

Mikroalger i fôr, ny løsning for å redusere lusepåslag på laks Faglig sluttrapport

Anette Hustad, Birthe Vang, Hans Christian Eilertsen (UiT), Sten Ivar Siikavuopio, Bjørn Steinar Sæther (UiT), Ragnhild Aven Svalheim, Espen Hansen, (UiT) Jon Brage Svenning (UiT), Katerina Kousoulaki & Ragnhild Dragøy Whitaker





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

Nofima har om lag 390 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

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> Mikroalger i fôr, ny løsning for å redusere lusepåslag på laks – Faglig sluttrapport</p>	<p>ISBN 978-82-8296-635-1 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Microalgae in salmon feed, new solution for reducing salmon lice infection</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 20/2020</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Anette Hustad, Birthe Vang, Hans Christian Eilertsen (UiT), Sten Ivar Siikavuopio, Bjørn Steinar Sæther (UiT), Ragnhild Aven Svalheim, Espen Hansen, (UiT) Jon Brage Svenning (UiT), Katerina Kousoulaki & Ragnhild Dragøy Whitaker</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p> <p><i>Dato:</i> 18. mai 2020</p>
<p><i>Avdeling:</i> Marin bioteknologi, Produksjonsbiologi, Sjømatindustri, AkvaLab</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 21</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901464</p>
<p><i>Stikkord:</i> Oksylipiner, lakselus, mikroalger, Calanus/røddåte, fiskeoljer</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 12280</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>I dette prosjektet har vi testet ut en hypotese om at ved å erstatte vegetabiliske oljer i fôr til oppdrettslaks med marine oljer, vil man kunne redusere lusepåslag hos laks. Vi har fôret laks med fire ulike fôr, der proteininnholdet er det samme, men oljen er variert. De ulike fôrene vi brukte var kontrollfôr som var standardfôr med vegetabilisk olje, og tre ulike testfôr der vegetabilisk olje ble erstattet med henholdsvis fiskeolje, calanusolje og olje fra fototrofe mikroalger. Laks ble foret med fire ulike fôr med ulik olje, deretter ble laksen utsatt for lusesmitte. Laksen som var fôret med fôr som inneholdt komponenter fra mikroalger resulterte i lik tilvekst, men med signifikant mindre lusepåslag enn laks som ble fôret med kontrollfôr. Det ble også observert at laks fôret med de to andre prøvefôrene hadde noe lavere tilvekst enn kontrollfôr, men laks fôret med fôr som inneholdt calanus-olje hadde mindre lusesmitte enn kontrollfôret, men i lavere grad enn algefôr. Det ble også undersøkt om det var forskjeller i oksylipinnivået i skinn på laks fôret med ulikt fôr, det ble ikke registrert forskjeller mellom oksylipinnivå i skinn med den metoden som ble benyttet.</p> <p>Videre undersøkelser for bruk av denne typen fôr vil være å gjenta fôringsforsøkene i dette prosjektet for å reproducere og bekrefte de oppnådde resultatene, samt følge opp med undersøkelser som kan avdekke årsaker til redusert smitte. I oppfølgende prosjekt vil man se videre på effekter på skinn, tarmhelse, lever, hjerte og innvolls fett i tillegg til vekstparameter.</p> <p>Vi har i dette prosjektet demonstrert redusert lusesmitte og normal vekst i laks som er fôret med fôr tilsatt fototrofe mikroalger.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>In this project different salmon diets where vegetable oil replaced by fish oil, calanus oil and microalgae was given to groups of salmon smolts for a period of 60 days prior to infection with salmon lice copepodites. Results show that the salmon fed algae diet had a growth rate similar to the fish fed control feed, with significantly lower salmon lice infection levels.</p> <p>In order to verify conclusions in this project we will perform follow-up studies repeating the feeding trials and connected analysis in order to reproduce and confirm the results. In consecutive studies we will also aim to determine the cause of reduction in lice infection, as well as investigate skin, liver, intestines, heart, abdominal fat and growth.</p>	

Forord

Prosjektet omhandler ny metode for forebygging av lakselus med utgangspunkt i tester med laksedielt tilsatt oljer fra ulike kilder. Prosjektet er utført fra august 2017 til september 2019. Denne rapporten og arbeidet er i sin helhet finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF).

