket ble det tatt ut og avlivet 80 fisk for røntgenundersøkelse (startuttak). Ved avslutning ble det tatt ut 43-46 pr. fôr, 21-24 fisk pr. kar for røntgenanalyse. Fisken ble frosset inn og røntgenfotografert frossen. Bildene ble evaluert ved sammenlikning av beinstrukturene mellom fisk, og med røntgenbilder av vill berggylt fra arkiv.

Statistikk

Data fra forsøket ble analysert med en faktoriell variansanalyse, for å undersøke effekt av fettnivå, fosfolipidnivå, og fosfolipidtype, og alle samspill mellom disse faktorene. Det var ikke signifikant effekt av alle samspill, og derfor ble modellen forenklet og inkluderte bare hovedeffekter og relevante samspillseffekter, i de fleste tilfeller samspillet mellom fettnivå og PL-type.

Histomorfologi

Seksjoner av tarmkanalen fra 80 individer (10 per fôrgruppe) fra avslutningen av forsøket ble preparert og farget med H&E. Tarmen fra hvert individ ble inndelt og merket som IN1 (fremre avsnitt) IN2, IN3 og IN4 (bakerste avsnitt) (Figur 10). Tarmseksjonene ble evaluert ved bruk av lysmikroskopi. I evalueringen ble det lagt vekt på morfologiske endringer assosiert med betennelsesreaksjoner i tarmen og hypervakuolisering (steatose) i enterocytene. Endringer i tarmmorfologi ble gradert etter et skåringssystem med en skala fra 0-4 hvor 0 er normal; 1, milde endringer; 2, moderate endringer, 3; markerte endringer, og 4. alvorlige endringer. Forskjeller i histologiscore mellom fôrgrupper ble evaluert for statistisk signifikans ved logistisk regresjonsanalyse i R (versjon 3.6.2; 2019) og RStudio interphase (versjon 1.2.5; 2019).

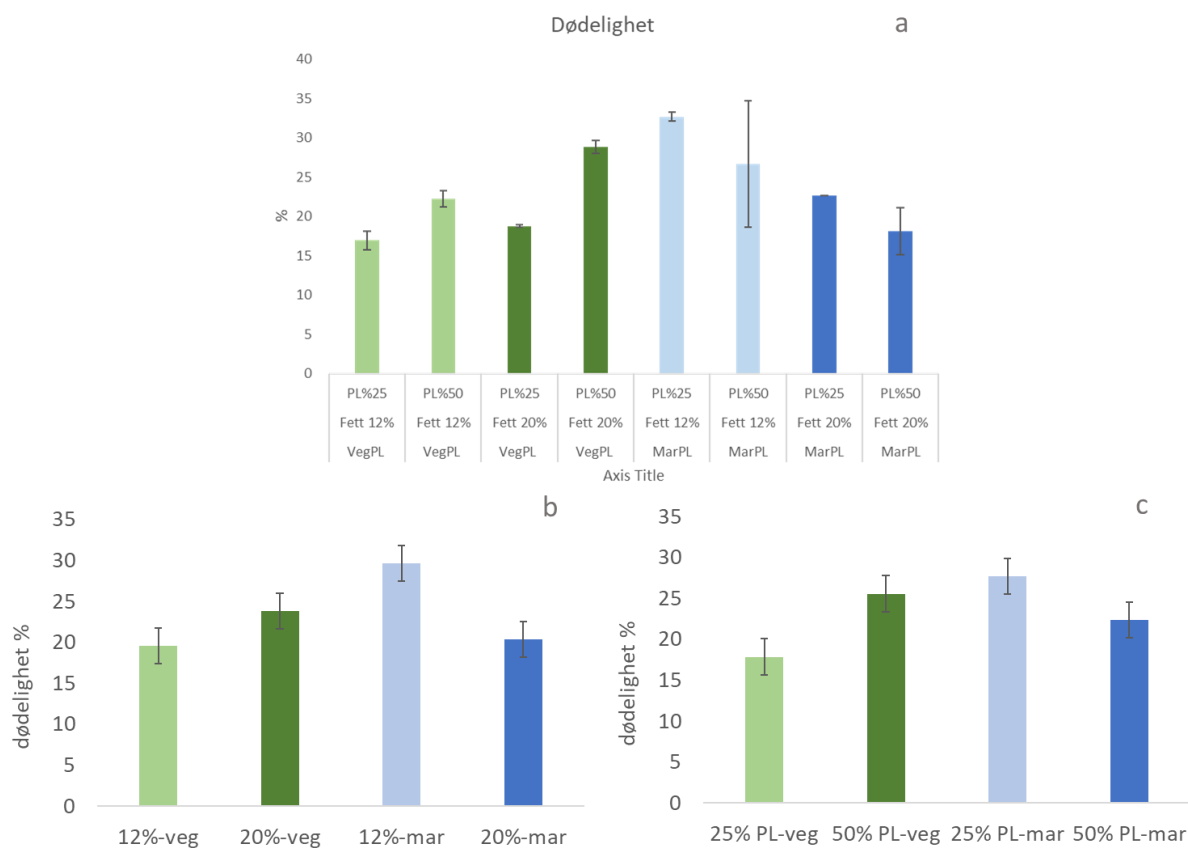


Figur 10 Inndeling og seksjonering av tarmen fra proksimal (venstre) til distal (høyre) del i fire avsnitt, merket IN1-IN4. Resultat og vurdering.

4.2.2 Resultater

4.2.2.1 Overlevelse

Det var ingen signifikant forskjell i dødelighet mellom forsøksgruppene, dødelighet i løpet av forsøksperioden var i gjennomsnitt 23,4 % (Figur 11a). Det var imidlertid signifikant effekt av interaksjon mellom fett-nivå og PL-type ($p=0,015$; Figur 11b) og PL-nivå og PL-type ($p=0,018$; Figur 11c) på dødelighet. Det var høyere dødelighet hos fisk føret med lavt fettnivå med marint PL sammenlignet med lavt fettnivå med vegetabilsk PL, og omvendt resultat ved høyt fettnivå i føret. Samtidig var høyt nivå av fosfolipider positivt for overlevelsen når det var brukt marine fosfolipider, men ikke med ekstra fosfolipider av vegetabilsk opprinnelse. Disse resultatene er delvis vanskelige å forklare fordi karvariasjonen var stor i MarPL50Fet12 behandlingen, og dermed er det vanskelig å komme med en sterk anbefaling angående overlevelse. Det er tilsynelatende fordelaktig å bruke lavere nivå av plantebaserte fosfolipider i fôr til liten berggylt.



Figur 11 Dødelighet i a) alle grupper, b) grupper gitt fôr med lavt og høyt nivå fett av marin eller vegetabilsk opprinnelse og c) grupper gitt fôr med lavt og høyt nivå fosfolipider av marin eller vegetabilsk opprinnelse (b).

4.2.2.2 Vekst og biometri

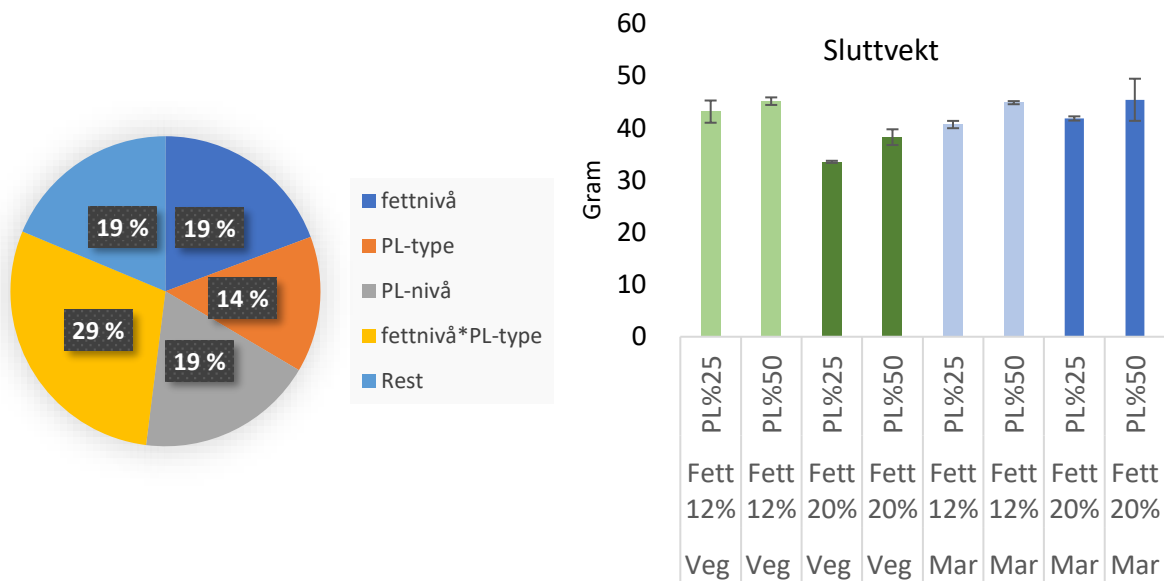
Tabell 10 viser sluttvekter, tilvekst, k-faktor og leverindeks. Den tydeligste effekten var på sluttvekt, tilvekst og kondisjonsfaktor. Med høyt nivå av fett i fôr og lav andel fosfolipid, vokste fisken saktere enn med andre fôr når fosfolipidet var av vegetabilsk opprinnelse. Figur 12 viser sluttvekt i de ulike gruppene, og andel (%) av variasjon knyttet til ulike faktor i modellen. Figur 13 viser TGC i de ulike

gruppene, og andel (%) av variasjon knyttet til hver faktor i modellen. Resultatene viste at å øke andelen PL i totalfett er gunstig for vekst, uansett fettnivå og PL-kilde. Hvis man ønsker å bruke høyt nivå av fett i fôr til berggytt, bør det brukes marine fosfolipider (PL). I dette forsøket hadde PL-kilden ingen betydning for vekst ved lavt innhold av fett i fôr (Figur 12 og 13).

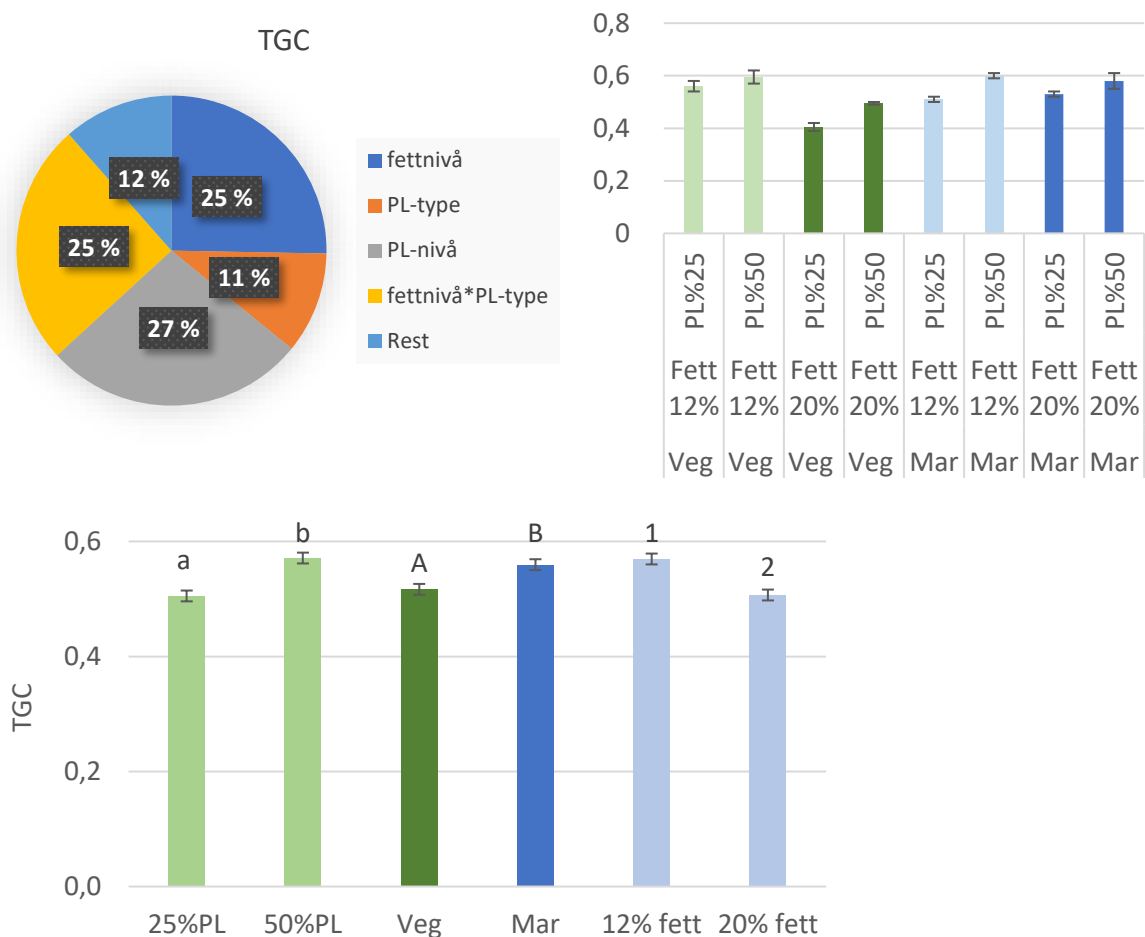
Vekstraten (TGC, Figur 13 og 14) var høyere hos gruppene gitt fôr med 12 % fett sammenlignet med 20 % fett ($p=0.002$) når vegetabilsk fosfolipid ble brukt. Marine fosfolipider i dietten ga høyere vekstrate (TGC) enn gruppene gitt fôr der fosfolipidkilden var vegetabilsk (rapslecitin) ($p=0.012$). Andel PL av total fettmengde fett i fôr var like viktig som fettmengde (nivå), de to faktorene sto hver for 19 % av variasjonen i sluttvekt, mens samspillet mellom PL-type og fettnivå forklarte 29 % av totalvariasjonen i sluttvekt. Dette betyr i praksis at dersom man ønsker høyere fett- eller PL-nivå i fôret, bør det være i form av marine PL.

Tabell 10 A) Dødelighet, vekst og kondisjon B) tilhørende statistikk.

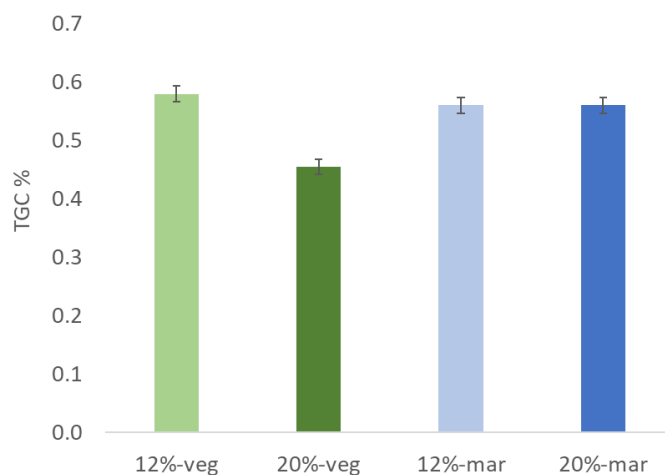
	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8
Lipidnivå i fôr (%)	12	12	20	20	12	12	20	20
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar
PL nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50
A)								
Dødelighet %	17,0 ± 1,2	22,3 ± 1,1	18,8 ± 0,15	28,9 ± 0,9	32,7 ± 0,6	26,7 ± 8,1	22,7 ± 0,0	18,1 ± 3,0
Vekt, g	43,2 ± 2,1	45,2 ± 0,7	33,5 ± 0,2	38,3 ± 1,5	40,7 ± 0,7	44,9 ± 0,3	41,9 ± 0,4	45,5 ± 4,0
Lengde, cm	13,1 ± 0,1	13,2 ± 0,1	12,3 ± 0,1	12,6 ± 0,1	12,8 ± 0,03	13,2 ± 0,1	13,0 ± 0,1	13,2 ± 0,4
SGR	0,86 ± 0,02	0,91 ± 0,05	0,66 ± 0,03	0,78 ± 0,00	0,80 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,82 ± 0,02	0,89 ± 0,03
TGC	0,56 ± 0,02	0,60 ± 0,03	0,41 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,58 ± 0,03
K-faktor alle	1,83 ± 0,03	1,87 ± 0,02	1,74 ± 0,00	1,79 ± 0,02	1,80 ± 0,02	1,84 ± 0,01	1,82 ± 0,02	1,85 ± 0,03
K-faktor prøve	1,94 ± 0,00	1,93 ± 0,06	1,81 ± 0,01	1,90 ± 0,02	2,00 ± 0,01	1,99 ± 0,08	1,95 ± 0,07	2,04 ± 0,03
HSI	1,19 ± 0,10	1,16 ± 0,01	1,24 ± 0,07	1,23 ± 0,02	1,32 ± 0,07	1,28 ± 0,03	1,38 ± 0,07	1,23 ± 0,00
B)								
	modell	Prosent av totalvariasjon forklart av:						
	p-verdi	R ²	Fett-nivå	PL-type	PL-nivå	Fett-nivå* PL-type		
Dødelighet %	0,15	0,43	4,3	7,5	0,9	30,2		
Vekt, g	0,0005	0,81	19,3	14,2	18,5	29,3		
Lengde, cm	0,001	0,79	19,4	11,6	16,1	32,3		
SGR	<0,0001	0,88	25,5	10,7	30,2	21,2		
TGC	<0,0001	0,89	25,3	10,6	27,3	25,3		
K-faktor alle	0,002	0,77	17,1	5,6	22,6	31,8		
K-faktor prøve	0,03	0,59	6,7	40,1	6,7	5,9		
HSI	0,10	0,48	4,1	30,4	11,1	2,1		



Figur 12 Sluttvekt ulike grupper, og % andel av variasjon per faktor.

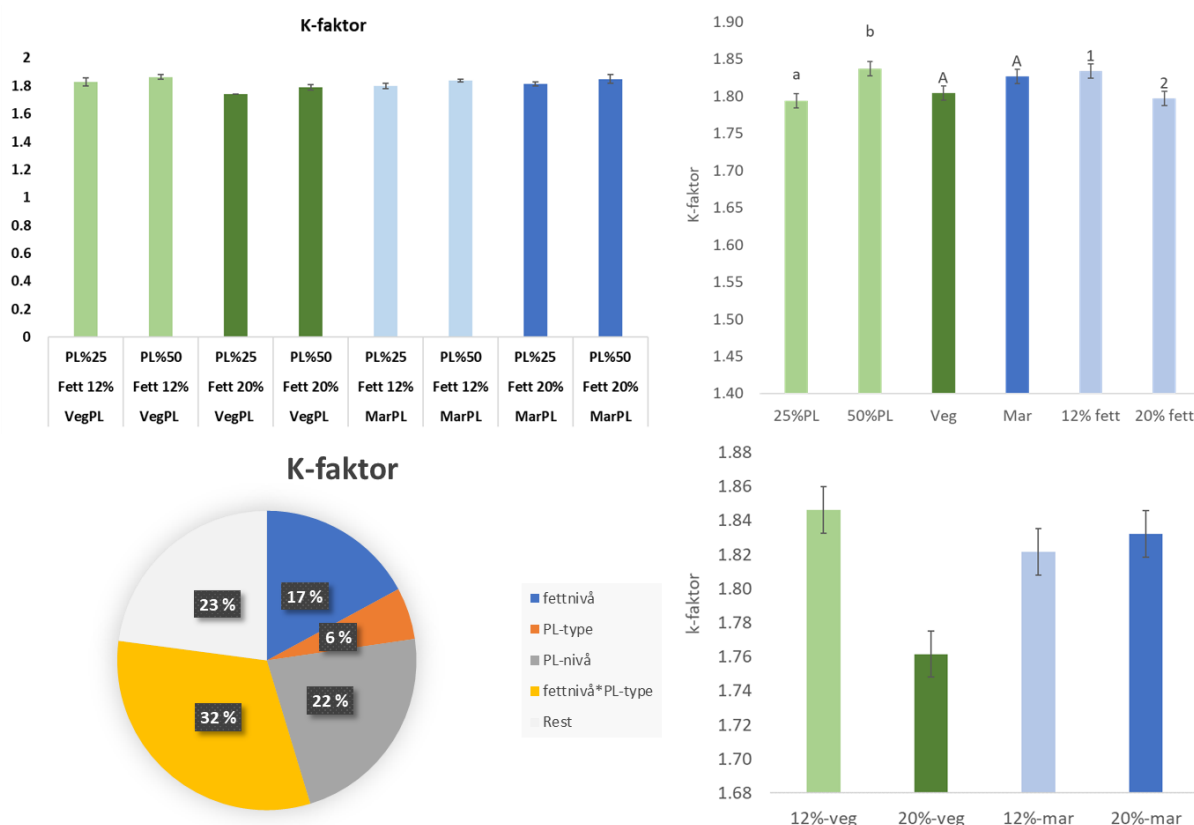


Figur 13 TGC, bidrag fra hver faktor, snitt for hver diettgruppe, og Parvis TGC verdier med ulike små bokstaver, store bokstaver eller tall er signifikant forskjellige.

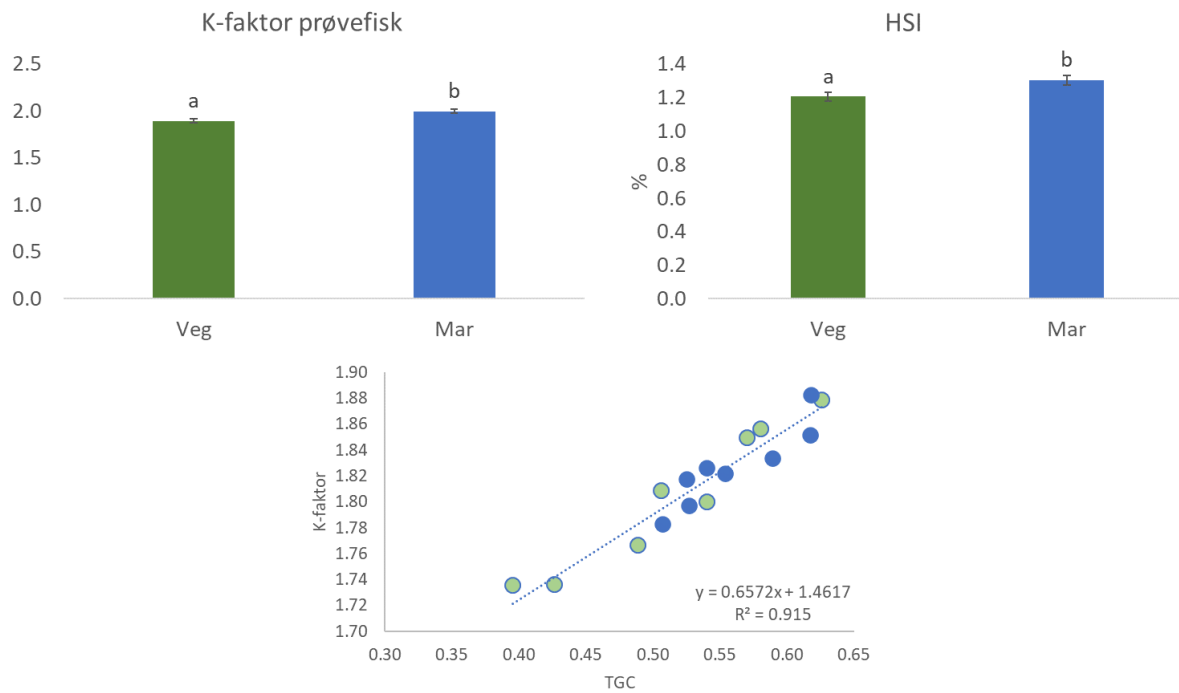


Figur 14 Effekter av fôrets fettnivå og kilde for vekstraten (TGC) til berggyllt.

K-faktoren hos berggyllt var signifikant påvirket av fettnivå ($p=0.026$), PL-nivå ($p=0.014$) og samspill ($p=0.008$) mellom de to faktorene. PL-kilden hadde ingen effekt på K-faktoren målt på alle fisk, mens prøvefisk (som bl.a. ble brukt for å beregne leverindeks HSI) i marPL gruppen hadde høyere K-faktor ($p=0.01$) og HSI ($p=0.044$) enn prøvefisk i vegPL gruppen. Det var ikke andre faktorer enn PL-type som hadde signifikant effekt på K-faktor og HSI hos prøvefisk (Figur 15 og 16).



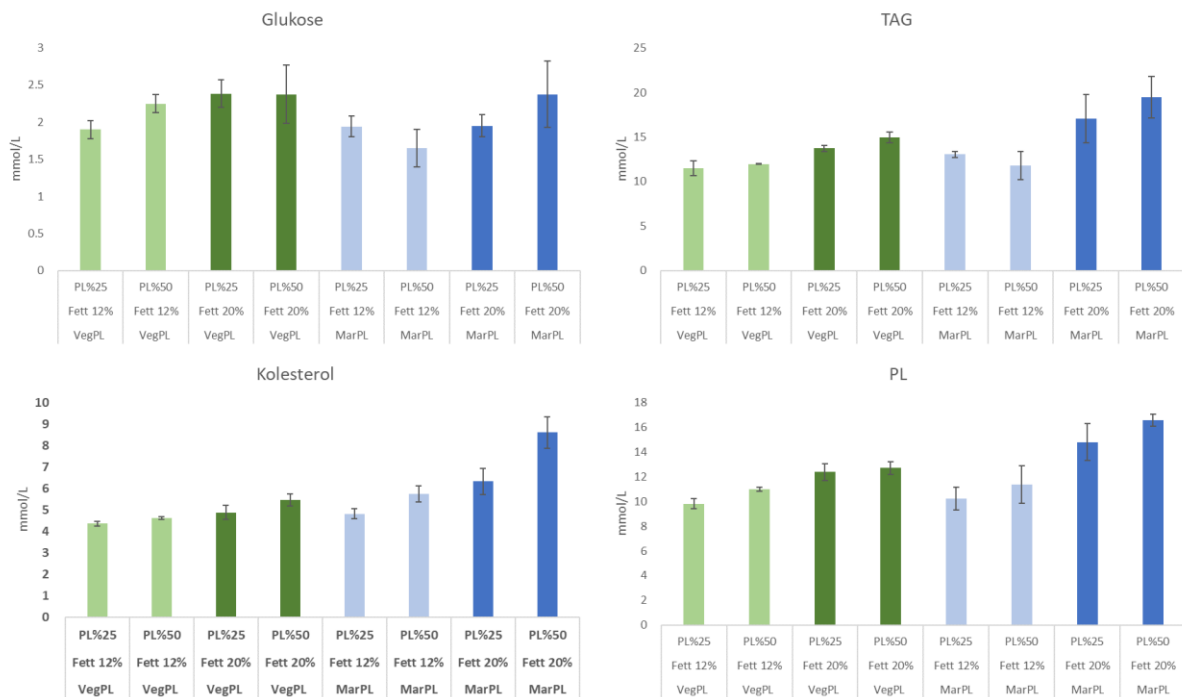
Figur 15 K-faktor i alle behandlinger (opp til vestre); hovedfaktoreffekter: parvis K-faktor verdier med ulike små bokstaver, store bokstaver eller tall er statistisksignifikant forskjellige (opp til høyre), andel av variasjon i K-faktor knyttet til hver faktor (opp til venstre); og samspill av hovedfaktoreffekter fett nivå og PL-kilde på K-faktor (ned til høyre).



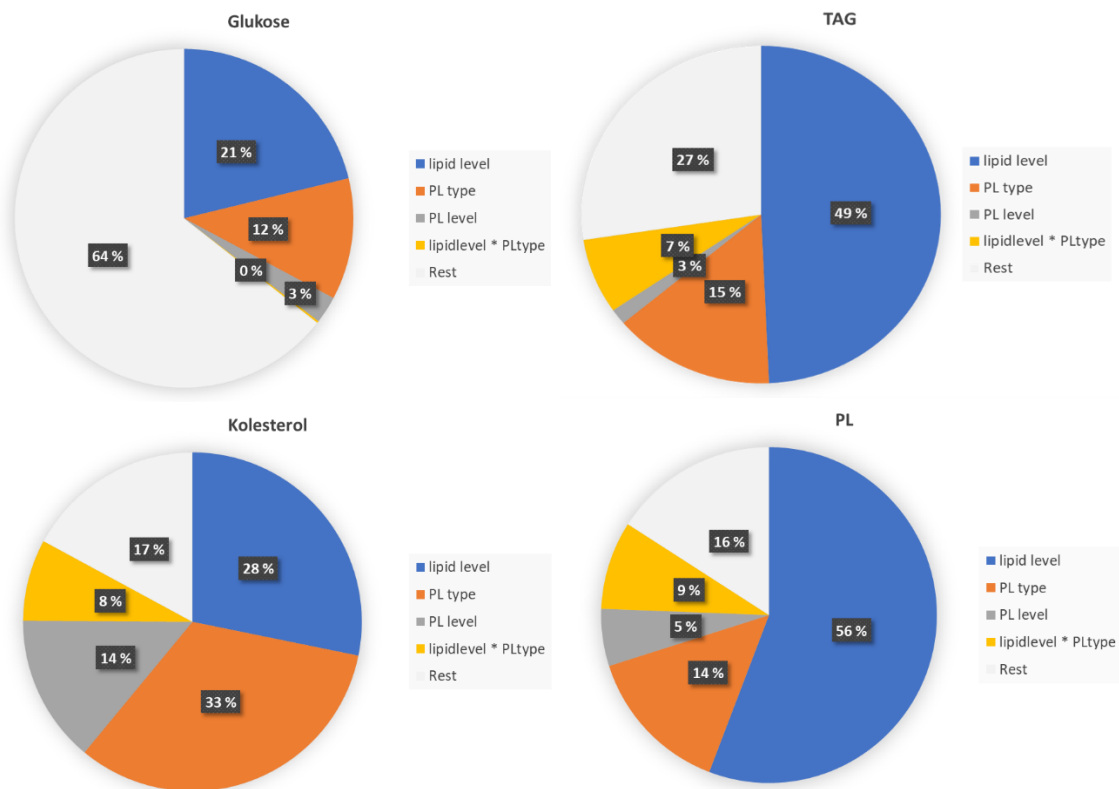
Figur 12 K-faktor (opp til vestre), leverindeks (HSI) (opp til høyre) hos prøvefisk fôret enten marine (blå eller plantebaserte fosfolipider, og korrelasjon mellom K-faktor (alle fisk) og vekstrate (TGC; allfisk) med blå markør for fisk fôret med marine versus grønn markør for plantebaserte fosfolipider.

4.2.3 Energimetabolisme og fettransport

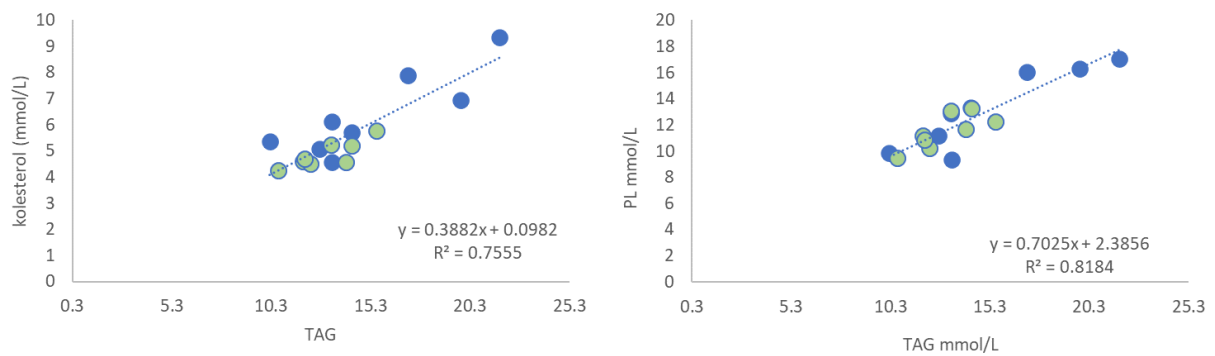
Tabell 11 og Figur 17 og 18 viser serumverdier av glukose, TAG, kolesterol og PL. Modellen for serumglukose var ikke signifikant, men det er indikasjon på at den kan påvirkes av fettnivå i fôr ($p=0,098$). Både TAG ($p=0,003$) og PL ($p=0,001$) i serum er mest påvirket av totalt fettnivå i fôr (ca. 50 % av variasjonen), mens PL-type forklarte 14-15 % av variasjonen (henholdsvis $p=0,053$ og $p=0,024$ for TAG og PL). Det var også tendens for større økning i serum PL i gruppene gitt diett med høyere fettnivå ved bruk av marine enn plantefosfolipider ($p=0,065$). For kolesterol er bildet litt annerledes. Der forklarte samspill mellom PL-type og fettnivå 33 % av variasjonen mens totalt fettnivå forklarte 28 % ($p=0,030$), samtidig som det ble funnet signifikante effekter av fettnivå ($p=0,001$), PL-type ($p=0,001$) og PL-nivå ($p=0,008$). Det var som forventet gode korrelasjoner mellom serum kolesterol, fosfolipider (PL) og triglyserider (TAG) (Figur 19). Oppsummert, kan berggyllt utnytte fett i dietten bedre med høyere nivåer PL i fôret, spesielt av marin opprinnelse. Ved bruk av høyere nivå fett i fôret ser det ut som at det transporteres marginalt mer fett i blodet ved bruk av plantefosfolipider, og mer effektivt ved bruk av marine plantefosfolipider.



Figur 13 Serum glukose (opp til venstre), triglyserider (TAG; opp til høyre), kolesterol (ned til venstre) og fosfolipider (PL; ned til høyre) i alle grupper.



Figur 14 Andel av variasjon i serum glukose (opp til venstre), triglyserider (TAG; opp til høyre), kolesterol (ned til venstre) og fosfolipider (PL; ned til høyre) knyttet til hver testfaktor.



Figur 15 Korrelasjoner mellom serum kolesterol (venstre) og fosfolipider (PL; høyre) og serum triglyserider (TAG).

Tabell 11 A) Serumanalyser B) tilhørende statistikk.

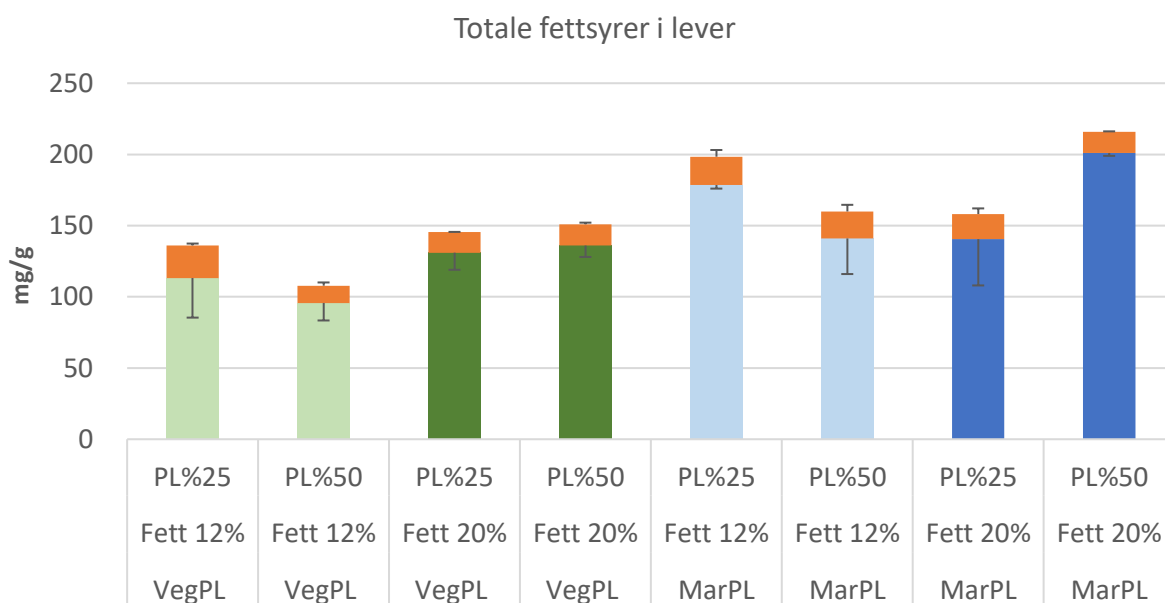
A)	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8
Lipidnivå i før (%)	12	12	20	20	12	12	20	20
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar
PL nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50
Glukose	1,90 ± 0,12	2,25 ± 0,12	2,39 ± 0,19	2,38 ± 0,40	1,94 ± 0,14	1,65 ± 0,25	1,95 ± 0,15	2,38 ± 0,45
Triglyserider	11,48 ± 0,81	11,97 ± 0,04	13,72 ± 0,38	14,99 ± 0,61	13,04 ± 0,32	11,79 ± 1,56	17,07 ± 2,74	19,49 ± 2,32
Kolesterol	4,36 ± 0,12	4,63 ± 0,06	4,89 ± 0,33	5,47 ± 0,29	4,83 ± 0,25	5,75 ± 0,38	6,33 ± 0,61	8,62 ± 0,74
Fosfolipider	9,82 ± 0,38	10,98 ± 0,17	12,37 ± 0,69	12,71 ± 0,51	10,25 ± 0,92	11,37 ± 1,53	14,80 ± 1,49	16,57 ± 0,50
B)								
	modell	% av total variasjon forklart av						
	p-verdi	R-square	fett nivå	PL type	PL nivå	fett nivå * PL-type		
Glukose	0,26	0,36	21,2	11,6	2,6	0,18		
Triglyserider	0,004	0,72	49,3	14,6	1,5	7,2		
Kolesterol	0,0003	0,83	28,2	32,8	14,1	7,8		
Fosfolipider	0,0002	0,84	55,8	14,3	5,5	8,5		

4.2.4 Fettsyredistribusjon i lever og muskel

Total mengde fettsyrer og fettsyreprofil i polare og nøytrale lipider, i både lever og muskel, ble i varierende grad påvirket av forsøksfôr. Detaljerte data fra fettsyreanalyser er gitt i tabeller (Vedlegg 1, Tabell A -D).

Figur 20 viser total mengde fettsyrer (mg/g) i lever fra fisk fra alle forsøksgrupper. Den oransje delen øverst på hver stolpe er mengde fettsyrer i polare lipider, som ikke er særlig påvirket av behandling. Resten (blå og grønne deler av stolpene) er mengde fettsyrer i nøytrale lipider, som er høyere ved bruk av marine fosfolipider sammenlignet med vegetabiliske. Med lavt fettnivå i fôr så det ut til at økt andel fosfolipider ga redusert mengde fett i lever, men variasjonen var stor i noen grupper, spesielt for fettsyrer i nøytrale lipider.

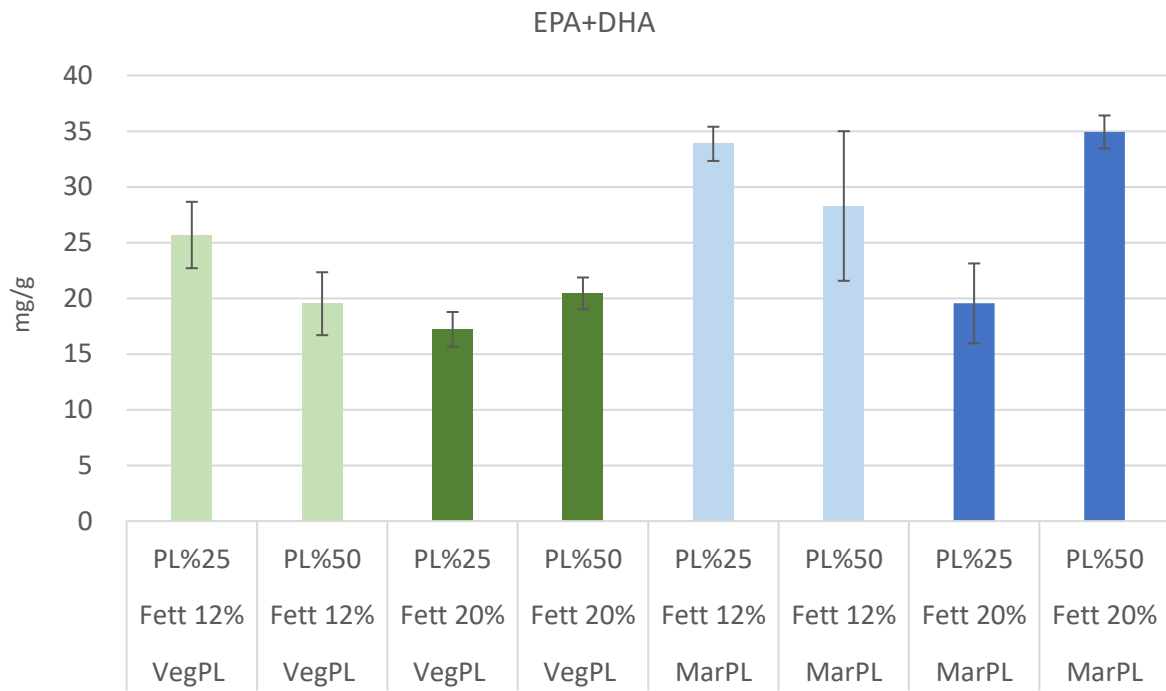
Tabell 12a viser total mengde fettsyrer i lever (mg/g), og relativ mengde (% av alle fettsyrer) av noen fettsyrer i både nøytrale og polare lipider, tabell 12b viser statistiske parametere. Fosfolipidtype (marint eller vegetabilisk) var den faktoren som forklarte mest av variasjonen i total mengde fettsyrer i lever. Relativ fordeling (% av alle fettsyrer) var mest påvirket av fettnivå i fôr.



Figur 20 Total mengde fettsyrer i PL (oransje farge) og NL i lever til berggyllt fôret dietter med ulikt nivå fett og fosfolipider av marin eller vegetabilisk opprinnelse.

Ved bruk av lavfett dietter ble det akkumulert relativt mer EPA og DHA i både nøytral- og polarlipidfraksjonen i lever til berggyllt. Fosfolipidtype og -nivå var mindre viktig. Alle diettene var balansert for EPA+DHA, unntatt 20 % Mar50 som hadde høyere innhold enn de andre.

Figur 21 viser total mengde EPD + DHA (mg/g) i lever. Absolutt mengde var mest påvirket av type fosfolipid, og var høyere med marint enn med vegetabilisk fosfolipid i fôr.



Figur 21 Total mengde EPA+DHA (mg/g) i lever.

Tabell 12a Fettsyrer i lever.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8	
Fettnivå	12	12	20	20	12	12	20	20	
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar	pooled
PL nivå	25	50	25	50	25	50	25	50	s.e.m.
Totale fettsyrer, mg/g									
Sum i NL	113,20	95,70	131,00	136,00	178,50	141,00	140,50	201,00	22,38
Sum i PL	22,85	12,14	14,50	14,90	19,90	18,95	17,60	14,85	3,10
SUM fettsyrer	136,05	107,84	145,50	150,90	198,40	159,95	158,10	215,85	23,48
SUM EPA+DHA	25,68	19,515	17,21	20,44	33,865	28,285	19,545	34,935	4,63
% av fettsyrer i NL									
EPA	10,05	12,10	7,60	8,65	10,10	9,20	6,70	9,65	0,67
DPA	0,85	1,05	0,45	0,60	0,85	0,80	0,45	0,70	0,07
DHA	3,60	4,60	1,75	2,50	3,80	4,85	2,70	4,70	0,30
SFA	17,90	18,70	10,35	12,85	18,00	25,25	14,70	21,05	1,27
MUFA	46,55	41,55	50,65	47,50	46,40	43,85	50,25	43,35	0,92
EPA+DHA	13,60	16,70	9,40	11,15	13,95	14,05	9,40	14,30	0,89
Sum n-3	19,30	21,90	16,45	17,15	19,60	17,95	15,70	19,15	1,04
Sum n-6	13,65	14,75	20,30	19,95	13,05	9,10	16,95	12,50	1,09
PUFA	33,30	36,95	37,00	37,30	33,00	27,45	32,85	32,05	1,72
n-3/n-6	1,40	1,45	0,80	0,85	1,50	2,00	0,95	1,50	0,11
% av fettsyrer i PL									
EPA	24,35	20,60	14,70	17,10	24,30	23,85	18,45	20,20	1,75
DPA	1,20	1,35	1,25	1,20	1,15	0,95	1,00	1,00	0,11
DHA	20,75	20,80	18,80	17,95	20,10	20,20	19,10	21,75	0,75
SFA	21,30	24,20	18,85	19,35	22,10	26,30	20,55	24,80	0,88
MUFA	16,30	16,95	25,20	23,30	16,60	15,00	21,35	16,80	1,05
EPA+DHA	45,05	41,45	33,50	35,05	44,40	44,00	37,50	41,90	1,87
Sum n-3	47,90	44,05	37,50	38,55	47,35	46,00	41,25	44,20	1,76
Sum n-6	12,70	12,65	16,10	16,55	12,30	10,35	15,00	11,40	0,72
PUFA	60,65	56,90	53,75	55,25	59,85	56,55	56,35	55,70	1,70
n-3/n-6	3,80	3,50	2,35	2,30	3,80	4,45	2,70	3,90	0,28

Tabell 12b Fettsyrer i lever, statistikk.

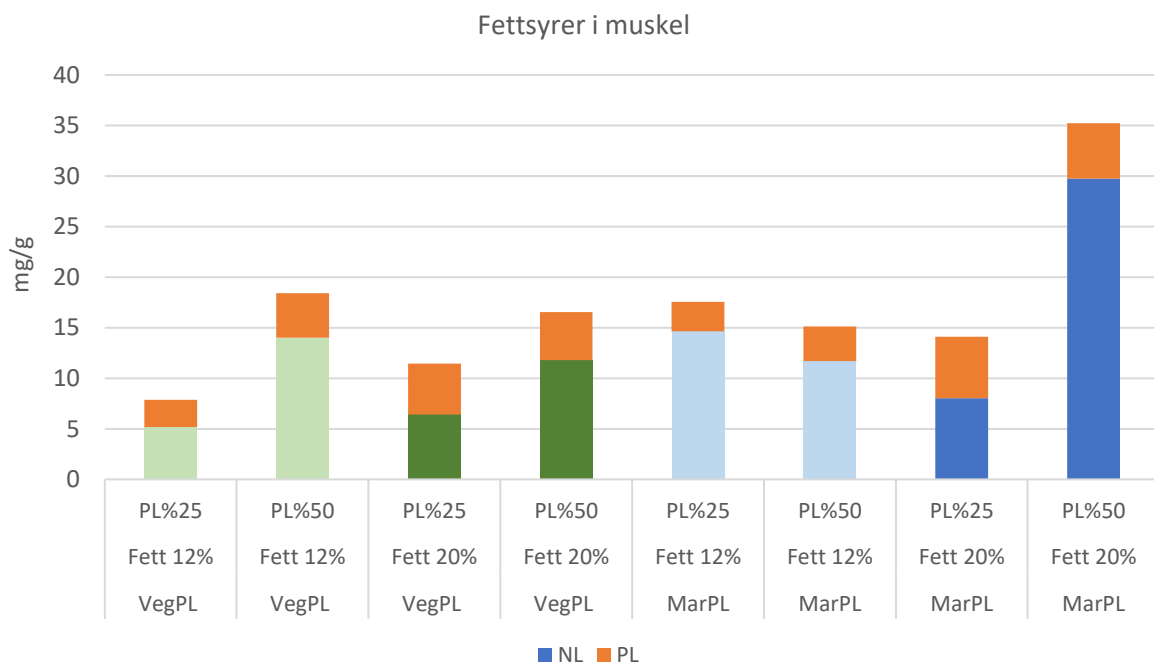
	p-value	r-squar	% av total variasjon forklart av				Tukey	Tukey	Tukey
			fettnivå	PL type	PL nivå	Fettniv*Pltyp	Fettnivå	PLtype	PLnivå
Totale fettsyrer, mg/g									
Sum i NL	0,09	0,49	7,4	39,8	0,1	1,5	ns	Mar>Veg	ns
Sum i PL	0,34	0,32	11,7	3,9	15,9	0,1	ns	Mar>Veg	ns
SUM fettsyrer	0,11	0,47	5,1	40,3	0,0	1,5	ns	Mar>Veg	ns
SumEPA+DHA	0,15	0,43	7,0	34,5	1,4	0,0	ns	Mar>Veg	ns
% av fettsyrer i NL									
EPA	0,002	0,75	48,6	4,7	16,5	5,4	12>20	ns	50>25
DPA	0,0001	0,85	68,6	0,8	11,4	4,6	12>20	ns	50>25
DHA	<0,0001	0,9	34,5	16,5	29,4	9,3	12>20	Mar>Veg	50>25
SFA	<0,0001	0,89	34,5	29,1	22,5	2,7	12>20	Mar>Veg	50>25
MUFA	<0,0001	0,88	29,3	0,9	50,5	7,3	12>20	ns	25>50
EPA+DHA	0,0004	0,82	50,0	0,2	24,6	7,5	12>20	ns	50>25
Sum n-3	0,02	0,63	41,4	2,2	10,1	9,4	12>20	ns	ns
Sum n-6	<0,0001	0,88	43,6	34,6	10,0	2,5	20>12	Veg>Mar	25>50
PUFA	0,02	0,63	10,2	52,2	0,8	0,0	ns	Veg>Mar	ns
n-3/n-6	<0,0001	0,88	52,5	21,8	13,7	0,2	12>20	Mar>Veg	50>25
% av fettsyrer i PL									
EPA	0,007	0,7	57,2	11,3	0,0	1,5	12>20	Mar>Veg	ns
DPA	0,13	0,45	2,1	42,4	0,5	0,0	ns	Veg>Mar	ns
DHA	0,05	0,55	16,8	7,6	3,5	26,6	ns	ns	ns
SFA	0,0002	0,84	24,6	23,2	32,3	4,2	12>20	Mar>Veg	50>25
MUFA	<0,0001	0,89	56,1	17,0	6,5	8,9	20>12	Veg>Mar	25>50
EPA+DHA	0,002	0,76	56,8	12,7	0,3	6,3	12>20	Mar>Veg	ns
Sum n-3	0,004	0,73	55,5	11,4	0,1	6,3	12>20	ns	ns
Sum n-6	0,0002	0,84	42,5	27,9	9,2	4,4	20>12	Veg>Mar	25>50
PUFA	0,11	0,47	34,6	0,7	8,0	3,7	12>20	ns	ns
n-3/n-6	0,0005	0,82	50,1	22,8	6,1	2,7	12>20	Mar>Veg	ns