Innhold

1	Sammendrag	1
1.1	Summary.....	2
2	Innledning	4
3	Problemstilling og formål	7
4	Prosjektgjennomføring og metoder	8
4.1	Møteaktivitet i prosjektet.....	8
4.2	Pilotforsøk	8
4.3	Algepasta	8
4.4	Fôrproduksjon	9
4.5	Tilvekst og lusesmitteforsøk.....	11
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	14
5.1	Alger og fôr	14
5.2	Tilvekst og lusesmitteforsøk.....	14
5.3	Skinnanalyser.....	16
5.4	Nytteverdi og videre anvendelse	16
6	Hovedfunn	18
7	Leveranser	19
8	Referanser	20

1 Sammendrag

I dette prosjektet er målet å teste om den observerte økningen av lakselusinfeksjoner vi ser i oppdrettsnæringen, er en følge av endringer i fettsyresammensetningen av laksefôret. Vår hypotese er at den økte luseutfordringen har oppstått fordi det i de siste årene har vært en nedgang i høy n-3 fiskeoljer i fôret, mens lav n-3 soya og rapsolje har vært økende i laksedietten. I fiskeoljen vil det være et naturlig innslag av oksylipiner fra dietten til byttedyr som kan spores tilbake til planteplankton. Diatome mikroalger er kjent for å produsere oksylipiner for å avskrekke virvelløse dyr (Invertebrater), hovedsakelig copepoder, inkludert lakselus. En endring i fettsammensetning av laksefôret vil gi en reduksjon i utskillelsen av oksylipiner fra fiskeskinnet og dermed mister laksen en del av sin opprinnelige beskyttelse mot lusepåslag.

Ekstraksjon av olje fra mikroalger viste seg å være utfordrende etter flere tester. Men ved fôrteknologisenteret ti Nofima i Bergen har de utviklet en metode for å male algene til en pasta ved hjelp av en kule mølle. Dette har vist seg å være veldig vellykket med andre typer mikroalger som har vært brukt i fôr til laks. Dermed ble det mulig å inkorporere alge-pastaen fra Finnfjord i fiskefôr.

For å verifisere eller avkrefte vår hypotese ble det satt opp forsøk hvor vi implementerte kiselalger fra produksjon ved Finnfjord i fôr til laks i en 60 dagers fôringsperiode og utsatte laks for kontrollert lusesmitte. Som kontrolldiett benyttet vi Nofima Gold standard, men inkluderte også forsøksgrupper gitt fôr med Nordatlantisk marin olje og Calanus for å teste diett med olje fra ulike trofiske nivå.

Forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø AS, hvor total 400 laks ble fordelt i 12 stk 500 liters kar, 10 grader sjøvann. De 4 diettene A) Alger, B) Marine oljer, C) Calanus og D) Kontroll (Nofima Gold standard) ble fordelt i triplikate grupper. All fisk ble individmerket med pit-tag (Biomark) og vekt og lengdedata samt lusepåslag ble registrert på individnivå. Vekt og lengde ble målt ved start, etter 30 dager, etter 60 dager og ved telling av lusepåslag ved avslutning av forsøket. For hvert målepunkt ble fisk tatt ut og avlivet for uttak av skinnprøver. Til slutt ble 297 fisk med snittvekt på 339 g flyttet til Fiskehelselaboratoriet for kontrollert lusesmitte. All fisk fra de fire diettgruppene ble plassert i ett 4000 liter kar på fiskehelselaboratoriet, smittedose med lus-copepoditter som er forventet å gi et påslag på 10 lus per fisk. Forsøket ble avsluttet ved at all fisk ble ID-registrert, målt/veid og telt for lus. Alle lus på hele fisken ble telt, inkludert inni munn og på gjeller. Lusetellingen ble gjennomført 12 dager etter smitte, med vanntemperatur på 10 grader.