ns: ikke signifikant

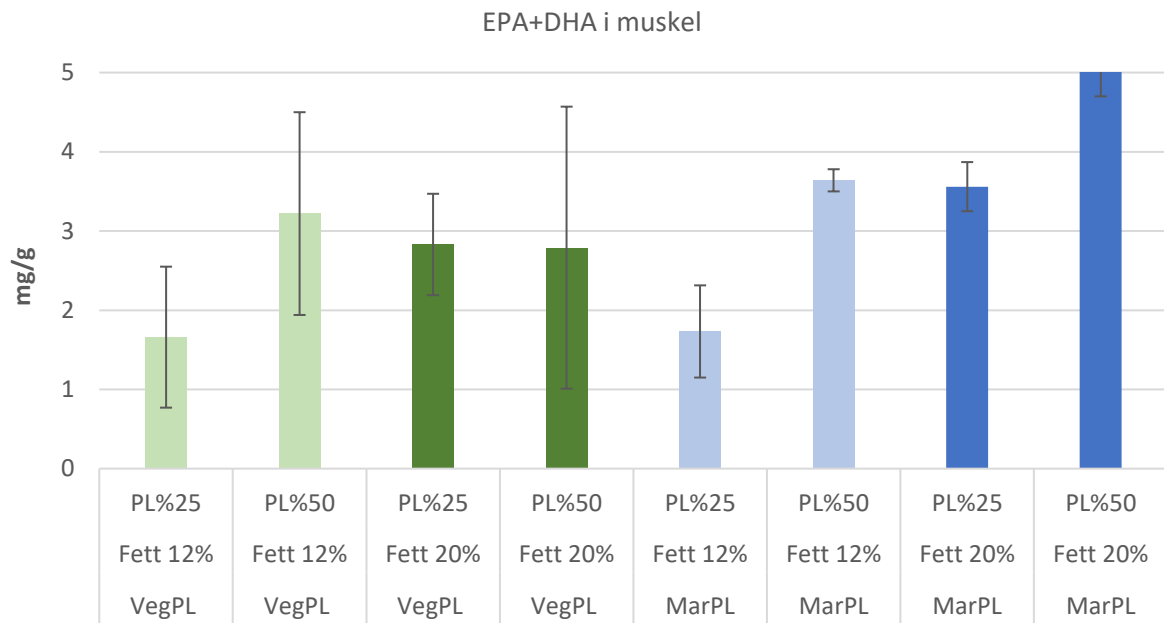
Figur 22 viser total mengde fettsyrer (mg/g) i muskel fra fisk fra alle forsøksgrupper. Den oransje delen øverst på hver stolpe er mengde fettsyrer i polare lipider. Lipidnivå i fôr forklarer mest av variasjonen i mengde fettsyrer i form av fosfolipider (PL), og innholdet er høyere med 20 % enn med 12 % fett i fôr. Resten (blå og grønne deler av stolpene) er mengde fettsyrer i form av nøytrale lipider, som ikke er signifikant påvirket av fôret. 20 %Mar50 skiller seg ut med høyere nivå av fettsyrer i muskel. Fisken i denne gruppen hadde også høyest nivå av TAG, PL og kolesterol i serum. Innen de vegetabiliske gruppene ser det ut til at økt fosfolipidnivå fører til større mengde fett i muskel, noe som samsvarer med høyere TAG, PL og kolesterol i serum i de samme gruppene.

Tabell 13a viser total mengde fettsyrer i muskel (mg/g), og relativ mengde (% av alle fettsyrer) av noen fettsyrer i både nøytrale og polare lipider, tabell 13b viser statistiske parametere. Fettnivå i fôr var den faktoren som forklarte mest av variasjonen i total mengde fettsyrer i polare lipider i muskel, innholdet er høyere med 20 % enn med 12 % fett i fôr, mens variasjonen i relativ fordeling av fettsyrer i nøytrale lipider var mest påvirket av PL-nivå. Ved lavt fettnivå i fôret førte økt PL nivå til en økning i mengde EPA og DHA i muskel, noe som samsvarer med økt muskelvekst. Ved høyt fettnivå i fôret hadde økt PLnivå av vegetabilisk opprinnelse ingen effekt på innhold av EPA og DHA i muskel, bortsett fra i 20 %Mar50 -gruppen. Dette fôret hadde høyere innhold av EPA+DHA, noe som sannsynligvis forklarer økningen i EPA+DHA i denne gruppen.

Figur 23 viser total mengde EPD + DHA (mg/g) i muskel. Enkelte grupper hadde stor variasjon, så det var ingen signifikante effekter av forsøksfaktorene. Bildet peker likevel mot en mulig effekt av fosfolipidnivå i fôr.



Figur 22 Total mengde fettsyrer i muskel, sum av fettsyrer i NL og PL.



Figur 23 Total mengde EPA+DHA (mg/g) i muskel.

Tabell 13a Fettsyrer i muskel.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8	
Fettnivå	12	12	20	20	12	12	20	20	
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar	pooled
PL nivå	25	50	25	50	25	50	25	50	s.e.m.
Totale fettsyrer, mg/g									
Sum i NL	5,17	14,00	6,43	11,80	14,65	11,70	8,04	29,75	5,95
Sum i PL	2,71	4,43	5,01	4,75	2,92	3,43	6,07	5,48	1,02
SUM fettsyrer	8,81	18,31	11,44	18,73	17,57	15,13	14,10	35,23	6,20
Sum EPA+DHA	1,66	3,21	2,83	2,80	3,80	3,64	3,56	7,13	1,31
% av fettsyrer i NL									
EPA	11,20	12,70	8,35	8,90	10,65	10,45	7,50	9,00	0,34
DPA	1,50	1,30	0,90	0,90	1,25	1,30	0,80	0,95	0,07
DHA	8,00	6,50	5,60	4,90	6,80	8,45	5,70	6,80	0,56
SFA	20,50	19,50	15,80	16,10	19,95	25,00	17,85	22,90	1,18
MUFA	42,30	40,30	48,45	46,40	43,70	39,30	48,00	41,95	0,78
EPA+DHA	19,20	19,20	14,00	13,80	17,50	18,90	13,20	15,80	0,52
Sum n-3	24,10	24,30	19,50	19,40	23,00	23,20	18,70	20,70	0,42
Sum n-6	11,20	12,60	14,65	16,00	11,20	9,05	13,45	11,05	0,80
PUFA	35,50	37,10	34,35	35,70	34,40	32,55	32,45	32,15	0,63
n-3/n-6	2,20	1,90	1,35	1,20	2,05	2,55	1,40	1,90	0,17
% av fettsyrer i PL									
EPA	16,55	17,90	13,60	16,05	16,80	17,75	15,25	18,30	1,22
DPA	2,25	2,40	1,75	1,80	2,30	2,05	1,65	1,65	0,11
DHA	26,60	24,60	25,05	25,00	25,65	23,65	26,20	26,00	1,22
SFA	20,65	22,30	19,00	18,55	21,30	25,35	20,15	22,55	0,85
MUFA	20,60	19,45	23,65	21,65	20,50	18,95	20,90	18,60	0,46
EPA+DHA	43,10	42,45	38,65	40,95	42,40	41,40	41,40	44,30	1,12
Sum n-3	46,95	46,20	42,70	44,70	46,25	44,55	45,40	47,50	1,13
Sum n-6	9,70	9,65	12,50	13,45	9,30	8,20	11,35	9,00	0,62
PUFA	56,75	55,95	55,30	58,15	55,70	52,90	56,85	56,70	1,32
n-3/n-6	4,80	4,80	3,45	3,35	5,00	5,45	4,00	5,25	0,27

Tabell 13b Fettsyrer i muskel, statistikk.

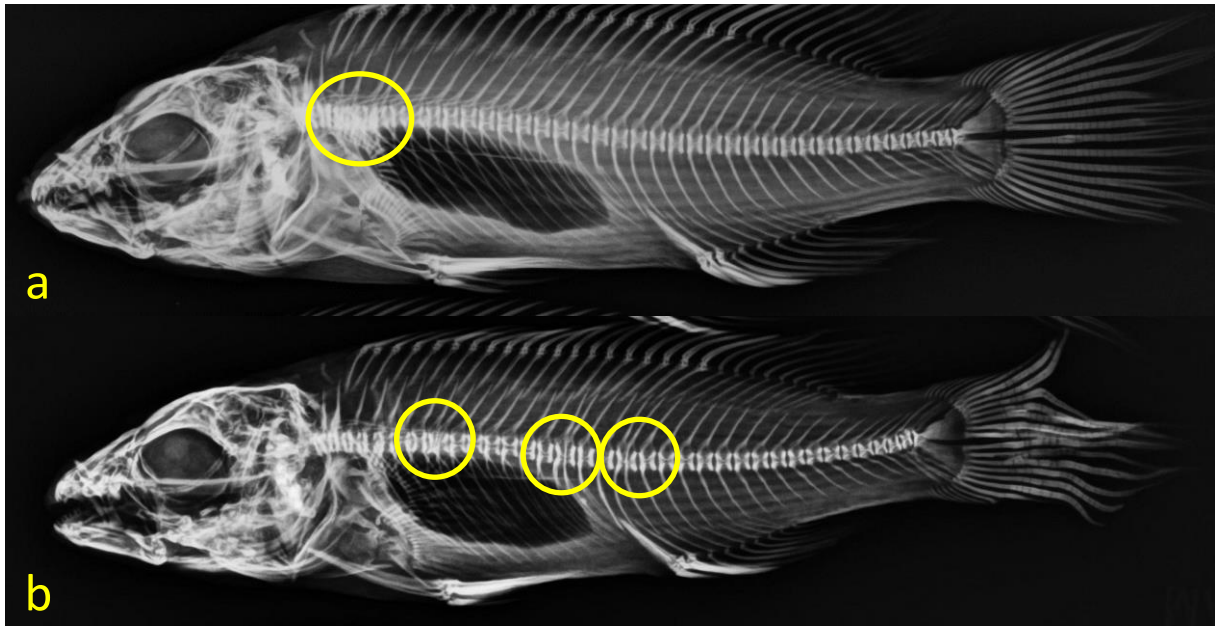
	p-value	r-square	% av total variasjon forklart av				Tukey	Tukey	Tukey
			fettnivå	PL type	PL nivå	lipidlevel * PLtype	Fettnivå	PLtype	PLniv
Totale fettsyrer, mg/g									
Sum i NL	0,26	0,45	1,73	17,10	23,45	2,35	ns	ns	ns
Sum i PL	0,15	0,44	37,65	0,61	1,18	4,09	20>12	ns	ns
SUM fettsyrer	0,24	0,46	6,00	14,12	23,47	2,76	ns	ns	ns
Sum EPA+DHA	0,32	0,48	6,77	24,56	10,21	2,65	ns	ns	ns
% av fettsyrer i NL									
EPA	<,0001	0,94	77,77	6,25	7,05	2,51	12>20	ns	50>25
DPA	0,0005	0,90	86,10	2,07	0,57	0,96	12>20	ns	ns
DHA	0,04	0,68	53,88	8,37	5,03	0,86	12>20	ns	ns
SFA	0,004	0,83	25,75	30,88	24,78	1,28	12>20	Mar>Veg	50>25
MUFA	<0,0001	0,93	49,17	4,54	37,00	2,71	20>12	Veg>Mar	25>50
EPA+DHA	<0,0001	0,94	84,29	0,06	7,39	1,98	12>20	ns	50>25
Sum n-3	<0,0001	0,95	88,70	0,69	3,32	2,02	12>20	ns	50>25
Sum n-6	0,005	0,81	43,99	30,96	5,35	1,13	20>12	Veg>Mar	ns
PUFA	0,007	0,80	11,25	67,82	0,17	0,29	ns	Veg>Mar	ns
n-3/n-6	0,004	0,83	64,62	11,13	7,10	0,11	12>20	Mar>Veg	50>25
% av fettsyrer i PL									
EPA	0,09	0,49	13,18	6,27	23,84	5,66	ns	ns	50>25
DPA	0,0003	0,83	77,85	5,09	0,04	0,04	12>20	ns	ns
DHA	0,55	0,22	1,82	0,04	10,76	9,77	ns	ns	ns
SFA	0,001	0,78	30,17	27,03	20,20	0,73	12>20	Mar>Veg	50>25
MUFA	<0,0001	0,89	17,15	25,00	29,91	16,50	20>12	Veg>Mar	25>50
EPA+DHA	0,08	0,5	7,48	8,62	5,74	28,08	ns	ns	ns
Sum n-3	0,14	0,44	6,65	4,96	1,36	30,78	ns	ns	ns
Sum n-6	0,0003	0,83	44,95	27,94	3,27	7,08	20>12	Veg>Mar	ns
PUFA	0,36	0,31	14,82	7,30	0,37	8,05	ns	ns	ns
n-3/n-6	0,0003	0,83	41,68	28,37	6,67	6,67	12>20	Mar>Veg	ns

ns: ikke signifikant

4.2.5 Røntgenevaluering

Start

Det var et høgt innslag av fisk med feil i ryggrad og kjeve i startuttaket, det vil si misdannelser som stammer fra perioden før forsøket startet opp. Den dominerende feilen var virvelmisdannelser. De fleste av disse var fusjoner, der to eller flere virvler var helt eller delvis sammenvokst. Det var en tydelig overvekt av feil i fremre del av ryggraden (virvel 1-8) (Figur 24a), men også lenger bak i ryggen (Figur 24b).



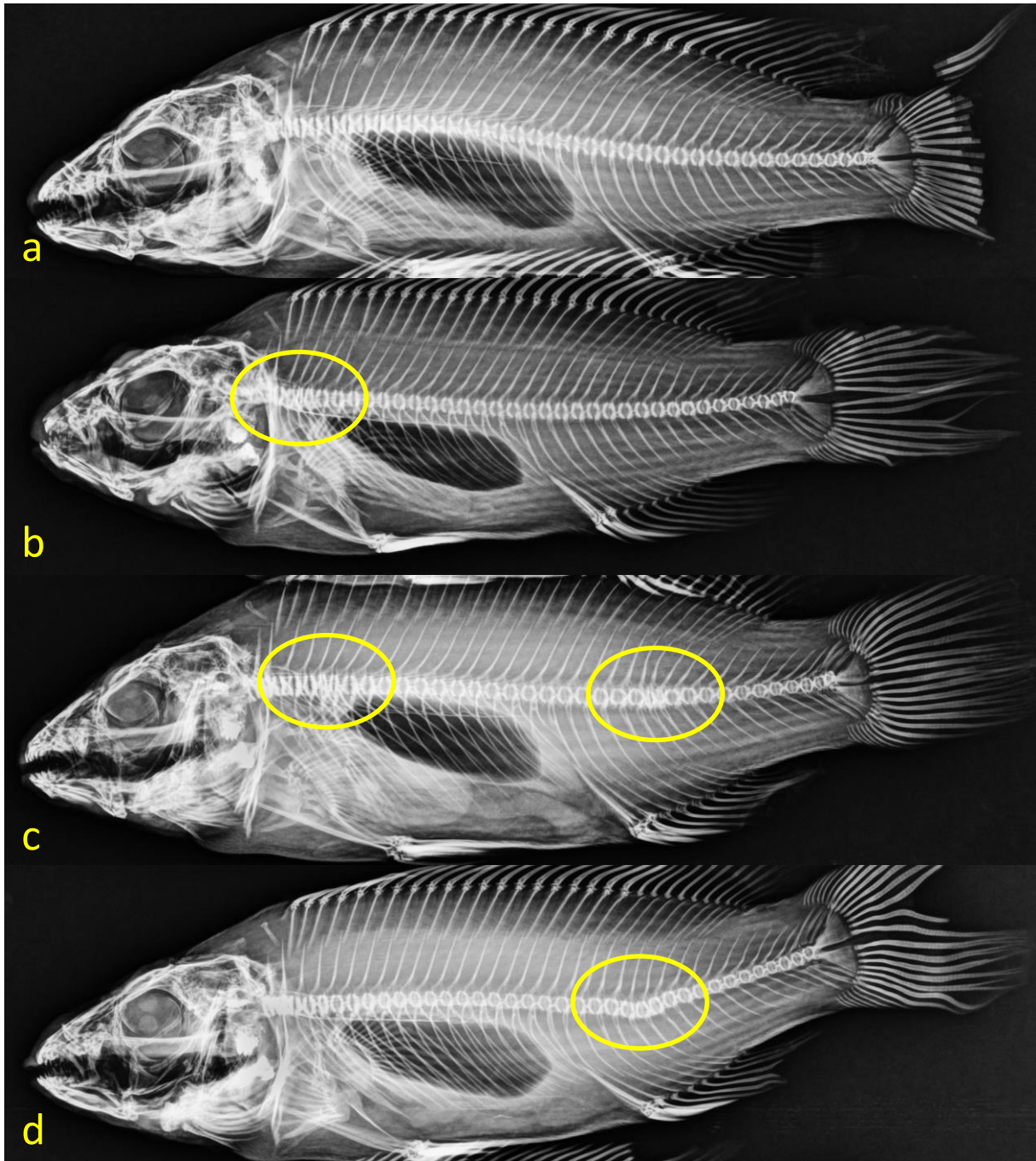
Figur 24 Fusjoner i ryggrad i startuttaket. A) Delvis sammenvoksing av 3 virvler i nakken. B) Fisk med tre grupper av sammenvokste virvler fordelt langs ryggraden.

Avslutning

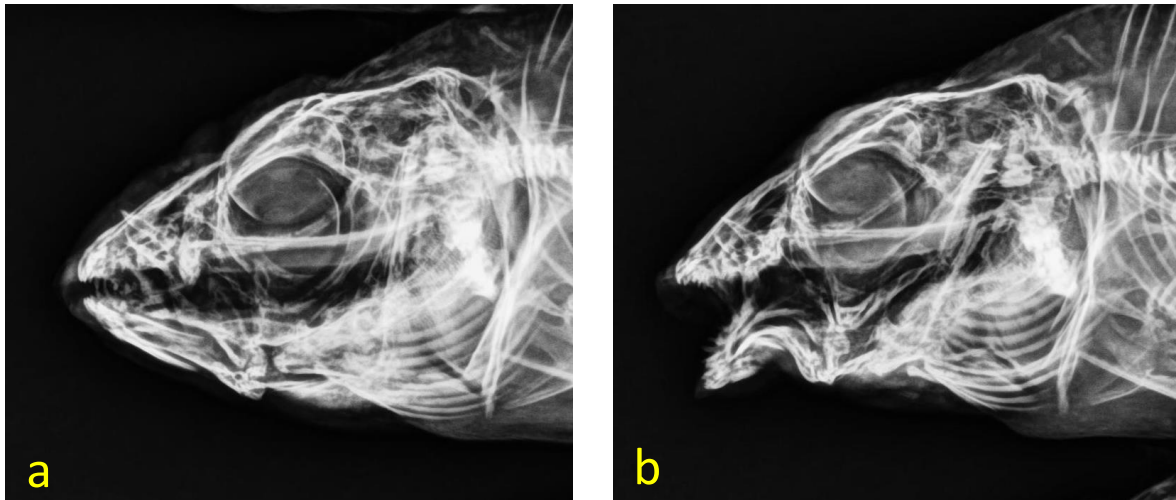
Ved avslutning av forsøket ble det registrert samme type avvik og misdannelser som i startuttaket. Innslag og alvorlighetsgrad var økt litt i løpet av forsøksperioden, men det ble ikke funnet noen sammenheng med forsøksfaktorene.

Det generelle inntrykket, som også gjelder fisk uten konkrete misdannelser, var at virvlene var mer uregelmessige enn det som forventes.

Det som dominerte var fusjoner, med overvekt av feil i de fremste 8-10 virvlene (Figur 25a). Det var også et tydelig innslag av feil i ryggvirvlene omkring virvel 21-26 (Figur 25b), og hos mange av disse var det et tydelig akseavvik på dette stedet (lordose, oppoverknekk i ryggraden) (Figur 25c, d). Det ble også registrert kjevefeil, først og fremst underutviklet underkjeve (Figur 26b).



Figur 25 Fisk med ulike feil i ryggrad ved avslutning av forsøket. A) Fisk som ble bedømt som normal. B) Fisk med delvis sammenvoksing av 4 virvler i nakken. C) Fisk med to lesjoner, der den bakerste er lokalisert omkring virvel 22-24. D) Fisk med virvelfeil og avvik i aksen (lordose).



Figur 26 Unormale kjever. A) Fisk med normalt kjeveparti. B) Fisk med misdannet underkjeve.

Oversikt over registreringene er vist i Tabell 14.

Tabell 14 Oversikt over registrerte beinmisdannelser, ved start og slutt av forsøket. N=80 ved start, n=43-46 pr. fôr ved slutt.

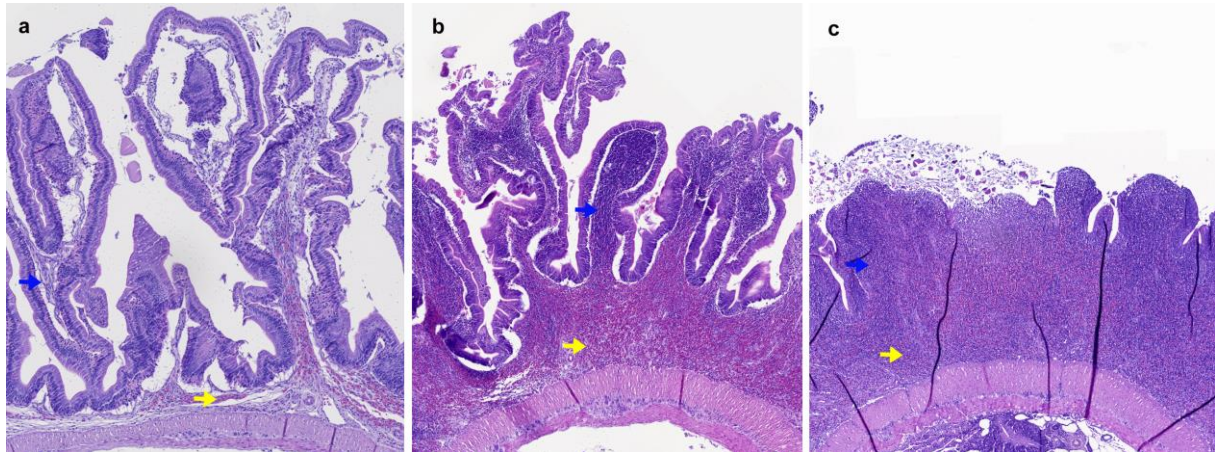
	Start	Slutt, snitt alle	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8
Lipidnivå i fôr (%)			12	12	20	20	12	12	20	20
PL type			veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar
PL nivå % av lipid			25	50	25	50	25	50	25	50
Andel normal fisk, % 65	55		45	47	57	61	59	49	57	63
Fisk med fusjoner, % 33	40		49	37	43	35	39	47	37	33
Fisk med aksefeil, % 1	3		2	2	2	4	0	0	9	2
Fisk med kjevefeil, % 4	5		7	14	0	2	4	7	2	7

4.2.6 Histomorfologi

Betennelsesreaksjoner

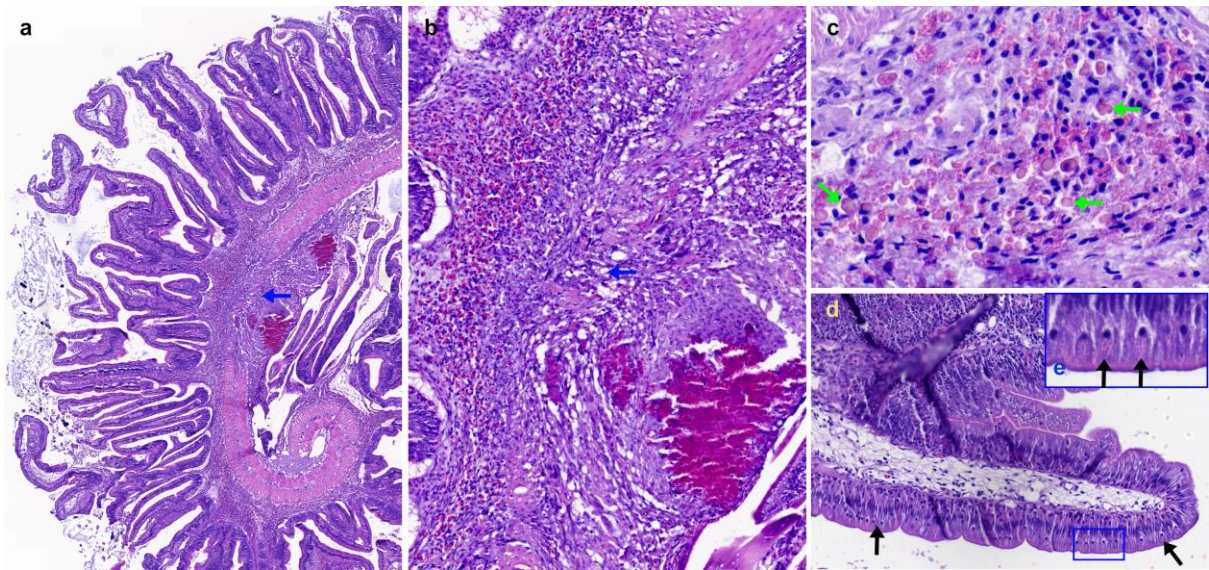
Det ble observert høy forekomst av morfologiske endringer forbundet med betennelsesreaksjoner i tarmen. Endringene var tydeligst i det fremste tarmavsnittet (IN-1), men alle tarmavsnitt var påvirket. Endringene som ble registrert var økt infiltrasjon av immunceller (eosinofile granulocytter, EGCs) i submukosa og lamina propria (Figur 27). I alvorlige tilfeller var hovedandelen av EGC-cellene degranulert.

I ett individ ble det påvist en kraftig lesjon i IN-2 avsnittet, der tarmveggen var brutt og muskelfibrene ødelagt (Figur 28a og b). Ingen histologiske observasjoner kan forklare bakgrunnen for disse sterke betennelsesreaksjonene. Høy forekomst av EGCs og rodlet-celler kan tyde på at betennelsen var forårsaket av parasitter, men det ble ikke påvist parasitter i tarmen i noen av fiskene som ble evaluert.

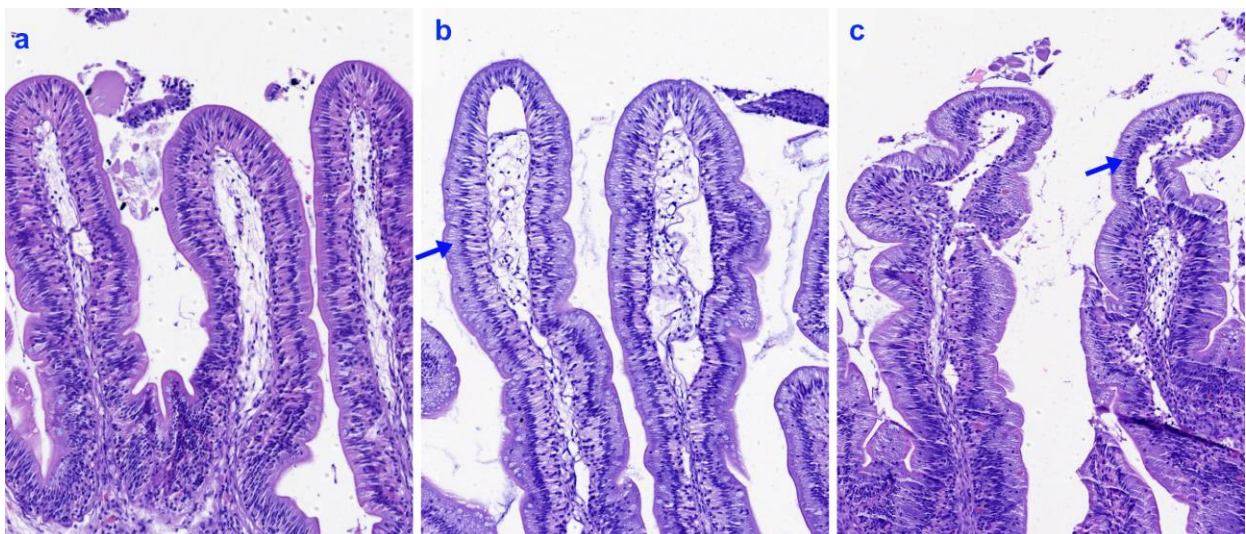


Figur 27 *Representative bilder av morfologiske trekk ved histologiske bedømmelse av tarmavsnitt. All bildene er fra IN-1 avsnittet. Endringer som ble observert var økt infiltrasjon av immunceller i submukosa (gule piler) og lamina propria (blå piler), samt økt intraepitelial infiltrasjon av lymfocytt-lignende celler, eosinofile granulocytter, og, i noen fisk, rodlet-celler. Bilde a: normal morfologi, b: økt infiltrasjon av immunceller i submucosa og lamina propria, c: alvorlig grad av betennelsesreaksjon, med medfølgende tap av epitelstruktur og mulig sårdannelse.*

I mesteparten av fisken som hadde forekomst av tarmbetennelse ble det registrert små, kokkoide, krystalliske strukturer i celleinfiltratet i submucosa og lamina propria (Figur 28c). Disse kan muligens være soppsporer, som kan ha forårsaket de observerte betennelsesreaksjonene. En soppinfeksjon kunne teoretisk ha vært forårsaket av inntak av mugne fôrpellet. Alt forsøksfôr ble lagret på frys og mugg ble ikke observert på pellet, derfor er dette mindre sannsynlig som årsak. Strukturene kan muligens også være kondenserte granula fra degranulerte EGC-celler.



Figur 28 Bilder av morfologiske trekk observert i enkelte fisk. (a): IN-2 tarmavsnitt med moderat enteritt og fokal betennelse i muskel, med tap av muskelfibre og brudd i tarmveggen (blå pil). (b): Forstørret bilde av lesjonen i bilde a. (c): Kokkoide krystalliske strukturer (grønne piler), observert i området med lesjoner som vist i bilde a og b. (d): Tarmfold med høy forekomst av rodlet-celler i epitellaget. (e): Forstørret bilde av blått utsnitt fra bilde d.

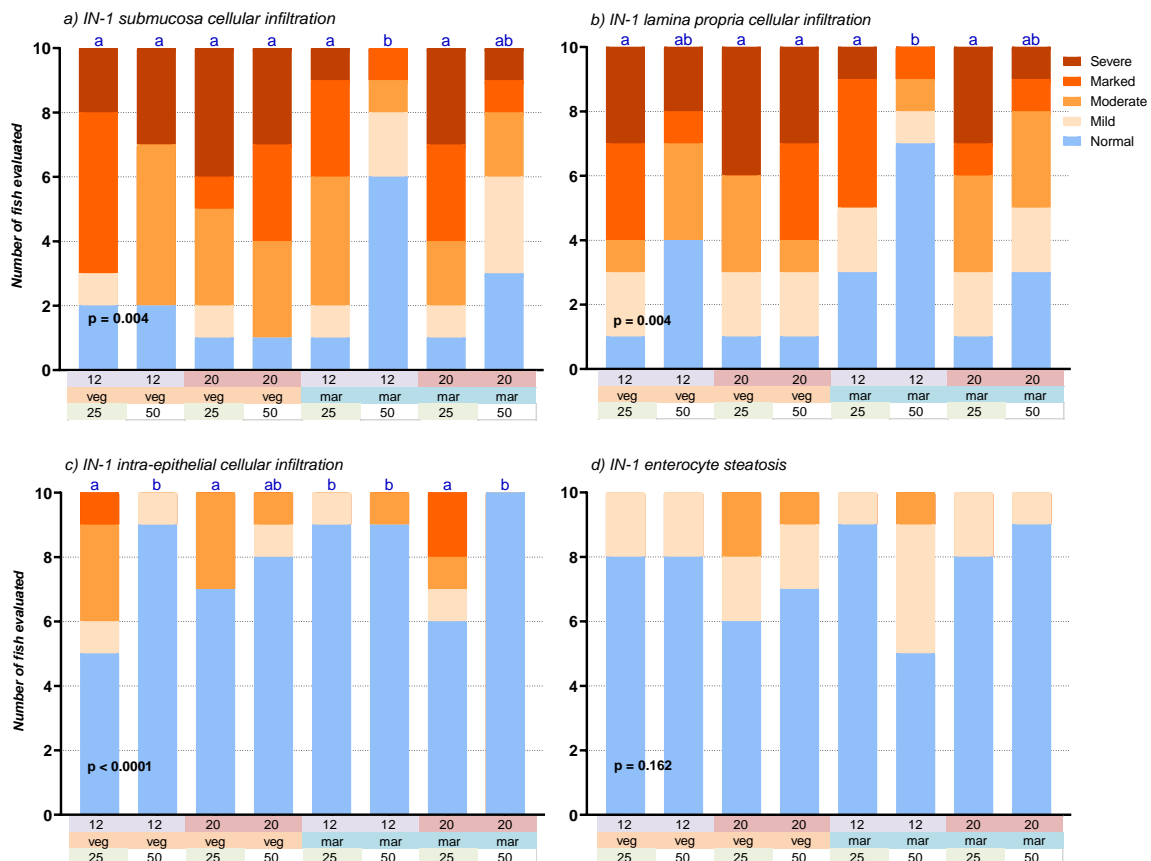


Figur 29 Representative bilder fra IN-3 avsnittet som viser normal (a), mild (b) og moderat (c) grad av hypervakuolisering av enterocytterne (blå piler).

Forekomst og alvorlighetsgrad av vakuolisering av enterocytterne ble også evaluert (Figur 29). Mild til moderat grad av hypervakuolisering (steatose) ble påvist i en del av fisken som ble evaluert, hovedsakelig i de tre fremste tarmavsnittene (IN1-3).

IN1 histologi

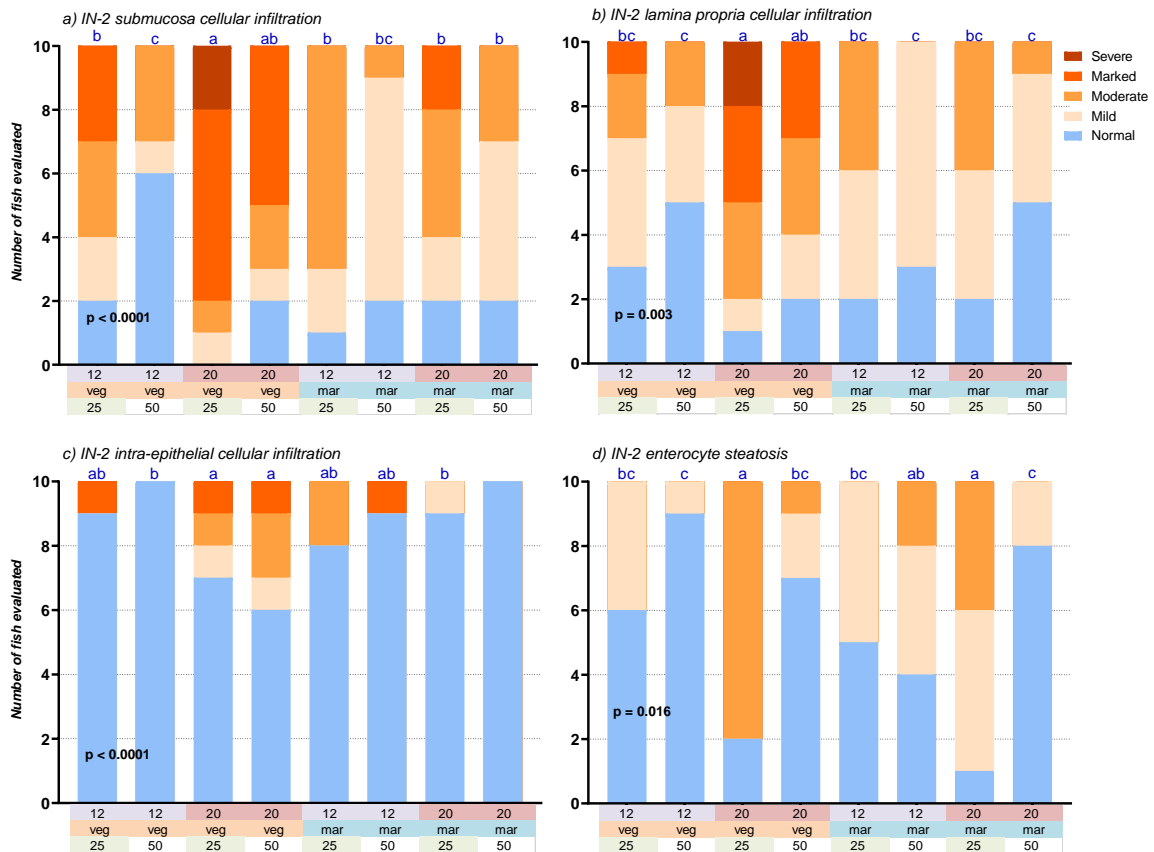
Mesteparten av fisken som ble evaluert viste mild til alvorlig grad av betennelse i IN-1 avsnittet. Som vist i figur 30a og 30b, ble mer enn 70 % av fisken vurdert som unormal for de fleste fôrgruppene. Fisk fra fôrgruppe 6 (fettnivå=12, PL type = marin, PL nivå = 50) viste færrest avvik fra normal morfologi. Intraepitelial infiltrasjon av lymfocytter, EGCs og rødlet-celler ble påvist i størst grad for fisken fôret på diett 1 og diett 7 (Figur 30c). Steatose i enterocytene ble registrert i mild til moderat grad for minst en individuell fisk fra hver fôrgruppe, men det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene (Figur 30d).



Figur 30 Resultater av histologisk scoring av grad av betennelsesreaksjoner og vakuolisering (steatose) i enterocytene i IN-1 tarmavsnitt. Fôrgruppene er vist på x-aksen. p-verdier for den statistiske analysen er vist i hver enkelt figur.

IN2 histologi

Morfologiske endringer i IN-2 gjenspeilte funnene fra IN-1 (Figur 31). Endringene som ble observert var imidlertid av mindre alvorlig grad. Fisk fra fôrgruppe 3 viste størst forekomst og alvorlighetsgrad av patologi. Intraepitelial infiltrasjon av immunceller ble registrert i noe mindre grad enn i IN-1, mens det var høyere forekomst av steatose. Det var høyest forekomst av steatose i de to fôrgruppene som hadde gått på 20 % fett og 25 % fosfolipid (Figur 31d).



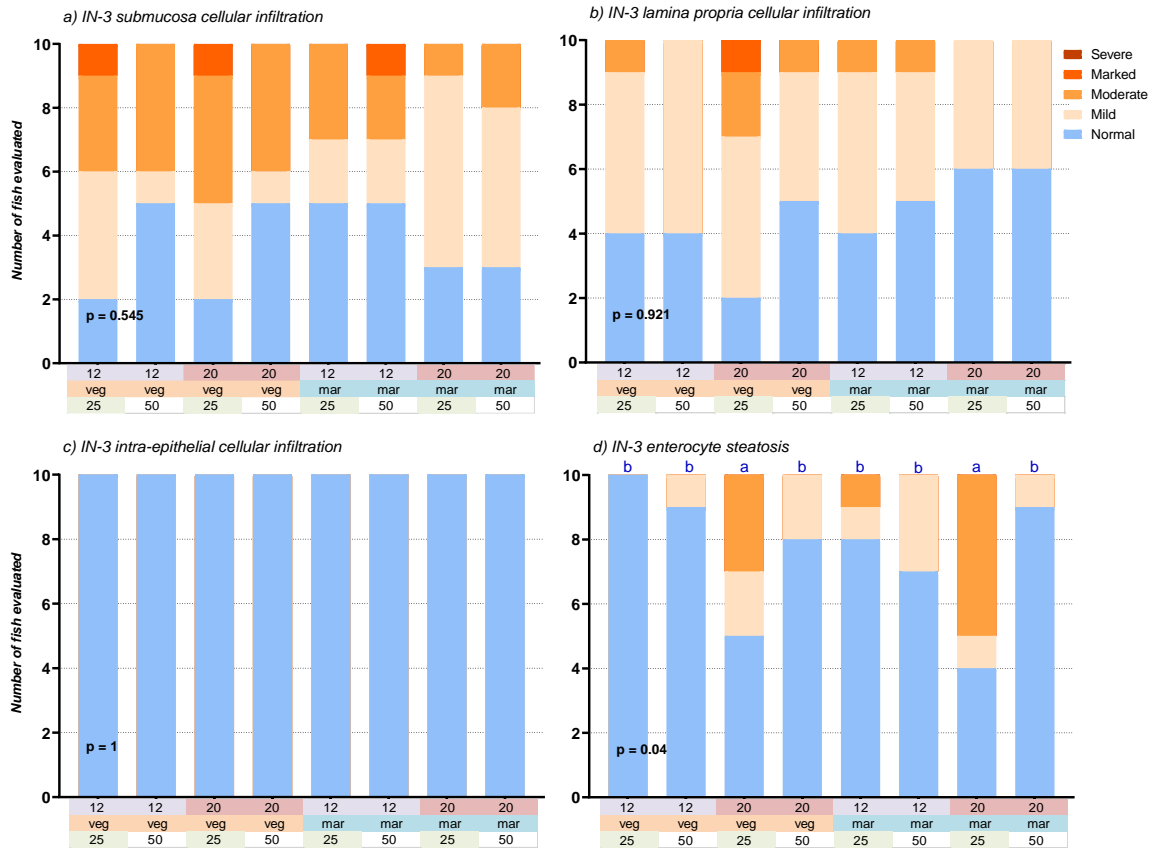
Figur 31 Resultater av histologisk scoring av grad av betennelsesreaksjoner og vakuolisering (steatose) i enterocytene i IN-2 tarmavsnitt. Fôrgruppene er vist på x-aksen. p-verdier for den statistiske analysen er vist i hver enkelt figur.

IN3 histologi

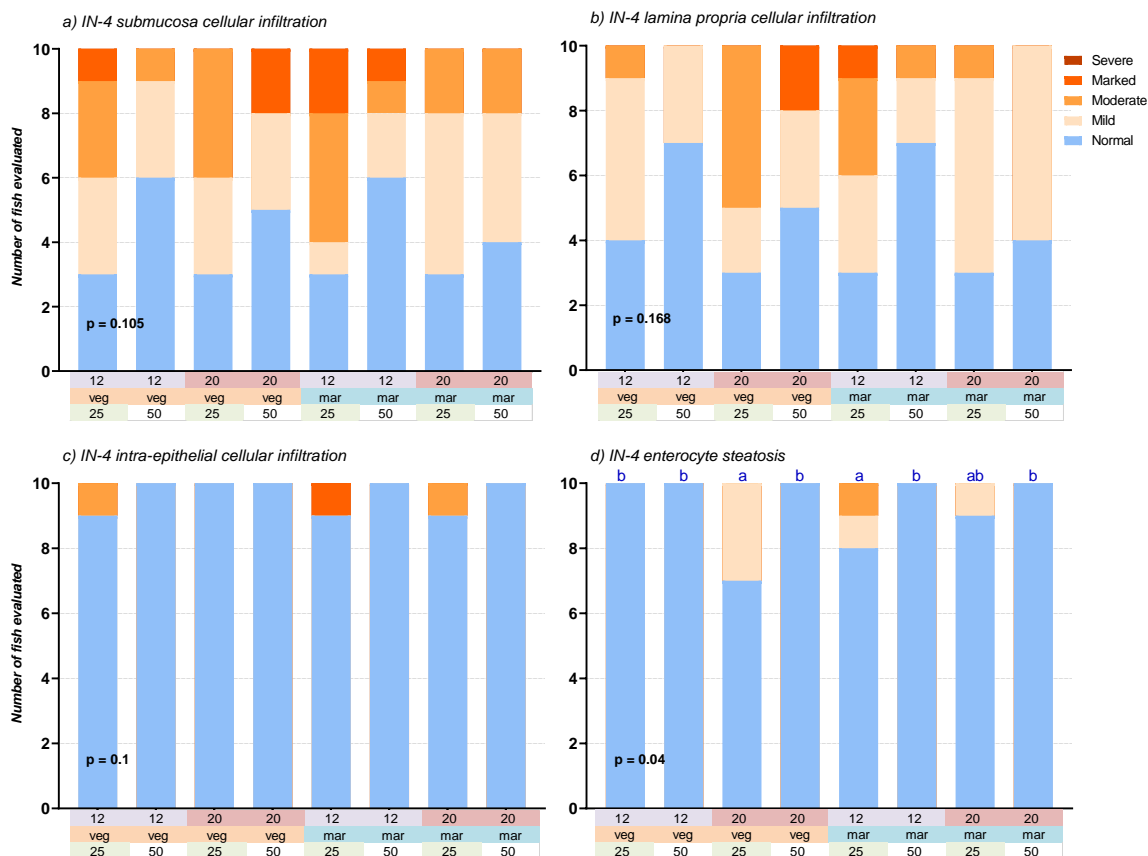
Forekomst og alvorlighetsgrad av betennelsesreaksjoner i IN-3 var lavere enn for IN-2. Endringer som ble registrert var stort sett av mild og moderat grad, og tap av epitelstruktur var mindre i dette tarmavsnittet. Det var ingen signifikante forskjeller mellom fôrgruppene (Figur 32). Steatose forekom også i mindre grad enn for IN-2 avsnittet, men resultatene gjenspeilte IN-2 med hensyn på effekt av fôr; diett 3 og 7 var mest påvirket.

IN4 histologi

Morfologiske endringer assosiert med tarmbetennelse gjenspeilte funnene fra IN-3 avsnittet (Figur 33). Det var mindre grad av steatose i IN-4 enn for de tre andre tarmavsnittene. Fôrgruppe 3 og 6 hadde flest observasjoner som avvok fra normalen.



Figur 32 Resultater av histologisk scoring av grad av betennelsesreaksjoner og vakuolisering (steatose) i enterocytene i IN-3 tarmavsnitt. Fôrgruppene er vist på x-aksen. p-verdier for den statistiske analysen er vist i hver enkelt figur.



Figur 33 Resultater av histologisk scoring av grad av betennelsesreaksjoner og vakuolisering (steatose) i enterocytene i IN-4 tarmavsnitt. Fôrgruppene er vist på x-aksen. p-verdier for den statistiske analysen er vist i hver enkelt figur.

En ordinal logistisk regresjonsanalyse ble gjennomført for å teste effekten av fettnivå, fosfolipidnivå og kvalitet. Som vist i tabell 15, hadde fosfolipidnivå (25 versus 50 %) størst innvirkning på tarmhistologien. Et høyt fosfolipidnivå viste gjennomgående en lavere score på de ulike histologiparametrene, det vil si en bedre tarmhelse. Signifikante effekter av PL-kvalitet viste at vegetabilsk PL var assosiert med høyere grad av betennelse. Fettnivå var assosiert med høyere grad av betennelse i IN-2, og med høyere forekomst av steatose i IN-2 og IN-3.

Tabell 15 Statistiske resultater fra en ordinal logistisk regresjonsanalyse for å vurdere effekt fettnivå, fosfolipidnivå- og kvalitet på tarmhistologi. P-verdier er vist i kolonnene. Ns= ikke signifikant effekt, +veg; høyere histologiscores i vegetabiliske fôrgrupper, +20; høyere histologiscores i fôrgrupper med 20 % fett, -50; lavere histologiscores i 50 % PL -grupper.