Laksen i forsøket hadde en startvekt på $134,9 \pm 15,4$ g (gjennomsnitt \pm SD) og sluttvekt etter 82 dager på $340,2 \pm 49,2$ g (gjennomsnitt \pm SD) ($N = 291$) med en gjennomsnittlig forventet daglig tilvekst (SGR) på $1,4 \pm 0,2$ % dag⁻¹. Forventet daglig tilvekst var høyest mellom dag 0 til 34 i forsøket. Fisken fôret med diett D (Kontroll), hadde signifikant bedre tilvekst (nested ANOVA, $p < 0,001$) sammenlignet med fisk fôret med Diett B og C, men ingen forskjell til diett A. Fisken fôret diett B hadde en signifikant lavere forventet daglig tilvekst enn fisk fôret både diett A og D, men det var ingen signifikant diett relatert effekt på vekt, lengde og kondisjonsfaktor.

Både diett og kondisjonsfaktor var signifikante for modellen og for antall lus. Fisk som hadde fått fôr med alger hadde signifikant lavere antall lus enn fisk som var fôret med kontrollfôr og marine oljer. Laks fôret med kontrollfôr hadde signifikant høyest forekomst av lus.

Vi erfarte at ekstraksjon av olje fra mikroalger er utfordrende og vanskelig å skalere opp og få lønnsom med dagens teknologi. Man bør jobbe videre med nye miljøvennlige metoder for å ekstrahere olje for å kunne nyttiggjøre seg ren olje fra mikroalger. Våre forsøk viser derimot at bruk av hele mikroalger i fiskefôret gir et signifikant lavere lusepåslag enn et standard laksefôr som brukes i dag, og metoden er mulig å oppskalere til en kommersiell skala. Våre resultater er de første som viser at det er mulig å begrense lusepåslag ved bruk av mikroalger. Videre så viser forsøkene at også dyr som calanus på høyere trofisk nivå har tilsvarende effekt om ikke så god som mikroalge. Videre viser forsøkene at tilvekst til laksen ikke blir påvirket ved bruk av alger i fôr noe som svært viktig ved en eventuell kommersialisering av resultatene.

1.1 Summary

We aim here at demonstrating our hypothesis that the observed increase in salmon lice infection is due to altered fatty acid compositions in salmon feed, i.e. the omega-3 to omega-6 fatty acid ratio. The late years high content n-3 fish oil/feed fed to salmon has decreased, while low n-3 soy and rapeseed has increased. We hypothesize that there is a correlation between lice infestation and altered (decreased) n-3/n-6 PUFA ratios in the feed. PUFAs are precursors for oxylipins, and the decreased ratio causes reduced excretions of oxylipins from the fish skin. We have documented that oxylipins produced by microalgae deters invertebrate grazers, including copepods. Salmon lice is a copepod and we suggest that salmon lice can be reduced by active use of oxylipins in salmon farming, and/or maintenance of a higher n-3/n-6 ratio in fish feed.

Extraction of oil from microalgae was challenging. At Nofima feed technology centre in Bergen a new method is used to powder algae into algae paste in a ball mill, which made it possible to incorporate the algae paste from Finnfjord in salmon feed pellets.

To verify our hypothesis we set up an experiment where we implemented diatom microalgae from a production at Finnfjord in salmon feed, and ran a 60 day feeding trial, following controlled salmon lice infection. As a control diet we used Nofima gold standard, but also included experimental groups given feed with oil of north Atlantic marine origin and Calanus oil to test for diets made of oils from different trophic levels. The trial was done at the Aquaculture research station in Tromsø. A total of 400 salmon, divided in 12 groups, 500 liters tank, 10 degrees seawater. Diets A. Algae, B. Marine oils, C. Calanus and D. Control was given in triplicates. All fish was individually marked with Pit-tags (Biomark) and weight, length as well as lice infection level could be registered at individual level. Measurement of growth and sampling of skin for oxylipin analysis was done after 30 and 60 days of feeding the diets. After 60 days feeding 297 fish average weight 339 grams was put together in a large 4000 liters tank and infected by salmon lice copepodites. Experiment ended by counting the salmon lice present on each individual fish after 12 days in 10 degrees seawater.