	Fett nivå (12 vs 20)	PL type (veg vs mar)	PL nivå (25 vs 50)
<i>IN-1</i>			
Submucosal inflammatory cell infiltration	§ns	0.01 (+ veg)*	0.01 (-50)
Lamina propria inflammatory cell infiltration	ns	0.02 (+ veg)	0.03 (-50)
Intra-epithelial cell infiltration	ns	ns	0.01 (-50)
Enterocyte steatosis	ns	ns	
<i>IN-2</i>			
Submucosal inflammatory cell infiltration	0.003 (+20)	0.02 (+veg)	0.001 (-50)
Lamina propria inflammatory cell infiltration	0.02 (+20)	0.03 (+veg)	0.01 (-50)
Intra-epithelial cell infiltration	ns	ns	ns
Enterocyte steatosis	0.01 (+20)	ns	0.0001 (-50)
<i>IN-3</i>			
Submucosal inflammatory cell infiltration	ns	ns	ns
Lamina propria inflammatory cell infiltration	ns	ns	ns
Intra-epithelial cell infiltration	ns	ns	ns
Enterocyte steatosis	0.01 (+20)	ns	ns
<i>IN-4</i>			
Submucosal inflammatory cell infiltration	ns	ns	0.03 (-50)
Lamina propria inflammatory cell infiltration	ns	ns	0.01 (-50)
Intra-epithelial cell infiltration	-	-	-
Enterocyte steatosis	-	-	-

Oppsummering – tarmhistologi

Høy forekomst av alvorlige betennelsesreaksjoner ble observert i mange fisk, hovedsakelig i de proksimale (fremre) tarmavsnittene. Årsaken til disse morfologiske endringene er uklar, men de kan muligens ha vært forårsaket av soppinfeksjoner. Mild til moderat forekomst av hypervakuolisering (steatose) ble observert for en del fisk. Fosfolipidnivå var den fôrfaktoren som så ut til å ha størst innvirkning på tarmhistologien. 50 % fosfolipid i fôret viste gjennomgående en lavere score på de ulike histologiparametrene enn 25 %, det vil si en bedre tarmhelse.

4.2.7 Konklusjoner

Dersom man ønsker høyere fett- eller PL-nivå i fôr til berggylt, bør det være i form av marine PL, økning av vegetabilsk PL gir redusert tilvekst. Høyfett dietter med høy andel lipider i form av PL gir høyere vekst hos berggylt, delvis i form av fett i muskelvev og lever. Dette kan muligens brukes som en strategi for å øke energireservene og velferdsstatus til berggylt i forkant av vintermånedene.

Økt fosfolipidnivå så ut til å gi bedre tarmhelse, men økt vegetabilsk PL var assosiert med høyere grad av betennelse.

4.3 Mikronæringsstoff i fôr til berggylt

Vi vet per i dag lite om behovet for mineraler og vitaminer hos berggylt. Ved produksjon av fôr til berggylt er praksis å basere nivåene på erfaringer fra andre marine arter, samt generelle råd fra NRC. Alle arter har sine særegenheter, berggylt har et fordøyelsessystem uten mage og blindtarm, spiser små måltid ofte og vokser sakte. Vi vet lite om hvordan det enkle fordøyelsessystemet påvirker ernæringskravene. I oppdrettet berggylt er det skjellettdeformiteter en utfordring. Deformiteter kan forårsakes av mekanisk stress og sykdom, men det er også vist sammenheng mellom fôrsammensetninger og skjellettdeformiteter i ung berggylt. Kunnskap fra andre arter tilsier at disse problemene trolig kan relateres til mikronæringsstoffstatus. Dette forsøket hadde som mål å fremskaffe kunnskap om behov for ulike vitaminer og mineraler hos berggylt.

4.3.1 Materiale og metoder

Forsøksdesign og fôr

Basert på resultatene i AP1 med ulike produksjonsmetoder for fôr ble det formulert fôr med antatt optimal pelletkvalitet ved bruk av kaldekstrudering, og balanse mellom hovednæringsstoffene basert på (Hamre, Nordgreen et al. 2013). Dette fôret ble brukt som basis for innblanding av ulike nivåer av mikronæringsstoffer.

En vitamin- og mineralblanding (NP100) ble satt sammen basert på "beste gjetting" og generelle råd fra (NRC 2011). Denne mikronæringsstoffpakken (NP100) skulle i prinsippet tilsettes fôrene i syv ulike nivåer: 0, 50, 100, 150, 200, 400 og 800 % av NP100. Med bakgrunn i tidligere erfaringer med berggylt som viser at den er kravfull med hensyn til smak måtte vi benytte ingredienser med høyt nivå av enkelte mineraler og vitaminer. Dette førte til at fôret uten tilsetning av NP i utgangspunktet hadde et relativt høyt innhold av disse mineralene og vitaminene. For å unngå toksiske nivåer av enkelte mineraler og vitaminer ble NP tilpasset disse. Studiet ble derfor utført etter et regresjonsdesign bestående av 5 mineraler og 7 vitaminer som ble tilsatt 7 fôr (Tabell 16). Råvaresammensetning i fôrene er vist i Tabell 17.

Tabell 16 Vitamin og mineral nivå i fôrene (analysert).

Vitaminer og mineraler mg/kg våtvekt	Nivå basisdiert	Nivå 50%	Nivå 100%	Nivå 150%	Nivå 200%	Nivå 400%	Nivå 800%
	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7
Vitamin D	0,03	0,04	0,06	0,1	0,13	0,21	0,18
Vitamin E	77	73	77	73	97	171	430
Vitamin K	22,8	22,5	21,9	22,7	28,8	24,2	22,2
Vitamin C	14	29	77	120	170	370	760
Folat	1,4	0,97	1,4	2,4	3,5	4	8,1
Biotin	0,18	0,14	0,57	0,68	0,83	1,1	1,9
Kobber	15	15	15	15	15	23	49
Jern	69	71	90	130	170	310	630
Sink	36	33	42	63	91	190	570
Mangan	8,6	8,2	9,5	16	22	50	110
Kobolt	0,069	0,18	0,35	0,54	0,66	1,5	2,5
Kalsium	16000	16000	16000	16000	16000	16000	15000
Natrium	6700	6700	6800	6900	6800	6800	6600
Kalium	9500	9500	9800	9700	9600	9500	9100
Magnesium	2400	2300	2400	2400	2400	2300	2300
Fosfat	9500	9600	9700	9700	9700	9500	9400

Tabell 17 Råvaresammensetning i basisblandingen til forsøksfôrene.

Ingredienser, g/100g	Basisdiert
Krill hydrolysat	6,660
Rekemel	28,000
Torskemuskel, mel	29,146
Hvete stivelse	10,000
Hvete gluten	8,000
Krillolje	5,000
Soya lecithin	2,00
Lysin	0,800
SPC	8,000
Kolesterol	0,200
Taurin	0,020
K ₂ CO ₃	0,141
MgSO ₄	0,313
Kolin klorid	0,500
Yttrium oksyd	0,010

Berggylt til forsøket ble produsert ved et kommersielt berggyltanlegg, og transportert med bil til Sunndalsøra. Fisken ble før transport veid inn i plastposer med sjøvann som ble pakket i isoporkasser. Snittvekten av fisken ble før transport oppgitt til 2 gram. Det ble pakket 200 g fisk i hver pose, og ved ankomst Nofima på Sunndalsøra ble det satt ut to poser i hvert av 15 kar. Forventet antall fisk var ca. 200 pr kar. Ved avslutning og etter optelling av restfisk og døde fisk i forsøksperioden, viste det seg at antall fisk per kar var lavere enn antatt fordi snittvekten var høyere enn oppgitt, dvs. 4 gram i stedet for 2 gram. Snittvekten varierte også mellom kar (2,6-5,6 g). Dødelighet og tilvekst ble beregnet ut fra faktisk antall fisk satt ut i hvert kar.

Alle fiskegrupper fikk i en tilvenningsperiode på 27 dager på samme fôr som de hadde gått på hos HMY (Otohime) før de ble satt over på forsøksfôr. Perioden på forsøksfôr varte i 85 dager. Forsøksfôrene ble gitt til fisk i to kar hver, bortsett fra diett 4 som ble gitt til fisk i tre kar. Et kontrollkar fortsatte på Otohime-fôr gjennom hele forsøksperioden.

Forsøkskarene var sirkulære med konisk bunn, grå vegger, diameter 50 cm og volum 150 liter. Karene var dekket av et gjennomsiktig lokk med åpning for føring fra belteautomat, og hadde et separat lyspunkt (konstant lys 24 timer) plassert på lokket. Sjøvannet var UV-behandlet og filtrert til 10 µm. Gjennomsnittlig vanntemperatur var 14,7 °C (14,1-15,8 °C), vanngjennomstrømmingen 4 l/minutt, og oksygenmetning ble holdt mellom 80-100 %. Døde fisk ble tatt ut daglig, og vekt på død fisk ble registrert.

Prøveuttak og analyser

Ved avslutning ble det registrert vekt og lengde på all fisk, og vekstrate ble beregnet som både SGR og TGC, basert på gjennomsnittsvekt. Det ble tatt ut 8 fisk per kar for analyse av mikronæringsstoffer. Hel fisk ble homogenisert på knust is, fordelt til analyser og fryst på flytende nitrogen. Prøvene ble transportert til HI på tørris og holdt ved -80°C til analyse. Se tabell 18 for oversikt over metoder.

Tabell 18 Metoder brukt for vitamin og mineral analyser.

Analytt	Prinsipp	Referanse
Vitamin C	HPLC	(Mæland and Waagbø 1998)
Biotin	Mikrobiologisk	(Mæland, Rønnestad et al. 2000)
Folat	LC-MS/MS	(Švarc, Oveland et al. 2020)
Vitamin A	HPLC	(Moren, Opstad et al. 2004)
Vitamin D	HPLC	(CEN 1999)
Vitamin E	HPLC	(Hamre 2011)
Vitamin K	HPLC	(CEN 2003)
Mikromineraler	ICP-MS	(Julshamn, Lundebye et al. 2004)

Det ble registrert velferdsskår på alle resterende fisker i karene ved avslutning. På grunn av høy og varierende dødelighet i forsøket var det varierende antall fisk fra hvert kar, dvs. fra 10 til 46 fisker. Data fra velferdsskåring ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere gjennomsnittsverdiene til en sumindeks pr kar. Sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer pr kar.

Røntgenanalyser

Ved oppstart av forsøket ble det tatt ut og avlivet 33 fisk for røntgenundersøkelse (startuttak). Ved avslutning ble det tatt ut ca 25 fisk pr kar til røntgen. For fôr 1-3 og 5 (2 kar pr fôr) var antall pr. fôr ca. 50. For fôr 4 (3 kar) var antallet til sammen 80. Fra fôr 6 var antallet 38, og fra fôr bare 7 totalt. I tillegg ble det røntgenfotografert 10 fisk fra gruppa med kommersielt fôr. Til sammen 343 fisk ble røntgenevaluert. Fisken ble frosset inn og røntgenfotografert frossen. Bildene ble evaluert ved sammenlikning av beinstrukturene mellom fisk, og med røntgenbilder av vill berggyllt fra arkiv.

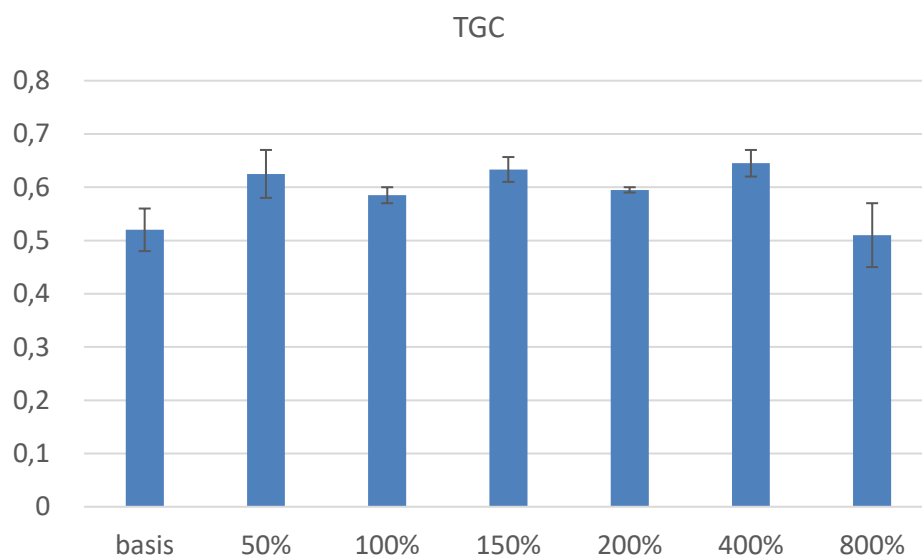
Statistikk

Forskjeller i spesifikk vekstrate (SGR), kondisjonsfaktor, dødelighet, samt kroppssammensetning av hovednæringsstoffer, vann og aske ble analysert med enveis ANOVA for å undersøke effekt av fôr. Siden mengde av de forskjellige mikronæringsstoffene ble tilpasset enkeltvis, kunne man ikke bruke prosentvis tilsetning av NP100 i regresjonsanalyse for disse parameterne. Signifikant effekt ble definert ved $p < 0,05$. Sammenhengen mellom vitamin eller mineralnivå i fôr og hel kropp ble beskrevet med lineære regresjoner. Brudd i lineær sammenheng ble analysert med «stykkedelt lineær regresjon med bruddpunkt» (Statistica 11 Statsoft).

4.3.2 Resultat

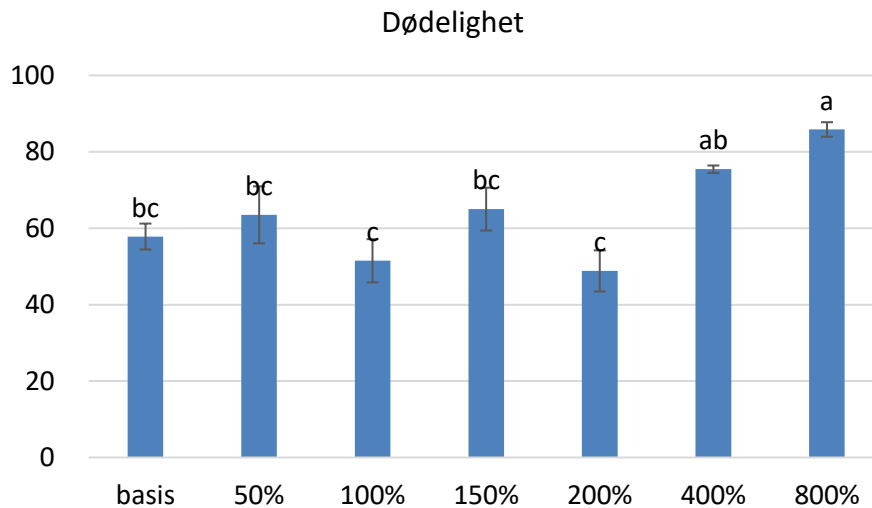
Vekst og dødelighet

Det var ingen statistisk sikre forskjeller i tilvekst mellom gruppene. Siden faktisk antall og dermed startvekt i hvert kar varierte, gir TGC (Figur 34) kanskje et bedre bilde av mønster i tilveksten enn SGR. Det er en tendens ($p=0.11$) til lavere TGC i gruppene som fikk Diett 1 og 7, altså både høyeste og laveste nivå av mikronæringsstoffer. Høy dødelighet kan ha påvirket vekstresultatene siden det stort sett var de minste fiskene som døde. Resultater fra forsøket er vist i Tabell 19.



Figur 34 TGC fra forsøksoppstart til slutt.

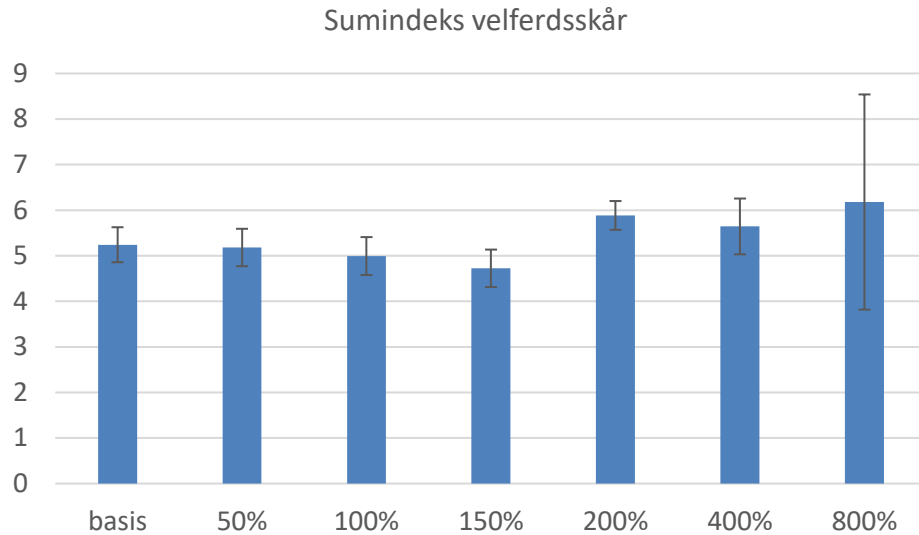
En stor andel av fisken døde i løpet av forsøket, med et gjennomsnitt på 64 % dødelighet totalt. I løpet av tilvenningsperioden på 27 dager var dødeligheten lik i alle diettgrupper. Under den 85 dager lange perioden med forskjellige forsøksfôr, utviklet dødeligheten seg forskjellig i de forskjellige gruppene, slik at total dødelighet (Figur 35) ble signifikant høyere i gruppen som fikk Diett 7 med høyest nivå av mikronæringsstoffer sammenlignet med gruppene med lavest dødelighet. Årsaken til den høye totale dødeligheten er ikke kjent, men ut fra registreringen på dødfisk så vi at det i hovedsak var den minste fisken som døde, og dette gjelder fisk ned til 0.32 g som trolig ikke har håndtert karmiljøet.



Figur 35 Total dødelighet i forsøksgrupper i løp av forsøket (27 + 85 dager).

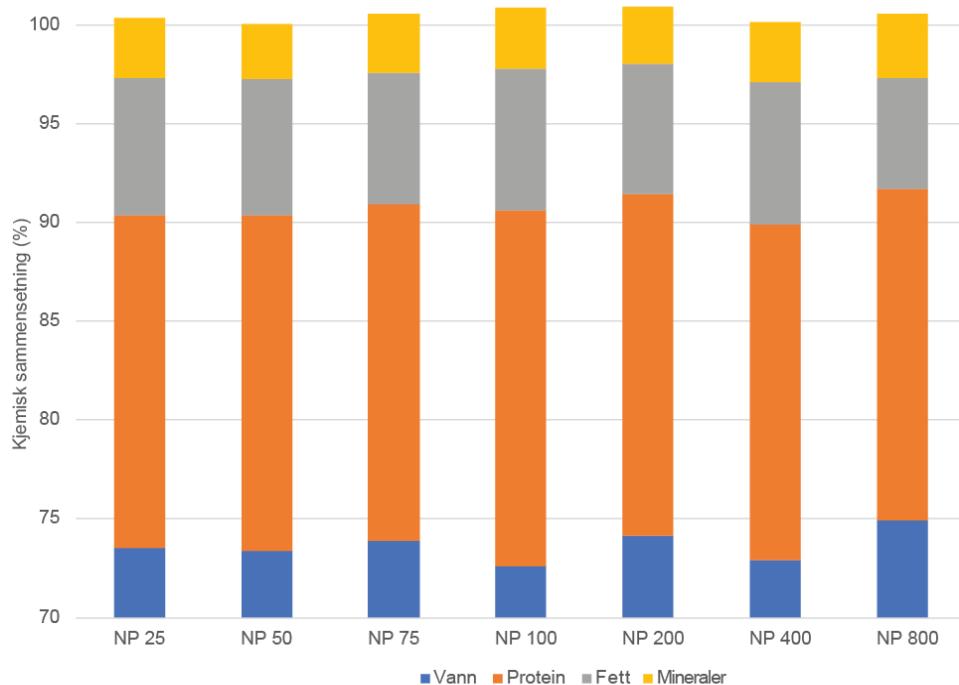
Kondisjonsfaktoren var også lik mellom behandlingene, men et av duplikatene gitt mest mineraler og vitaminer viste lav kondisjon.

Ytre velferdsskåring vise ingen effekt av forsøksfôr, bortsett fra avmagring, som ble observert i signifikant flere fisk fra gruppene med høyest tilsetning av mikronæringsstoffer. Figur 36 viser sum indeks velferdsskår i alle fôrgrupper.



Figur 36 Velferdsskår (sum indeks) i alle fôrgrupper.

Sammensetning av hovednæringsstoffer, vann og aske i hel fisk var også lik i alle gruppene. I motsetning til rognkjeks har berggyllt et vanninnhold mer lik andre fiskearter, dvs. $73,5 \pm 0,8 \%$. Den resterende fraksjonen besto av $17,2 \pm 0,4 \%$ protein, $6,7 \pm 0,5 \%$ fett og $3,1 \pm 0,3 \%$ mineraler (Figur 37).



Figur 37 Sammensetning (%) av hovednæringsstoffer, vann og aske i hel fisk i de forskjellige fôrgruppene.

Tabell 19 Vekt, k-faktor, tilvekst og dødelighet i alle fôrgrupper, alle restfisk ved slutt, og prøvefisk (10 pr kar).

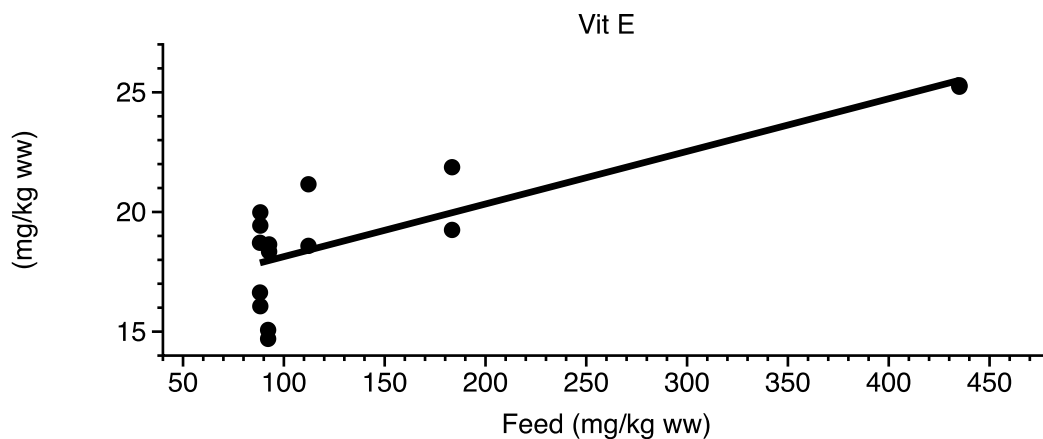
	Diett 1 Basisnivå	Diett 2 50 %	Diett 3 100 %	Diett 4 150 %	Diett 5 200 %	Diett 6 400 %	Diett 7 800 %	Enveis ANOVA p-verdi
All restfisk								
Vekt, slutt	15,3 ± 0,7	16,4 ± 1,2	18,6 ± 1,3	17,1 ± 0,8	16,5 ± 0,2	17,3 ± 2,6	14,2 ± 1,4	0,42
K-faktor	1,66 ± 0,03	1,69 ± 0,01	1,65 ± 0,02	1,69 ± 0,03	1,67 ± 0,01	1,70 ± 0,03	1,53 ± 0,08	0,14
SGR	1,15 ± 0,08	1,42 ± 0,18	1,22 ± 0,08	1,41 ± 0,10	1,30 ± 0,02	1,45 ± 0,03	1,15 ± 0,13	0,26
TGC	0,52 ± 0,04	0,63 ± 0,05	0,59 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,65 ± 0,03	0,51 ± 0,06	0,11
% døde	57,8 ± 3,4 ^{bc}	63,5 ± 7,5 ^{bc}	51,5 ± 5,7 ^c	65,0 ± 5,6 ^{bc}	48,8 ± 5,4 ^c	75,5 ± 1,0 ^{ab}	85,9 ± 1,9 ^a	0,01
Prøvefisk slutt								
Vekt	19,2 ± 0,3	21,0 ± 1,2	20,8 ± 1,4	22,1 ± 1,9	20,8 ± 1,7	20,2 ± 2,3	16,9 ± 2,8	0,59
K-faktor	1,71 ± 0,05	1,70 ± 0,003	1,65 ± 0,01	1,68 ± 0,05	1,67 ± 0,02	1,74 ± 0,001	1,58 ± 0,09	0,45
Leverindeks	2,15 ± 0,02	1,73 ± 0,03	1,70 ± 0,12	1,83 ± 0,21	1,71 ± 0,13	2,01 ± 0,19	2,09 ± 0,30	0,47

Estimerte behov for mikronæringsstoff

Bakgrunnen for estimat av mikronæringsstoffbehov, er at mange av vitaminene og mineralene akkumulerer i fisken opp til et visst nivå der vevet blir mettet og kurven flater ut. Siden vitaminer og mineraler som oftest er co-faktorer til enzymene i metabolismen, antar man at vevsmetning betyr at enzymene har full aktivitet og at metabolismen går uten hindringer. Hvis fisken får mer mikronæringsstoffer enn det som er behovet, skilles overskuddet ut. Det er først og fremst de vannløselige vitaminene og noen av mineralene som har disse egenskapene. De fettløselige vitaminene akkumulerer ofte i lineært forhold til innholdet i fôret og behovet kan derfor ikke alltid bestemmes med denne metoden (se vit E i figur 38).