The salmon in the trial grew from an initial weight of $134,9 \pm 15,4$ g to $340,2 \pm 49,2$ g (mean \pm SD) (N = 291) in 82 days with an average SGR of 1.4 ± 0.2 % day⁻¹. SGR was highest between day 0 and day 34. Fish fed diet D had significantly higher SGR (nested ANOVA, $p < 0.001$) compared to fish fed B and C, but no difference from fish fed diet A. Fish fed diet B had a significantly lower SGR than fish fed diet A and D. There were no significant dietary effects on weight, length or condition factor.

Both diet and condition factor were significant for the model and number of salmon lice. Fish that was fed algae diet had significantly lower number of salmon lice compared to fish fed control or marine oil feed (Diet D and B). Fish fed control diet had significantly higher number of salmon lice.

Our experience is that extraction of oil from microalgae is challenging and difficult to scale up with available technology today. Continued efforts to find new environmentally friendly methods for extracting and utilizing oil from microalgae are recommended. Our experiments show that the use of whole microalgae in the fish feed gives significantly lower salmon lice infections than a standard salmon feed used today, and this method can be commercialized. Our results are the first to show that it is possible to reduce lice infections using microalgae, and Calanus that is from a higher trophic level presents similar effects of salmon lice infections. The results from measuring growth of the salmon in our trials shows that the growth rate is not affected by adding microalgae in feed, which is important if the algae are used in a commercial feed.