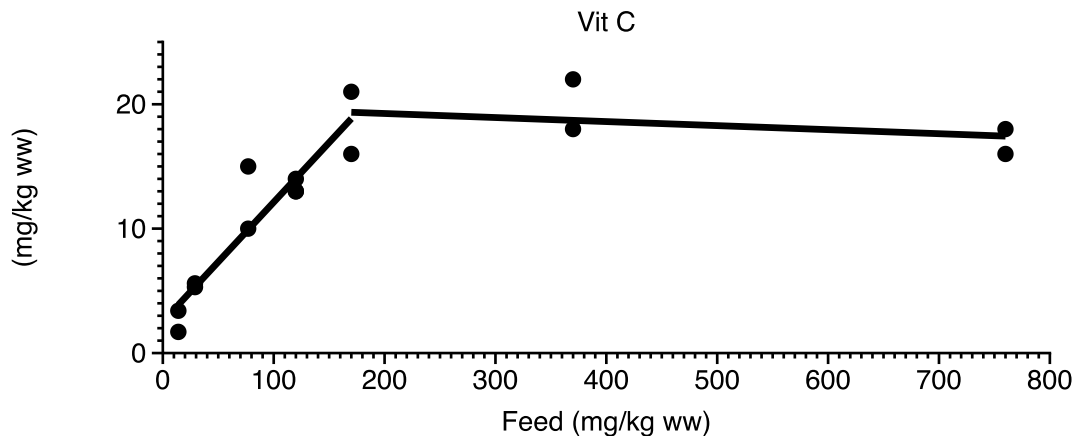
For mange av næringsstoffene ser man også en akkumulering når nivået blir mye høyere enn behovet og fisken ikke har kapasitet til å skille ut alt. Det er mulig at dette på sikt vil være toksisk for fisken. I dette prosjektet har vi gjort en screening og fått med mange mikronæringsstoffer i samme forsøk. Det har den fordelen at man får mye informasjon med relativt liten innsats, men det er på samme tid en ulempe at man ikke får informasjon om eventuelle samspillseffekter.

På grunn av at dødeligheten var høy, var det ikke nok fisk til å analysere vitaminene i lever og muskel. Det ble derfor besluttet å analysere mikronæringsstoffene i homogenat av hel fisk. For vitamin E som er fettløselighet så vi en akkumulering i fisken som korrelerte med innholdet i fôrene, men uten et definert brekkpunkt blir det vanskelig å anslå behovet. Vitamin A var allerede høyt i fôrråvarene og var derfor ikke med i forsøket. Vitamin D var under deteksjonsgrensen (< 0,01 mg/Kg) i homogenat av hel fisk. Bortsett fra vitamin E er de fettløselige vitaminene er derfor ikke presentert her.



Figur 38 Vitamin E er fettløselig og akkumulerer derfor i fisken i takt med økning i fôret.

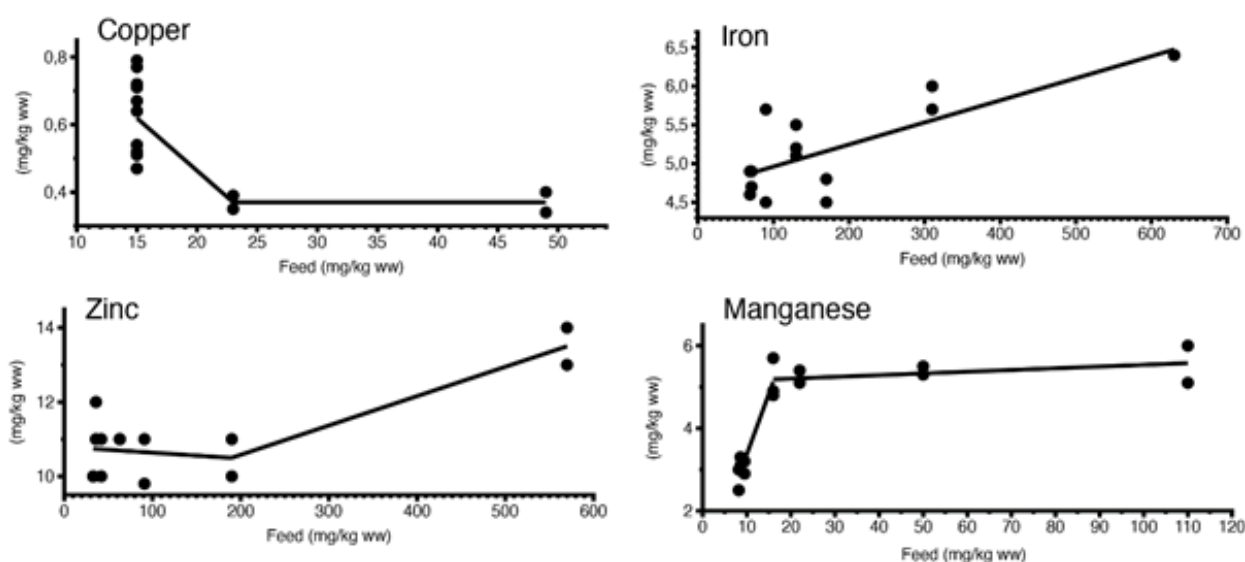
Det vannløselige vitamin C viste en akkumulering som korrelerer med innholdet i fôrene opp til 170 mg/Kg. Når vi tilsatte enda mer vitamin C i fôret regulerte fisken nivået til det samme som i gruppen som fikk 170 mg/Kg (Figur 39).



Figur 39 Vitamin C signifikant brekkpunkt ved 170 mg/gg. $R=0,94974$ Forklart variasjon: 90,2 %.

Noen av B-vitaminene var til stede i svært høye nivåer i fôringrediensene i forhold til kjente behov i laks og rognkjeks. For disse var det derfor ikke mulig å produsere fôr med en fornuftig gradient. Vi valgte derfor regresjoner med ulike nivåer av kobalamin, biotin og folat, og målte responsen i hel fisk. Nivåene var imidlertid lave, og variasjonen så stor at vi ikke fant signifikante brekkpunkt, noe som gjør det vanskelig å tolke resultatene. På grunn av dette har vi utelatt B-vitaminene fra denne presentasjonen.

Nivået av kobber i hel fisk var høyest hos fisk som fikk fôr som inneholdt 15 mg/kg. I fôrene med næringspakkene 400 og 800 % var sinknivåene så høye at kobberopptaket trolig ble blokkert (Figur 40). Sink begynte å akkumulere i vevet når fôrene inneholdt mer enn 190 mg/kg. Fordi et sinknivå på over 190 mg/kg blokkerte kobberopptaket anbefaler vi et sinknivå på maksimum 91 mg/kg noe som tilsvarer innholdet i fôret med 15 mg/kg kobber (Figur 40). Behovet for sink hos berggyllt ligger trolig under de laveste verdiene (33-40 mg/kg) som ble testet i dette forsøket. Det laveste nivået av jern i fôr som ble testet var 69 mg/kg. Ved høyere nivåer så det ut til at jern akkumulerer i fisken, men den store variasjonen i resultatene for fisk som fikk mellom 69 og 170 mg/kg jern i fôret, gjør figuren vanskelig å tolke. Mangan akkumulerte i økende grad opp til 16 mg/kg. Ved videre økning var fisken i stand til å skille ut mangan, eller ikke ta opp mer selv om nivået økte i fôret. Vi antar derfor behovet for mangan ligger rundt 16 mg/kg.



Figur 40 Forhold mellom mineralene kobber, jern, sink og mangan i fôr og homogenat av hel fisk.

I Tabell 20 har vi sammenlignet estimert behov for mineraler hos berggylt med generelle anbefalinger, laks og rognkjeks.

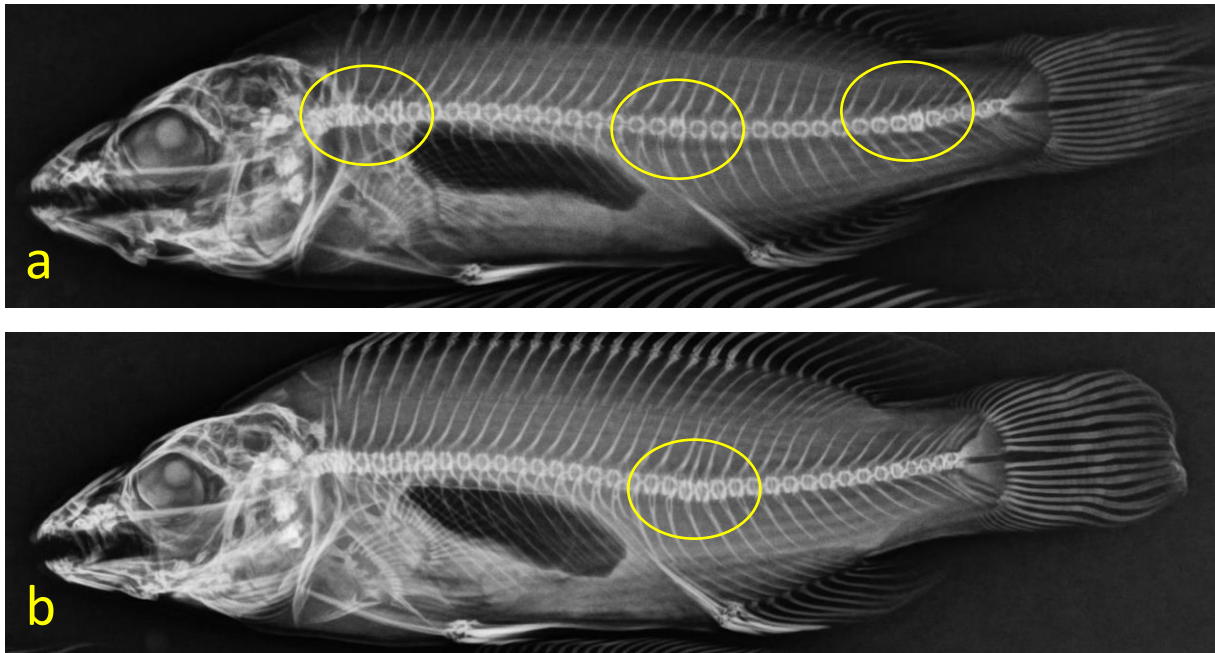
Tabell 20 Estimert behov for mineraler hos berggylt sammenlignet med i andre arter generelt (NRC 2011), estimater for laks fra EU-prosjektet ARRAINA (Prabhu, Lock et al. 2019) og rognkjeks (CleanFeed).

	Generelt (NRC 2011)	Laks (ARRAINA)	Rognkjeks Behov (CleanFeed)	Rognkjeks Maksnivå (CleanFeed)	Berggylt Behov	Berggylt Maksnivå
Kobber	3-5	13-14	>12	?	>15	?
Jern	150	150-166	<150	290	<91	630
Sink	20-30	140-177	160	?	<40	190
Mangan	13	<37	<21	31	16	110

Røntgenanalyser

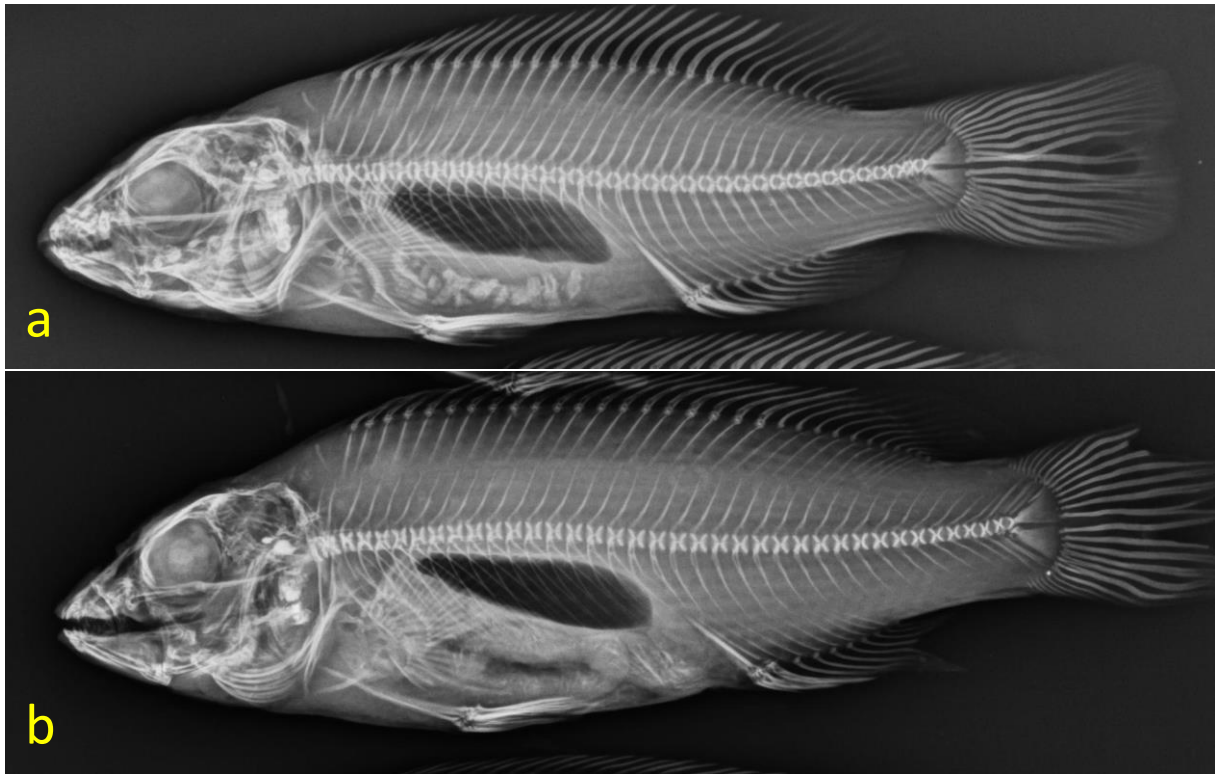
I startuttaket var det et tydelig innslag av misdannelser i ryggrad. Det ble funnet feil i 36 % av fisken, og det som dominerte var sammenvoksinger (fusjoner) i ulike stadier (30 % av fisken). De fleste fusjonene var lokalisert i fremre virvler i nakkeregionen (Figur 41 a). 3 fisk (9 %) hadde aksefeil, med en tydelig oppoverknekk i ryggraden omtrent ved gattet (lordose) (Figur 41 b). Det ble funnet en fisk (3 %) med misdannet underkjeve.

Fisken var ujevn i størrelse og modning. Det ble ikke funnet tegn til nedsatt mineralisering.

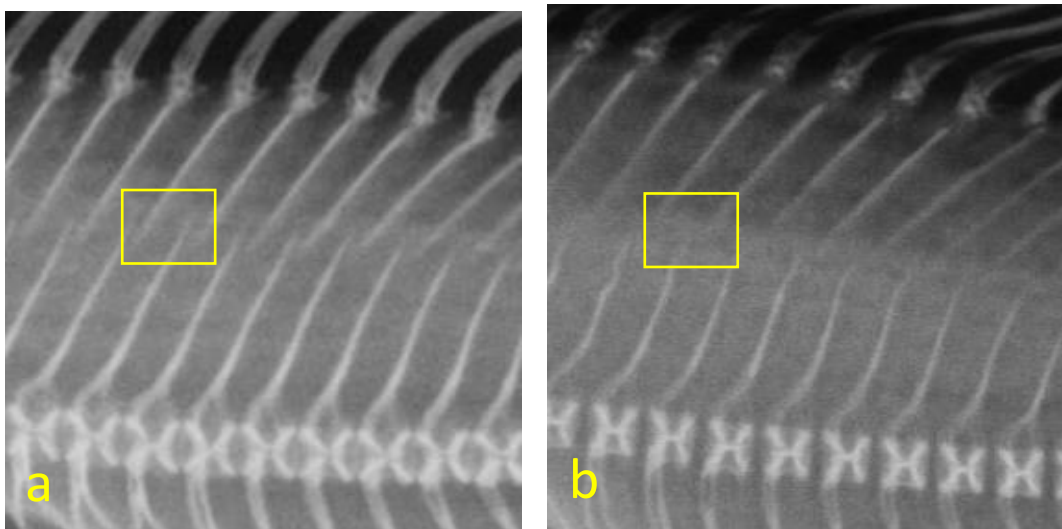


Figur 41 Fisk fra startuttaket. A) Fisk med flere fusjoner langs ryggraden. B) Fisk med tydelig avvik i akse omtrent ved gattet (lordose).

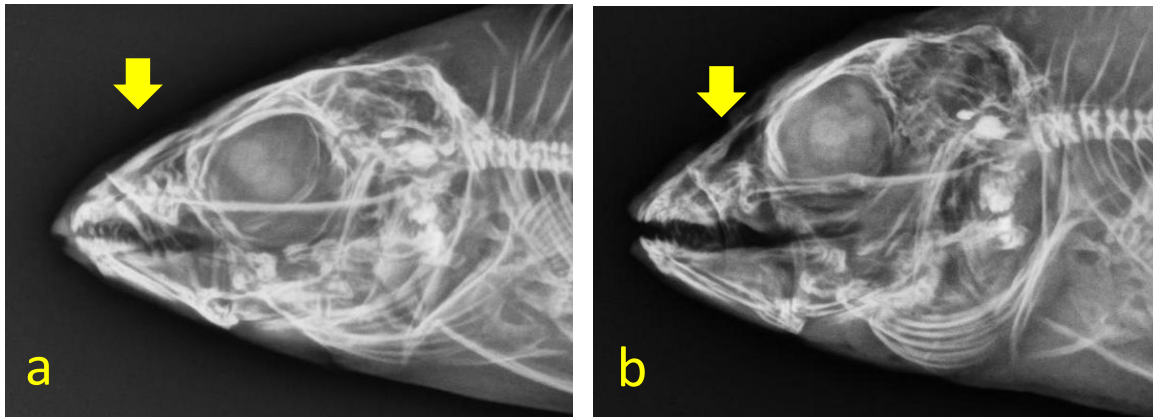
I sluttuttaket ble det registret en alvorlig grad av undermineralisering i alle forsøksfôrgruppene. Denne observasjonen ble bekreftet ved sammenlikning med fisken som hadde fått kommersielt fôr, som så normal ut (Figur 42, detaljer i Figur 43). Alvorlighetsgraden varierte, men det var knapt noe individ i forsøksfôrgruppene som ble bedømt som normalt mineralisert. Tegnene som ble registrert var generelt nedsatt kontrast, forøket avstand mellom virvler, uskarpt omriss av virvler og for korte, spinkle og delvis krøllede virvelstråler. Et tegn som var enkelt å registrere var mangel på overlapp mellom dorsale ende på virvelstrålene og ventrale ende på finnerotstrålene. I normalt mineralisert fisk skal de møtes og overlappe, i fisk med nedsatt mineralisering i dette forsøket var det avstand mellom disse (Figur 43). I tillegg ble det observert systematisk nedsatt mineralisering av knoklene i overkjeve/snute (Figur 44).



Figur 42 Normal mineralisert berggylt (a), sammenliknet med fisk med nedsatt mineralisering (b). Fisken i a) har fått kommersielt fôr, fisken i b) har fått forsøksfôr.



Figur 43 Detalj av fisk med normal mineralisering (a) og nedsatt mineralisering (b). Merk forskjell i form og avstand mellom virvler, og de spinkle korte og delvis unormale virvelstrålene. Mangel på overlapp mellom virvelstråler og finnerotstråler (sammenlikn firkantene) var også typisk.



Figur 44 Forskjell i mineralisering av bein i overkjeve/snute (pil). a) Normal mineralisering, b) nedsatt mineralisering.

I denne sammenhengen er det ikke gjort noen videre beskrivelse eller klassifisering av mineralmangelen. Røntgenfunnene likner mye på tilsvarende tilstand hos laks, og hos laks er årsaken som hovedregel å finne i en relativ mangel på tilgjengelig fosfor i fôret.

Øvrige misdannelser ble registrert, men observasjonene var usikre fordi de ble overskygget av mineralmangelen. Det var ingen tegn til variasjon mellom fôrgruppene, slik at forekomsten av andre misdannelser enn mineralmangel må tilskrives status i fiskegruppa før forsøksstart (jfr. startuttak).

4.3.3 Diskusjon

Dødeligheten var signifikant høyere i gruppen som fikk høyest innblanding av NP. Det var ingen statistisk sikre forskjeller mellom forsøksgruppene i vekst, vanninnhold eller sammensetning av hovednæringsstoffer. Forsøket hadde uvanlig høy dødelighet i alle behandlingene (64 %), inkludert det ekstra karet som gikk på kommersielt fôr (Otohime). I karet som fikk kommersielt fôr var dødeligheten 81,2 %, vi mener derfor at dødeligheten skyldes andre forhold enn ernæring. En forklaring kan være at fiskegruppen hadde en stor størrelsesspredning. De minste registrerte dødfisken hadde en vekt på 0,32 g. Det er sannsynlig at disse ikke har håndtert karmiljøet som var tilpasset fisk på mer enn 2 gram.

Riktig sammensetning av mikronæringsstoffer har liten betydning hvis fisken ikke liker smaken på fôret, og dermed har lavt fôropptak. Vi har i flere tidligere forsøk vist at rekemel er en viktig fôringrediens for å oppnå godt fôropptak hos berggylt (Hamre et al., 2013, Kousoulaki et al., 2021). Berggylt ser ikke ut til å like høye nivåer av fiskemel, av den grunn erstattes ofte fiskemel med torskemuskel. Fordi det brukes råstoffer av høy kvalitet til berggylt er nivåene av mange vitaminer, spesielt B vitaminer høye i fôrblandingene. Det ser derfor ut til at behovene for vitaminer ligger nær det som er funnet i laks, og at det ikke er behov for å tilsette mye ekstra vitaminer i fôret til berggylt. For vitamin C ble behovet nådd med NP 200 %, tilsvarende 170 mg/kg. Dette funnet ligger nært behovet hos laks, men langt under det vi tidligere fant for rognkjeks.

Enkelte mineraler er vanskelig tilgjengelig for berggylt, sannsynligvis på grunn av at den ikke har mage og dermed mangler et fordøyelsessystem med lav pH. Det er vist at ekstrudering av fôret ved relativt lav temperatur, dvs. under 100 °C øker opptaket av mineraler fra fôret sammenlignet med tradisjonell ekstrudering ved høyere temperatur (Kousoulaki et al., 2021). Fordi fiskemel i stor grad var erstattet med torskemuskel i dette forsøket var nivåene av flere mineraler relativt lave, noe som gjorde at vi kunne undersøke behovet for kobber og sink. Fordi det sannsynligvis er et sterkt samspill mellom

kobber og sink, foreslår vi praktiske tilsetningsnivåer i fôr for disse til henholdsvis 15 og 90 mg/kg. Maksimumsnivå for sink i fôret ser ut til å være ca. 90 mg/kg for å unngå blokkering av kobberopptaket og 190 mg/kg for å unngå akkumulering og toksiske nivå av sink i fisken. For mangan var det et klart knekkpunkt ved 16 mg/kg. Tabell 20 viser estimert behov for ulike mineraler hos berggylt.

Kvaliteten på fiskegruppen som ble brukt i forsøket var relativt dårlig. Det var svært stor variasjon i størrelse, og det var stor dødelighet blant den minste fisken som hadde en kroppsvekt ned mot 0,32 g ved oppstart av forsøket selv om snittvekten i gruppen var 4 gram. Selv om det var klare resultater for vitamin C og enkelte mineraler, er det helt klart behov for flere undersøkelser for å gi klare svar med hensyn til behov for ulike vitaminer og mineraler hos berggylt.

Konklusjoner

- Behov for vitamin C på ca. 170 mg/kg, noe som er nært behovet hos laks
- Vanskelig å anbefale behov for de fettløselige vitaminene
 - Vitamin E akkumulerte i vevet med økende mengde i fôret
 - Vitamin A var høyt i grunnresepten pga. råvarevalg
 - Vitamin D var ikke detekterbart i homogenat av hel fisk
- Behov for mangan på ca. 16 mg/kg
- På grunn av samspill mellom opptak av kobber og sink, foreslår vi praktiske tilsetningsnivåer i fôr på 15 mg/kg kobber og 90 mg/kg sink

4.4 Alternative råvarer i fôr til berggylt

Berggylt er kjent for å være en kresen fisk, og det er utfordrende å lage fôr som den faktisk vil spise. Det som har fungert best er fôr som inneholder dyre kvalitetsråvarer. Derfor var det et ønske om å teste bruk av gode, men mindre kostbare, alternative råvarer.

4.4.1 Materiale og metoder

Forsøksdesign og fôr

I dette forsøket testet vi muligheten for å bytte ut smaksattraktanten rekemel med krillmel, og proteinråvaren torskemuskemel med sammensatte ingredienser fra fjørfe i et 2x2 faktorielt design. De fire fôrtypene inneholdt da enten begge de opprinnelige råvarene, den ene i kombinasjon med alternativ råvare, eller begge byttet ut mot alternative råvarer. Hvert fôr ble gitt til fisk i to kar.

Sammensetning av forsøksfôr er vist i Tabell 21.

Fiskeforsøk

Berggylt til forsøket ble produsert av Havlandet Marin Yngel (HMY) i Florø. Fisken ble transportert til Tjeldbergodden for påvekst. Kort tid etter ble forsøksfisken transportert fra Tjeldbergodden til Sunndalsøra med tankbil. Fisken ble satt direkte i forsøkskar ved ankomst til stasjonen, og fikk deretter samme kommersielle fôr (Otohime C2) som tidligere. Ved ankomst var fisken i snitt 25,8 gram. Etter 37 dager tilvenning ble antall fisk standardisert til 90 fisk pr kar, og det ble startet med forsøksfôr. Gjennomsnittsvekt for forsøksfisk ved start var 30,2 gram. Det ble satt ut fisk i 8 forsøkskar, i tillegg ble ett kontrollkar holdt videre med kommersielt fôr (Skretting 1,5mm).

Forsøkskarene var 150 liters grå kar, runde (d=50cm) med kon bunn, dekket av et gjennomsiktig lokk med åpning for fôring. Alle kar hadde belteautomater for utfôring, og et separat lyspunkt (konstant lys 24 timer) for hvert kar, plassert på lokket. Vann inn i karene ble filtrert til 10 µm og UV-behandlet. Gjennomsnittlig vanntemperatur var 15,1 °C (14,8-15,4 °C), vanngjennomstrømming på 5 l/minutt og oksygenmetning på 80-100 %.

Forsøket ble avsluttet etter 97 dager med veging av all fisk, og registrering av ytre velferdsskår på 25 fisk pr kar. Det ble gjort uttak av 6 fisk pr kar for registrering av vekt, lengde, og levervekt. Vektene ble benyttet til å beregne K-faktor og leverindeks (levervekt i % av rundvekt), og det ble gjort en visuell vurdering av mengde innvolls fett. Det ble tatt blodprøver for analyser av serum. I tillegg ble det forsøkt å stryke gjødsel fra all fisk unntatt prøvefisken, for å bestemme fordøyelighet av næringsstoffer. En stor andel av fisken var uten innhold i baktarmen, men hos fisk med innhold i baktarmen var det greit å stryke og samle opp innholdet til tross for at det var veldig tyntflytende. Dessverre ble prøvene av tarminnhold totalt sett for små til å kunne analysere innhold av markør og næringsstoffer.

Analyser og beregninger

Ytre velferdsskåring ble gjort på 25 fisk i hvert kar, etter metode som beskrevet av (Noble, Iversen et al. 2019).

Alle egenskaper ble skåret på en skala fra 0 til 3. Data fra velferdsskåring ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere

gjennomsnittsverdiene til en sumindeks pr kar. Sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer pr kar.

Mengde innvolls fett i prøvefisk ble gradert visuelt på en skala fra 0 (ikke fett) til 4 (Mye fett).

Data fra forsøket ble analysert med 2x2 faktoriell variansanalyse, for å undersøke effekt av å bytte ut rekemel eller torskemuskel, og om det eventuelt var samspill mellom faktorene. Statistisk analyse ble utført i SAS 9.4.

Tabell 21 Fôrsammensetning råvarer berggylt.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4
Rekemel	28,00	.	28,00	.
Torskemuskel	32,00	32,00	.	.
GePro Fjørnfemel	.	.	16,00	16,00
Krill hydrolysat	6,60	6,60	6,60	6,60
Krillmel	.	39,00	.	39,00
GePro AquaTrac	.	.	4,00	4,00
GePro fjørmel	.	.	12,00	12,00
Krillolje	4,50	.	4,50	.
Rapslecithin (tørr)	2,00	2,00	.	.
Hvetegluten	15,64	7,19	19,04	10,49
Tapioka	7,00	9,40	4,50	7,00
Biomas	0,50	0,50	0,50	0,50
Kolesterol	0,20	0,20	0,20	0,20
Cholin klorid	0,50	0,50	0,50	0,50
Tau+Lys	0,52	0,52	0,52	0,52
Stay-C	0,23	0,23	0,23	0,23
Vitaminmiks	0,50	0,50	0,50	0,50
Mineralmiks, organisk	0,50	0,50	0,50	0,50
Monosodiumfosfat	1,30	1,10	1,80	1,60
Yttrium	0,01	0,01	0,01	0,01
Kjemisk innhold (%)				
Tørrstoff	90,9	91,0	90,6	90,2
Fett	10,8	10,0	11,8	10,6
Protein	62,6	61,3	62,2	60,5
Stivelse	7,7	8,8	6,0	7,1

4.4.2 Resultat og vurdering

Det var ingen signifikant forskjell i dødelighet mellom forsøksgruppene, siden karvariasjonen var betydelig i alle grupper. Dødelighet i gruppen med både reke og torsk i fôret var i gjennomsnitt 1,7 %, mens gruppen der begge var byttet ut hadde en gjennomsnittlig dødelighet på 13,9 %. De to gruppene der en av råvarene var byttet ut lå midt mellom, så det var en tydelig trend.

Tabell 22 viser sluttvekter, tilvekst, dødelighet for alle fisk ved slutt, og slakteregistreringer for prøvefisk. Det var signifikant effekt av diett på sluttvekt og tilvekst, og bruk av torskemuskel var den viktigste faktoren, den forklarte nærmere 70 % av totalvariasjonen i tilvekst. Veksten ble mer redusert ved å bytte ut torskemuskel med fjørfe enn ved å bytte ut rekemel med krill. Dette kan tyde på at det lavere bidraget av enkelte aminosyrer og lipidstrukturer fra fjørfeproduktene kan ha forårsaket disse forskjellene, mens krill har en nærmere beslektet næringssammensetning med reke. Lavest tilvekst var observert når begge råvarene ble byttet ut.

I alle prøvefisk gjorde vi en visuell vurdering av mengde innvollsfett, og gruppen der både torsk og reke var byttet ut, hadde signifikant lavere nivå av innvollsfett enn de andre gruppene. Denne gruppen hadde også lavest vekst. Dette tyder på at denne gruppen har hatt lavere fôrintak og/eller dårligere utnyttelse av fôret, slik at fisken ikke har klart å bygge opp energireserver.

Serumanalysene (Tabell 23) ga ingen signifikante forskjeller mellom dietter, men torskemuskel var den faktoren som i størst grad påvirket serumverdiene, spesielt ALAT, men også ASAT og triglyserider (TAG). Det var også interessant å se at det var en positiv korrelasjon mellom TAG, og leverindeks og andre blodparametere, som vist i Tabell 24. Det var altså en viss sammenheng mellom høy leverindeks og høyt nivå av TAG i blod, men ikke veldig sterk korrelasjon. Men når det var høye verdier av TAG i blod, var det også stor sannsynlighet for høyere verdier av ALAT, ASAT, kolesterol og laktat. Når vi så på gjennomsnittsverdier per kar var det en positiv korrelasjon mellom tilvekst (SGR) og kolesterol, som er også vanlig hos laks og indikerer høyere fett/energi-transport/utnyttelse.

Tabell 22 Vekst og dødelighet alle fisk, og vekt, k-faktor og organindekser i prøvefisk.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	ANOVA	Faktoriell analyse				
	Reke	Krill	Reke	Krill		p-verdi	R ²	% av variasjon forklart av:		
	Torsk	Torsk	Fjørfe	Fjørfe				Reke	Torsk	Samspill
Vekt, start	30,2 ± 0,2	29,7 ± 0,4	30,4 ± 0	30,2 ± 0,2	0,33					
Vekt, slutt	70,7 ± 0,5 ^a	65,2 ± 0,8 ^b	62,0 ± 1,0 ^c	52,3 ± 0,9 ^d	0,0004	0,99	31,6	64,6	2,4	
SGR	0,88 ± 0,02 ^a	0,81 ± 0 ^b	0,73 ± 0,02 ^c	0,57 ± 0,02 ^d	0,0009	0,98	24,3	69,8	3,7	
TGC	0,70 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,01 ^b	0,57 ± 0,02 ^c	0,43 ± 0,02 ^d	0,001	0,98	25,7	68,6	3,4	
% døde	1,7 ± 1,7	7,1 ± 4,9	6,7 ± 3,4	13,9 ± 0,6	0,19	0,66	34,9	30,6	0,6	
Prøvefisk										
Vekt, slutt	93,6 ± 5,4	91,2 ± 3,9	84,3 ± 3,2	62,9 ± 3,9	0,11	0,75				
K-faktor	1,99 ± 0,04	1,90 ± 0,03	1,89 ± 0,03	1,85 ± 0,06	0,34	0,53				
Leverindeks	1,70 ± 0,09	2,01 ± 0,14	1,92 ± 0,19	1,56 ± 0,14	0,47	0,44				
Innvollsfett	2,8 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	1,58 ± 0,26 ^b	0,02	0,89	8,9	48,4	31,7	

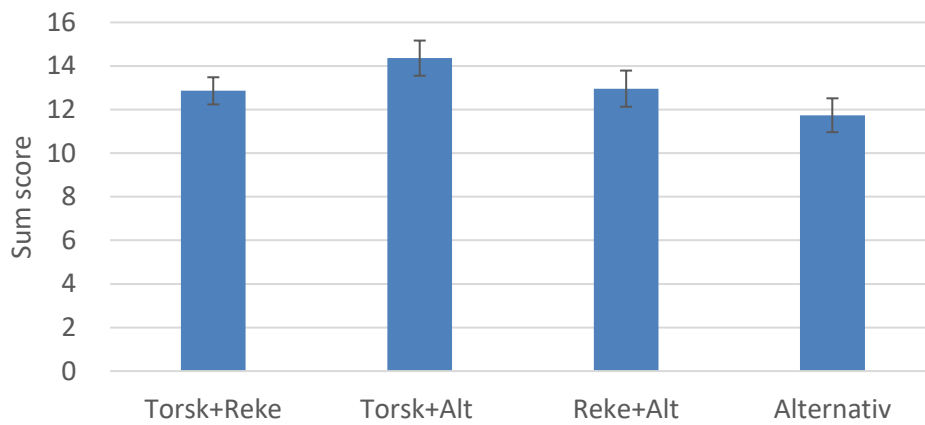
Tabell 23 Serumanalyser.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	ANOVA	Faktoriell analyse			
	Reke	Krill	Reke	Krill	p-verdi	R-square	% av variasjon forklart av:		
	Torsk	Torsk	Fjørfe	Fjørfe			Reke	Torsk	Samspill
ALAT	26,7 ± 14,7	42,0 ± 4,4	10,6 ± 4,6	9,6 ± 4,0	0,13	0,72	5,2	60,1	6,8
ASAT	32,7 ± 17,1	38,6 ± 18,4	12,4 ± 9,6	9,1 ± 0,8	0,42	0,47	0,1	45,4	1,5
Kolesterol	6,7 ± 1,0	6,9 ± 0,6	6,3 ± 0,3	4,9 ± 0,3	0,27	0,59	8,5	35,3	15,5
Glukose	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,03	1,7 ± 0,03	1,9 ± 0,3	0,69	0,28	11,5	13,3	3,5
Laktat	1,8 ± 0,04	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,33	0,54	3,2	35,1	15,4
TAG	17,0 ± 1,6	22,3 ± 3,6	16,1 ± 0,8	13,2 ± 0,6	0,13	0,72	2,4	41,9	28,0

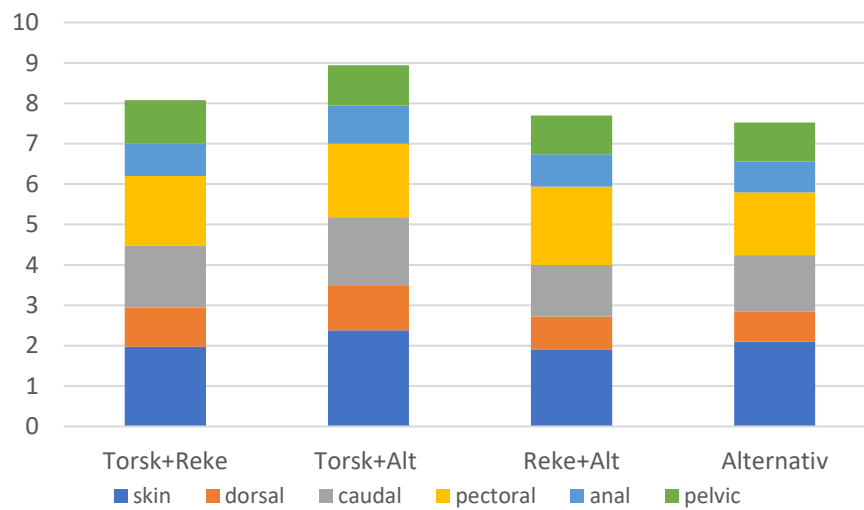
Tabell 24 Korrelasjoner mellom triglyserider i blod og leverindeks og andre blodparametere.

		korrelasjon	p-verdi
TAG	HSI	0,57	<0,0001
	ALAT	0,66	<0,0001
	ASAT	0,71	<0,0001
	Kolesterol	0,75	<0,0001
	Laktat	0,76	<0,0001
SGR	Kolesterol	0,73	0,04

Velferdsskår viste ingen signifikante forskjeller mellom grupper. Total sum indeks er vist i Figur 45. Mesteparten av summen kom fra skader på skinn eller finner, fordelingen er vist i Figur 46.



Figur 45 Velferdsscore sumindeks.



Figur 46 Velferdsscore sum indeks, fordelt på skinn og finnetyper, gjennomsnitt innen hver gruppe.

Gruppen der både torskemuskel- og rekemel var byttet ut hadde både lavere tilvekst, tendens til høyere dødelighet, og mindre energilager i form av innvollsfett. Tydeligst effekt hadde man av å bytte ut torskemuskel med kyllingprodukter. Torskemuskel var også den faktoren som påvirket serumanalysene mest, selv om ingen effekter var signifikante. Korrelasjonsanalyser viser noen mulige sammenhenger som kan være interessante; en viss sammenheng mellom høy leverindeks og høyt nivå av TAG i blod, og når det var høye verdier av TAG i blod, var det også større sannsynlighet for høyere verdier av ALAT, ASAT, kolesterol og laktat.

Konklusjon

Det ser ut til at det er næringskomponenter i både rekemel og torskemuskel som ikke kan erstattes av krill og fjørfeprodukter alene. Vi vet ikke om dette går på smakelighet og fôrinntak, eller fordøyelighet og fôrutnyttelse.

5 Oppnådde resultater

Tidligere studier indikerer at måten fôret produseres på påvirker utviklingen hos berggytlarver. I dette prosjektet viste vi at bruk av standard ekstrudert fôr (høy prosesstemperatur) i weaning av berggytlarver påvirket opptaket av viktige mineraler som fosfor og kalsium, noe som resulterer i alvorlige skjelettdeformiteter og dårlig mineralisering. Vi fant at prosessering av fôret ved lavere temperatur, som agglomerering eller kaldekstrudering, ga bedre mineralisering og mindre deformiteter hos berggytlarver sammenlignet med tradisjonell ekstrudering.

Hos større berggylt (11-35 g) ga standard ekstrudert fôr økt dødelighet sammenlignet med agglomerert eller kaldekstrudert fôr. Standard ekstrudert fôr ga også større lever og noe økt TAG i serum. Aktiviteten av fordøyelsesenzymene LAP og maltase økte også, noe som trolig er en kompensasjon for en antatt redusert tilgjengelighet av protein og karbohydrat ved bruk av standard ekstrudert pellet.

Basert på våre resultater anbefaler vi bruk av agglomerert eller kaldekstrudert fôr til alle livsstadier hos berggylt. Stivelse i fôret bør være pre-gelatinisert for å øke fordøyeligheten. Kaldekstrudering kan utføres med samme tekniske utstyr som benyttes til produksjon av standard ekstrudert fôr i kommersiell skala.

Dersom man ønsker å øke nivået av fett eller fosfolipider i fôr til berggylt, bør økningen skje i form av marine fosfolipider. Økning av vegetabilsk fosfolipid ga redusert tilvekst og en tendens til høyere grad av betennelsesreaksjoner i tarmen. Dietter med høyt fettinnhold og høy andel marine fosfolipider ga bedre vekst hos berggylt, delvis i form av fett i muskelvev og lever. Økt fosfolipidnivå så også ut til å gi bedre tarmhelse. Økt innhold av marint fosfolipid i fôret kan muligens brukes som en strategi for å øke energireservene og velferdsstatusen hos berggylt i forkant av vintermånedene.

Nivåene av mange vitaminer, spesielt B-vitaminer, er ofte høye i berggyltfôr fordi fiskemel erstattes med torskemuskel. Dette gjøres fordi berggylt ikke ser ut til å like høye nivåer av fiskemel. Fordi det brukes råvarer av høy kvalitet er lite behov for å tilsette ekstra vannløselige vitaminer, med unntak av vitamin C. For vitamin C ble behovet nådd med 170 mg/kg. Dette er nært behovet hos laks, men langt under det vi fant for rognkjeks.

Enkelte mineraler er lite tilgjengelige for berggylt, trolig fordi den ikke har mage, og dermed mangler et innledende fordøyelsestrinn med lav pH. Fordi det sannsynligvis er et sterkt samspill mellom kobber og sink, foreslår vi praktiske tilsetningsnivåer i fôr for disse til henholdsvis 15 og 90 mg/kg. Maksimumsnivå for sink i fôret ser ut til å være ca. 90 mg/kg for å unngå blokkering av kobberopptaket, og 190 mg/kg for å unngå akkumulering og toksiske nivå av sink i fisken. For mangan var det et klart knekkpunkt ved 16 mg/kg. Det er likevel behov for flere undersøkelser for å kunne gi klare svar med hensyn til behov for ulike vitaminer og mineraler hos berggylt.

Krill og fjørfeprodukter kan være aktuelle råvarer som kan redusere innblandingen av torskemuskel- og rekemel i fôr til berggylt. Total utbytting av disse ingrediensene i fôr til berggylt på 30-70 g ga redusert overlevelse og signifikant lavere vekst. Videre optimalisering av innblandingsnivå og tilsetning av enkelte næringskomponenter må derfor testes for å finne en kombinasjon som kan erstatte dagens standard.

6 Hovedfunn

- Berggylt bør ha fôr som er prosessert ved lave temperaturer (agglomerering eller kaldekstrudering) for sterkere skjelett og mindre deformiteter. Gir også lavere dødelighet hos berggyltyngel.
- Fettnivå i fôr over 12 % bør være i form av marine fosfolipider.
- 20 % fettinnhold i fôr med høy andel marine fosfolipider (40 %) ga økt vekt, delvis som fett i muskel og lever, samt bedre tarmhelse.
- Økt innhold av marine fosfolipider i fôret kan muligens brukes som en strategi for å øke energireservene og velferdsstatusen hos berggylt i forkant av vintermånedene.
- Fôr med marine ingredienser av høy kvalitet dekker behovet for de fleste vannløselige vitaminer, med unntak av vitamin C. Behovet for vitamin C dekkes ved 170 mg/kg tørt fôr.
- Samspill mellom kobber og sink gjør at vi foreslår tilsetning på henholdsvis 15 og 90 mg/kg.
- For mangan anbefales opp til 16 mg/kg. Flere undersøkelser må til for å gi klare svar på behov for ulike vitaminer og mineraler hos berggylt.
- Krill og fjørfeprodukter er aktuelle råvarer som kan redusere innblandingen av kostbart torskemuskel- og rekemel i fôr til berggylt. Total utbytting av disse ingrediensene i fôr til berggylt på 30-70 g ga redusert overlevelse og signifikant lavere vekst. Innblandingsnivå og tilsetning av enkeltkomponenter må optimaliseres for å finne en kombinasjon som kan erstatte dagens standard.

7 Leveranser

Tabell 25 Leveranser i løpet av prosjektperioden

Tid	Leveranse
Juni 2017	Oppslag nofima.no Info om prosjektet
2017-2021	Statusrapporter til FHF som avtalt
Mars 2018	FHF Dialogmøte rensefisk, Bergen
Mars 2018	Rensefisknytt
Juni 2019	Faktaark AP1, prosessmetode for fôr til berggylt
May 2019	Wrasse workshop University of Stirling, Skottland, presentasjon av prosjektet
Oktober 2019	Abstract AP2 innsendt og godkjent, EAS ikke gjennomført pga. korona 2020
Februar 2021	Nyhets sak Nofima
Mars 2021	FHF Digitalt dialogmøte berggylt
April 2021	Vitenskapelig artikkel AP2 sendt Aquaculture Nutrition, akseptert med endringer
Mars 2021	Vitenskapelig artikkel AP1 publisert i Animal Feed Science and Technology 2021
Mars 2021	Faktaark AP2, hovenæringsstoff til rognkjeks
Mars 2021	Faktaark AP3, mikronæringsstoff rognkjeks
Mai 2021	International Ballan Wrasse Conference (SAIC), presentasjon AP1 Fôrteknologi
September 2021	FHF Sluttrapporter

Foredrag

Lein, I., Berge, G.M., Hamre, K., Remø, S., Kortner, T., Krogdahl, Å., Kousoulaki, K., Bogevig, A.S., Sæle, Ø., 2018. Presentasjon av CleanFeed med foreløpige resultater. FHF Dialogmøte, Bergen, 13. mars 2018.

Lein, I., 2019. Production of ballan wrasse – the most efficient cleanerfish. Cleaner Fish Workshop, University of Stirling, Skottland. 22-23. Mai 2019.

Berge, G.M., 2019. Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks. Det norske fiskeernæringsseminaret 2019, Bergen, 13.-14. november 2019.

Lein, I., Berge, G.M., Kousoulaki, K., Sæle, Ø., Hamre, K., Remø, S., 2019. Presentasjon på Kielferga? Ernæringskrav hos rensefisk. Foredrag på Skretting-seminar på Kielferga, 6. november 2019.

Lein, I., Berge, G.M., Hamre, K., Kortner, T., Krogdahl, Å., Sæle, Ø., 2021. Produksjon av fôr og fôrråstoff til berggylt. FHF Produksjon av berggylt. 11. mars 2021. Webinar.

Kousoulaki, K., 2021. The importance of feed technical quality in Ballan wrasse weaning performance. International Ballan Wrasse Conference, 27. Mai 2021. Arrangert av SAIC og Univ. Stirling, Skottland. Digital konferanse.

Hamre, K., Berge, G.M., Sæle, Ø., Holen, E., Kousoulaki, K., Remø, S.C., Krogdahl, Å., Lein, I., 2021. Balansert sammensetning av makronæringsstoffer i fôr til rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*). Det norske fiskeernæringsseminaret 2021. Kløfta, 9.-10. november 2021.

Kousoulaki, Grøtan, E., Kortner, T.M., Berge, G.M., Haustveit, G., Krogdahl, Å., Nygaard, H., Sæle, Ø., Chikwati, E.M., Lein, I. Betydning av fôrets tekniske kvalitet for oppdrettsberggylt. Det norske fiskeernæringsseminaret 2021. Kløfta, 9.-10. november 2021.

Zhou, W., Krogdahl, Å., Chikwati, E., Lein, I., Berge, G.M., Kousoulaki, K., Kortner, T.M., 2021. Nutrient digestibility in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). Det norske fiskeernæringsseminaret 2021. Kløfta, 9.-10. november 2021.

Faktaark

Faktaark AP1: Beskriver hvordan en reduksjon av temperaturen under ekstrudering av fôr til berggylt påvirker overlevelse, opptak av mineraler og utvikling av skjelettdeformiteter.

Faktaark AP2: Beskriver behov for ulike hovednæringsstoffer og tarmfunksjoner hos rognkjeks, og effekt av fôr på immunsystemet

Faktaark AP3: Beskriver forsøk med ulik tilsetning av vitaminer og mineraler i fôr til rognkjeks, og hvordan dette påvirker prestasjon.

Publisering

Kousoulaki, K., Grøtan, E., Kortner, T.M., Berge, G.M., Haustveit, G., Krogdahl, Å., Nygaard, H., Sæle, Ø., Chikwati, E.M., Lein, I., 2021. Technical feed quality influences health, digestion patterns, body mineralization and bone development in farming of the stomachless cleanerfish ballan wrasse (*Labrus berggylta*). *Animal Feed Science and Technology* 274 (2021) 114830. Open access.

Hamre, K., Berge, G.M., Sæle, Ø., Holen, E., Kousoulaki, K., Remø, S.C., Krogdahl, Å., Lein, I. Macronutrient balance in diets for lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture nutrition*. Akseptert.

Zhou, W., Kortner, T.M., Chikwati, E., Hamre, K., Kousoulaki, K., Lein, I., Berge, G.M., Sæle, Ø., Krogdahl, Å. Gut functions in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) respond to variation in diet macronutrient composition. Manuskript.

Kousoulaki, K., Lein, I., Sæle, Ø., Kortner, T., Krogdahl, Å., Hamre, K., Berge, G.M. High energy, and lipid diets for ballan wrasse can be effective using high levels of marine but not plant based phospholipids.(Manuskript.

Oppslag i media

Norsk:

<https://nofima.no/nyhet/2021/02/en-type-for-ma-unngas-i-berggyltoppdrett-for-a-unngamisdannelser/>

Engelsk:

<https://nofima.no/en/nyhet/2021/02/farmed-ballan-wrasse-must-not-be-given-this-type-of-feed/>

8 Referanser

Caballero-Solares, A., et al. (2018). "Changes in the liver transcriptome of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed experimental diets based on terrestrial alternatives to fish meal and fish oil." BMC genomics 19(1): 1-26.

CEN (1999). Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography - Measurement of cholecalciferol (D3) and ergocalciferol (D2). . EN 12821, (CEN, Comité Européen de Normalisation)

CEN (2003). Foodstuffs – Determination of vitamin K1 by HPLC. . EN 14148 (CEN, Comité Européen de Normalisation).

Hamre, K. (2011). "Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish." Aquaculture Nutrition 17(1): 98-115.

Hamre, K., et al. (2013). "A holistic approach to development of diets for Ballan wrasse (*Labrus bergylta*)—a new species in aquaculture." PeerJ 1: e99.

Hansen, A. K. G., et al. (2020). "Choline supplementation prevents diet induced gut mucosa lipid accumulation in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." BMC veterinary research 16(1): 32.

Julshamn, K., et al. (2004). "Norwegian monitoring programme on the inorganic and organic contaminants in fish caught in the Barents Sea, Norwegian Sea and North Sea, 1994–2001." Food additives and contaminants 21(4): 365-376.

Kortner, T. M., et al. (2016). "Bile components and lecithin supplemented to plant based diets do not diminish diet related intestinal inflammation in Atlantic salmon." BMC veterinary research 12(1): 1-12.

Kousoulaki, K., et al. (2015). "Marine raw material choice, quality and weaning performance of Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae." Aquaculture Nutrition 21(5): 644-654.

Kousoulaki, K., et al. (2021). "Technical feed quality influences health, digestion patterns, body mineralization and bone development in farming of the stomachless cleaner fish ballan wrasse (*Labrus bergylta*)." Animal Feed Science and Technology 274: 114830.

Kousoulaki, K., et al. (2018). "Cleaner fish species nutrition and feeding practices." Cleaner fish biology and aquaculture applications. Treasurer JW (ed.). 5M Publications. Sheffield: 179-196.

Krogdahl, Å. and A. M. Bakke-McKellep (2005). "Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 141(4): 450-460.

Krogdahl, Å., et al. (2020). "Removal of three proteinaceous antinutrients from soybean does not mitigate soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.)." Aquaculture 514: 734495.

Krogdahl, Å., et al. (2014). "Characteristics of the digestive functions in ballan wrasse fed dry and moist diets." BALLAN WRASSE: 74.

Le, H. T., et al. (2019). "Intestinal function of the stomachless fish, ballan wrasse (*Labrus bergylta*)." Frontiers in Marine Science 6: 140.

Li, Y., et al. (2020). "Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*)."
Aquaculture 520: 734967.

Li, Y., et al. (2019). "Gut health and vaccination response in pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal."
Fish & shellfish immunology 86: 1106-1113.

Lie, K. K., et al. (2018). "Loss of stomach, loss of appetite? Sequencing of the ballan wrasse (*Labrus bergylta*) genome and intestinal transcriptomic profiling illuminate the evolution of loss of stomach function in fish."
BMC genomics 19(1): 1-17.

Moren, M., et al. (2004). "An optimum level of vitamin A supplements for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles."
Aquaculture 235(1-4): 587-599.

Mæland, A., et al. (2000). "Water-soluble vitamins in natural plankton (copepods) during two consecutive spring blooms compared to vitamins in *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii."
Marine Biology 136(5): 765-772.

Mæland, A. and R. Waagbø (1998). "Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid."
Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 121(3): 249-255.

Noble, C., et al. (2019). "RENSVEL OWI FACT SHEET SERIES: An introduction to Operational and Laboratory-based Welfare Indicators for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.)."

NRC (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*, National academies press.

Prabhu, P. A. J., et al. (2019). "Recommendations for dietary level of micro-minerals and vitamin D3 to Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt when fed low fish meal diets."
PeerJ 7: e6996.

Švarc, P. L., et al. (2020). "Collaborative study: Quantification of total folate in food using an efficient single-enzyme extraction combined with LC-MS/MS."
Food chemistry 333: 127447.

Vedlegg

Tabell A Fettsyreprofil i nøytrallipidfraksjonen i lever.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8	SEM
Lipidnivå i fôr (%)	12	12	20	20	12	12	20	20	
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar	
PL nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50	
NL i Lever g/kg	112,8	95,73	130,6	136,2	178,7	140,9	140,6	200,8	9,473
Lever NL 14:0 %	2	1,85	1,45	1,7	2,05	3,35	2,7	3,9	0,216
Lever NL 15:0 %	0,2	0,3	0,2	0,25	0,2	0,3	0,2	0,35	0,016
Lever NL 16:0 %	12,5	13,4	6,75	8,6	12,15	17,45	9	13,55	0,846
Lever NL 17:0 %	0,2	0,25	0,2	0,2	0,3	0,5	0,3	0,45	0,029
Lever NL 18:0 %	2,8	2,85	1,6	1,9	3,1	3,65	2,3	2,65	0,162
Lever NL 20:0 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4E-18
Lever NL 22:0 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,009
Lever NL Sum mettet %	17,9	18,7	10,35	12,85	18	25,25	14,7	21,05	1,149
Lever NL 14:1n-9 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,011
Lever NL 16:1n-9 %	0,7	0,75	0,7	0,6	0,7	0,75	0,6	0,6	0,019
Lever NL 16:1n-7 %	5	5,7	2,9	3,35	5,45	8,75	4	6,6	0,462
Lever NL 18:1n-11 %	0,15	0,2	0,1	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	0,011
Lever NL 18:1n-9 %	32,2	26,95	40,05	36,25	32,25	24,95	38,05	27,7	1,343
Lever NL 18:1n-7 %	4,45	4,45	3,9	3,95	4,65	5,75	4,6	5,35	0,158
Lever NL 20:1n-11 %	0,35	0,35	0,25	0,3	0,25	0,3	0,2	0,2	0,019
Lever NL 20:1n-9 %	2,2	1,9	1,7	1,7	1,95	1,75	1,7	1,55	0,053
Lever NL 20:1n-7 %	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,017
Lever NL 22:1n-11 %	0,65	0,6	0,4	0,5	0,45	0,5	0,35	0,4	0,028
Lever NL 22:1n-9 %	0,25	0,2	0,25	0,25	0,2	0,2	0,25	0,25	0,012
Lever NL 24:1n-9 %	0,15	0,1	0,1	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	0,009

Lever NL Sum en-umettet %	46,55	41,55	50,65	47,5	46,4	43,85	50,25	43,35	0,8
Lever NL 16:2n-4 %	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,25	0,3	0,019
Lever NL 18:2n-6 %	11,35	12,15	18,5	17,9	10,85	7,25	15,3	10,85	0,944
Lever NL 18:3n-6 %	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,15	0,009
Lever NL 20:2n-6 %	0,7	0,75	0,65	0,7	0,65	0,55	0,65	0,55	0,02
Lever NL 20:4n-6 %	1,3	1,45	0,95	1,05	1,15	0,9	0,8	0,8	0,058
Lever NL 22:4n-6 %	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0,05	0,013
Lever NL 22:5n-6 %	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,05	0	0	0,013
Lever NL Sum n-6 %	13,65	14,75	20,3	19,95	13,05	9,1	16,95	12,5	0,936
Lever NL 16:4n-3 %	0,5	0,45	0	0	0,5	0,6	0	0,2	0,068
Lever NL 18:3n-3 %	2,95	2,05	5,45	4,15	2,9	1,05	4,8	2,4	0,359
Lever NL 18:4n-3 %	0,55	0,6	0,45	0,55	0,55	0,7	0,45	0,8	0,032
Lever NL 20:4n-3 %	0,5	0,55	0,4	0,45	0,45	0,4	0,3	0,35	0,021
Lever NL 20:5n-3 EPA %	10,05	12,1	7,6	8,65	10,1	9,2	6,7	9,65	0,41
Lever NL 21:5n-3 %	0,25	0,3	0,2	0,2	0,25	0,25	0,2	0,25	0,013
Lever NL 22:5n-3 %	0,85	1,05	0,45	0,6	0,85	0,8	0,45	0,7	0,053
Lever NL 22:6n-3 DHA %	3,6	4,6	1,75	2,5	3,8	4,85	2,7	4,7	0,286
Lever NL Sum n-3 %	19,3	21,9	16,45	17,15	19,6	17,95	15,7	19,15	0,517
Lever NL 20:3n-9 %	0,1	0,05	0	0,05	0,1	0	0	0	0,013
Lever NL Sum EPA + DHA %	13,6	16,7	9,4	11,15	13,95	14,05	9,4	14,3	0,641
Lever NL n-3/n-6 %	1,4	1,45	0,8	0,85	1,5	2	0,95	1,5	0,1

Tabell B Fettsyreprofil i polarlipidfraksjonen i lever.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8	SEM
Lipidnivå i fôr (%)	12	12	20	20	12	12	20	20	
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar	
PL nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50	
PL i lever g/kg	22,85	12,14	14,5	14,9	19,9	18,95	17,6	14,85	1,133
Lever PL 14:0 %	0,5	0,35	0,3	0,3	0,6	0,65	0,8	0,7	0,054
Lever PL 15:0 %	0,1	0,15	0,2	0,2	0,15	0,15	0,2	0,2	0,012
Lever PL 16:0 %	16,9	19,1	13,6	14,55	17,3	21,2	15,05	18,7	0,638
Lever PL 17:0 %	0,25	0,3	0,3	0,25	0,2	0,45	0,4	0,9	0,06
Lever PL 18:0 %	3,5	4,2	4,25	3,8	3,75	3,8	4	4,2	0,12
Lever PL 20:0 %	0	0,1	0,2	0,15	0,05	0,05	0,05	0,1	0,018
Lever PL 22:0 %	0	0	0,05	0,05	0	0	0	0	0,009
Lever PL Sum mettet %	21,3	24,2	18,85	19,35	22,1	26,3	20,55	24,8	0,673
Lever PL 14:1n-9 %	0,35	0,05	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,05	0,035
Lever PL 16:1n-9 %	0,5	0,45	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,012
Lever PL 16:1n-7 %	1,15	1,2	0,85	0,9	1,35	1,75	1,2	1,25	0,079
Lever PL 18:1n-11 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,05	0,05	0,01
Lever PL 18:1n-9 %	11,3	11,3	19,4	17,7	11,45	8,8	15,6	10,8	0,926
Lever PL 18:1n-7 %	2,05	2,45	2,75	2,7	2,35	2,9	2,85	3,05	0,091
Lever PL 20:1n-11 %	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,009
Lever PL 20:1n-9 %	0,7	0,85	1,1	0,95	0,65	0,6	0,9	0,8	0,048
Lever PL 20:1n-7 %	0,05	0,2	0,1	0,1	0,1	0,15	0,05	0,15	0,015
Lever PL 22:1n-11 %	0,05	0,1	0,15	0,15	0,05	0,05	0,05	0,1	0,015
Lever PL 22:1n-9 %	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0	0,013
Lever PL 24:1n-9 %	0	0,05	0,1	0,1	0	0,1	0,05	0,1	0,013
Lever PL Sum en-umettet %	16,3	16,95	25,2	23,3	16,6	15	21,35	16,8	0,939

Lever PL 16:2n-4 %	0,05	0,15	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,15	<i>0,016</i>
Lever PL 18:2n-6 %	7,25	7,2	11,15	11,55	7,15	5,95	10,75	7,3	<i>0,54</i>
Lever PL 20:2n-6 %	0,55	0,6	0,65	0,75	0,45	0,4	0,55	0,5	<i>0,032</i>
Lever PL 20:3n-6 %	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	<i>0,009</i>
Lever PL 20:4n-6 %	4,55	4,2	3,95	3,95	4,3	3,6	3,45	3,2	<i>0,112</i>
Lever PL 22:4n-6 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	<i>0,009</i>
Lever PL 22:5n-6 %	0,3	0,4	0,3	0,3	0,25	0,25	0,15	0,2	<i>0,02</i>
Lever PL Sum n-6 %	12,7	12,65	16,1	16,55	12,3	10,35	15	11,4	<i>0,547</i>
Lever PL 16:3n-3 %	0	0,1	0	0	0,05	0	0	0	<i>0,01</i>
Lever PL 18:3n-3 %	1,15	0,7	2,3	1,75	1,2	0,4	2,25	0,75	<i>0,177</i>
Lever PL 18:4n-3 %	0,05	0,1	0,1	0,1	0,15	0,15	0,15	0,15	<i>0,014</i>
Lever PL 20:4n-3 %	0,2	0,25	0,2	0,2	0,25	0,2	0,15	0,2	<i>0,011</i>
Lever PL 20:5n-3 EPA %	24,35	20,6	14,7	17,1	24,3	23,85	18,45	20,2	<i>0,967</i>
Lever PL 21:5n-3 %	0,2	0,2	0,1	0,1	0,15	0,2	0,1	0,2	<i>0,013</i>
Lever PL 22:5n-3 %	1,2	1,35	1,25	1,2	1,15	0,95	1	1	<i>0,045</i>
Lever PL 22:6n-3 DHA %	20,75	20,8	18,8	17,95	20,1	20,2	19,1	21,75	<i>0,335</i>
Lever PL Sum n-3 %	47,9	44,05	37,5	38,55	47,35	46	41,25	44,2	<i>1,031</i>
Lever PL 20:3n-9 %	0,05	0,05	0,1	0,1	0	0	0	0	<i>0,013</i>
Lever PL Sum EPA + DHA %	45,05	41,45	33,5	35,05	44,4	44	37,5	41,9	<i>1,154</i>
Lever PL n-3/n-6 %	3,8	3,5	2,35	2,3	3,8	4,45	2,7	3,9	<i>0,196</i>

Tabell C Fettsyreprofil i nøytrallipidfraksjonen i muskel.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8	SEM
Lipidnivå i fôr (%)	12	12	20	20	12	12	20	20	
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar	
PL nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50	
NL i muskel g/kg	5,17	14	6,425	11,8	14,65	11,7	8,035	29,75	2,308
Muskel NL 14:0 %	2,1	2,4	2,1	2	2,5	4,1	2,85	4,55	0,249
Muskel NL 15:0 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,012
Muskel NL 16:0 %	13,5	12,6	10,25	10,5	12,5	15,2	11,1	13,55	0,434
Muskel NL 17:0 %	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,15	0,15	0,2	0,017
Muskel NL 18:0 %	4,3	3,9	2,9	3,1	4,35	5,05	3,25	4,1	0,192
Muskel NL 20:0 %	0,2	0,1	0,2	0,2	0,15	0,1	0,2	0,15	0,013
Muskel NL 22:0 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Muskel NL Sum mettet %	20,5	19,5	15,8	16,1	19,95	25	17,85	22,9	0,816
Muskel NL 14:1n-9 %	0,2	0,1	0,1	0,1	0,15	0,2	0,1	0,2	0,013
Muskel NL 16:1n-9 %	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,55	0,45	0,5	0,012
Muskel NL 16:1n-7 %	3,6	5,2	2,9	3,1	4,5	6,35	3,65	5,5	0,314
Muskel NL 18:1n-11 %	0,2	0,3	0,2	0,2	0,15	0,25	0,15	0,1	0,017
Muskel NL 18:1n-9 %	28,7	25,4	36,75	34,7	29,05	21,9	35,15	26,55	1,345
Muskel NL 18:1n-7 %	4,1	4,1	3,85	3,8	4,6	5,45	4,55	5,2	0,155
Muskel NL 20:1n-11 %	0,4	0,6	0,5	0,5	0,35	0,45	0,4	0,3	0,025
Muskel NL 20:1n-9 %	3,2	2,3	2,25	2,2	2,9	2,5	2,25	2,15	0,092
Muskel NL 20:1n-7 %	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,026
Muskel NL 22:1n-11 %	0,6	0,7	0,55	0,6	0,6	0,65	0,5	0,5	0,018
Muskel NL 22:1n-9 %	0,4	0,3	0,25	0,3	0,35	0,3	0,35	0,3	0,014
Muskel NL 24:1n-9 %	0,3	0,2	0,25	0,2	0,2	0,25	0,2	0,2	0,011
Muskel NL Sum en-umettet %	42,3	40,3	48,45	46,4	43,7	39,3	48	41,95	0,877

Muskel NL 16:2n-4 %	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,25	0,25	0,45	0,032
Muskel NL 18:2n-6 %	8,6	10,2	12,6	14	8,9	7	11,65	9,3	0,553
Muskel NL 18:3n-6 %	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0,05	0,1	0,013
Muskel NL 20:2n-6 %	1	0,8	0,75	0,8	0,85	0,75	0,7	0,65	0,026
Muskel NL 20:3n-6 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Muskel NL 20:4n-6 %	1,3	1,3	1	1	1,15	0,95	0,85	0,7	0,049
Muskel NL 22:4n-6 %	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,012
Muskel NL 22:5n-6 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Muskel NL Sum n-6 %	11,2	12,6	14,65	16	11,2	9,05	13,45	11,05	0,539
Muskel NL 16:3n-3 %	0,1	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,007
Muskel NL 16:4n-3 %	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0,038
Muskel NL 18:3n-3 %	2,2	1,9	3,55	3,4	2,5	1,1	3,65	2,25	0,23
Muskel NL 18:4n-3 %	0,4	0,7	0,45	0,5	0,55	0,8	0,5	0,85	0,044
Muskel NL 20:3n-3 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muskel NL 20:4n-3 %	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5	0,3	0,4	0,022
Muskel NL 20:5n-3 EPA %	11,2	12,7	8,35	8,9	10,65	10,45	7,5	9	0,389
Muskel NL 21:5n-3 %	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,016
Muskel NL 22:5n-3 %	1,5	1,3	0,9	0,9	1,25	1,3	0,8	0,95	0,06
Muskel NL 22:6n-3 DHA %	8	6,5	5,6	4,9	6,8	8,45	5,7	6,8	0,288
Muskel NL Sum n-3 %	24,1	24,3	19,5	19,4	23	23,2	18,7	20,7	0,533
Muskel NL 20:3n-9 %	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,007
Muskel NL Sum EPA + DHA %	19,2	19,2	14	13,8	17,5	18,9	13,2	15,8	0,604
Muskel NL n-3/n-6 %	2,2	1,9	1,35	1,2	2,05	2,55	1,4	1,9	0,116

Tabell D Fettsyreprofil i polarlipidfraksjonen i muskel.

	Diett 1	Diett 2	Diett 3	Diett 4	Diett 5	Diett 6	Diett 7	Diett 8	SEM
Lipidnivå i fôr (%)	12	12	20	20	12	12	20	20	
PL type	veg	veg	veg	veg	mar	mar	mar	mar	
PL nivå % av lipid	25	50	25	50	25	50	25	50	
PL i muskel g/kg	2,71	4,43	5,01	4,75	2,92	3,43	6,07	5,48	0,411
Muskel PL 14:0 %	0,5	0,45	0,35	0,35	0,6	0,9	0,7	1,05	0,066
Muskel PL 15:0 %	0,15	0,2	0,15	0,15	0,15	0,2	0,2	0,2	0,011
Muskel PL 16:0 %	15,2	17,35	14,25	14,15	15,6	19,55	15,3	17,5	0,493
Muskel PL 17:0 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,15	0,2	0,011
Muskel PL 18:0 %	4,6	4,1	4,05	3,75	4,85	4,35	3,7	3,65	0,208
Muskel PL 20:0 %	0	0	0,1	0	0	0,05	0,1	0	0,012
Muskel PL Sum mettet %	20,65	22,3	19	18,55	21,3	25,35	20,15	22,55	0,549
Muskel PL 14:1n-9 %	0	0,05	0,05	0,05	0	0,05	0,05	0,15	0,016
Muskel PL 16:1n-9 %	0,35	0,4	0,3	0,35	0,35	0,4	0,3	0,3	0,013
Muskel PL 16:1n-7 %	1,2	1,35	0,75	0,9	1,25	1,9	1,05	1,5	0,094
Muskel PL 18:1n-11 %	0,2	0,2	0,1	0,1	0,15	0,2	0,1	0,1	0,013
Muskel PL 18:1n-9 %	14,45	13,2	18,45	16,8	14,15	11,35	15,5	12,15	0,581
Muskel PL 18:1n-7 %	3,25	3,25	3	2,85	3,55	3,95	3,2	3,85	0,103
Muskel PL 20:1n-11 %	0,1	0,1	0,05	0	0,1	0,1	0,05	0,05	0,012
Muskel PL 20:1n-9 %	0,95	0,75	0,65	0,5	0,85	0,8	0,6	0,5	0,048
Muskel PL 20:1n-7 %	0,15	0,1	0,1	0,05	0,1	0,2	0,1	0,05	0,014
Muskel PL 22:1n-9 %	0	0	0,05	0	0	0	0	0	0,006
Muskel PL 24:1n-9 %	0	0,05	0,05	0	0	0,1	0,05	0,05	0,013
Muskel PL Sum en-umettet %	20,6	19,45	23,65	21,65	20,5	18,95	20,9	18,6	0,413
Muskel PL 16:2n-4 %	0,05	0,1	0,1	0	0,1	0,2	0,05	0,15	0,017

Muskel PL 18:2n-6 %	5,9	6,1	9,2	9,95	5,8	5,05	8,4	6,4	<i>0,452</i>
Muskel PL 20:2n-6 %	0,55	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5	0,35	0,4	<i>0,026</i>
Muskel PL 20:3n-6 %	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,1	<i>0,009</i>
Muskel PL 20:4n-6 %	2,85	2,55	2,55	2,75	2,7	2,3	2,25	2	<i>0,076</i>
Muskel PL 22:4n-6 %	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05	<i>0,011</i>
Muskel PL 22:5n-6 %	0,25	0,2	0,25	0,25	0,2	0,2	0,2	0,1	<i>0,014</i>
Muskel PL Sum n-6 %	9,7	9,65	12,5	13,45	9,3	8,2	11,35	9	<i>0,455</i>
Muskel PL 16:3n-3 %	0	0,05	0	0	0	0	0	0,05	<i>0,009</i>
Muskel PL 18:3n-3 %	1,05	0,7	1,9	1,55	1,05	0,45	1,85	0,95	<i>0,135</i>
Muskel PL 18:4n-3 %	0	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0,15	<i>0,015</i>
Muskel PL 20:4n-3 %	0,3	0,3	0,2	0,25	0,3	0,3	0,2	0,25	<i>0,013</i>
Muskel PL 20:5n-3 EPA %	16,55	17,9	13,6	16,05	16,8	17,75	15,25	18,3	<i>0,516</i>
Muskel PL 21:5n-3 %	0,2	0,25	0,1	0,1	0,2	0,25	0,15	0,2	<i>0,016</i>
Muskel PL 22:5n-3 %	2,25	2,4	1,75	1,8	2,3	2,05	1,65	1,65	<i>0,079</i>
Muskel PL 22:6n-3 DHA %	26,6	24,6	25,05	25	25,65	23,65	26,2	26	<i>0,418</i>
Muskel PL Sum n-3 %	46,95	46,2	42,7	44,7	46,25	44,55	45,4	47,5	<i>0,457</i>
Muskel PL 20:3n-9 %	0	0	0,05	0	0	0	0	0	<i>0,006</i>
Muskel PL Sum EPA + DHA %	43,1	42,45	38,65	40,95	42,4	41,4	41,4	44,3	<i>0,478</i>
Muskel PL n-3/n-6 %	4,8	4,8	3,45	3,35	5	5,45	4	5,25	<i>0,2</i>