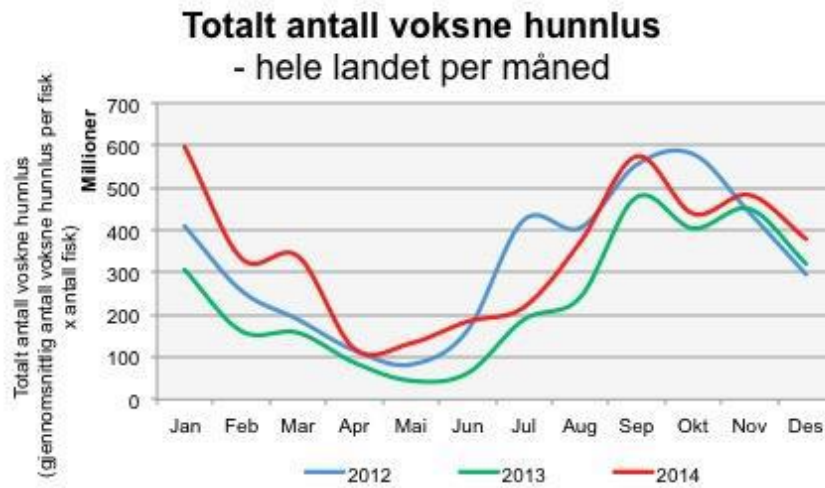
2 Innledning

Det er kjent at diatome mikroalger produserer oksylipiner for å avskrekke virvelløse dyr (invertebrater), hovedsakelig copepoder, inkludert lakselus. Diatomeer er ansvarlig for mer enn 40 % av den totale marine primærproduksjonen (Nelson *et al.*, 1995; Field *et al.*, 1998). De lever i habitater rikelig med planteplankton beitere, patogene bakterier og virus, og for å overleve har diatomeer utviklet effektive mekanismer for å unngå å bli beitet på (Smetacek, 2001). Diatomeer er kjent for å være kjemisk mangfoldige (Barofsky *et al.*, 2010; Huseby *et al.*, 2013). De produserer et bredt spekter av bioaktive sekundære metabolitter og det er flere publikasjoner som indikerer at marine diatomeer kan virke skadelig for tidlige utviklingsstadier av virvelløse dyr. Det har blitt rapportert at forbindelsene som er ansvarlige for disse skadelige effektene er oksylipiner som følge av oksiderte flerumettede fettsyrer (PUFAs). Det er et stort utvalg av oksylipiner som produseres av alger, men så langt er det umettede aldehyder (PUAer) som har hatt mest fokus, men også for eksempel hydroksyl-, keto og epoksyhydroksy fettsyrederivater kan være involvert i allelopatiske handlinger. Det finnes flere arbeider på at oxylipiner kan fungere som beiteavskrekkende (Pohnert, 2005; Caldwell, 2009). Et eksempel er egne forsøk som illustrerer hvordan kråkebollelarver reagerer negativt til en oxylipin produserende diatom (<http://phaeocystis.com/Pg.wmv>). Forsøk har også vist at lave oxylipin-konsentrasjoner kan virke forstyrrende for reproduksjon og utvikling av copepoder (Ianora *et al.*, 1995, Ianora *et al.*, 1996; Miralto *et al.*, 1999, d'Ippolito *et al.*, 2003, Adolph *et al.*, 2004; Ianora *et al.*, 2011). De vanligste nordlige diatomeer *Skeletonema marinoi* (tidligere *S. costatum*), *Thalassiosira rotula*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* og "verdens vanligste marine planteplankton" *Phaeocystis pouchetii* produserer PUAs som har negative effekter mot virvelløse dyr, men også mot pigghud- og torskelarver (Eilertsen & Raa, 1995; Hansen *et al.*, 2004, Hansen *et al.*, 2004). Interessant i denne sammenhengen er også at sjøfugl har tilpasset lignende strategier, det vil si oxylipinproduksjon for å redusere luseinfeksjon (Douglas, 2013).

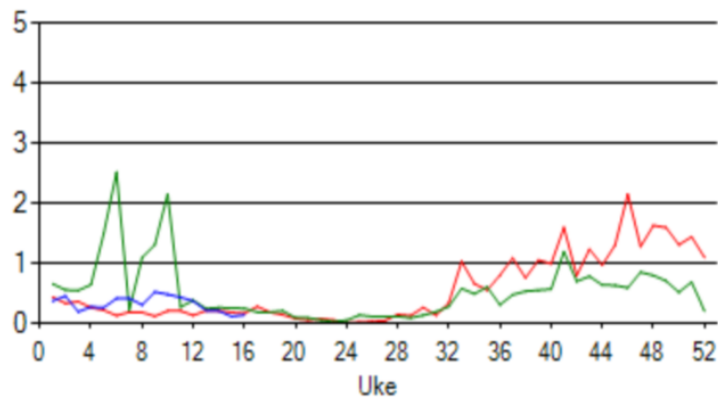
Fettsyrer er de store byggsteinene i lipider, felles for alle levende celler. De er rikelig i mange arter av fisk, spesielt i feit fisk som laks. Fettsyrer, inkludert omega-3 PUFAs er konsentrert under huden (Aursand *et al.*, 1994). Bortsett fra omsetningen av fettsyrer i lipider, er oksidasjon av umettede lipider en av de viktigste reaksjonene i lipid metabolisme. Den første dannelsen av hydroperoksider kan forekomme enten ved kjemisk oksidasjon eller som følge av enzymer som lipoxygenaser (Feussner & Wasternack, 2002; Mosblech *et al.*, 2009). I fisk blir PUFAs oksidert for å produsere oxylipins/aldehyder, men også lukt-ketoner og umettede alkoholer (Barton *et al.*, 1999). Spesielt EPA og DHA kan gi betydelige mengder oksylipiner når de er oksidert (Borowitzka, 1995). Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) har vært et stort problem for oppdrettslaks og villaks i mange år (Johnson, 1998). De senere årene har luseinfeksjonen vært økende, spesielt i Norge, noe som påvirker den overordnede økonomien (og ryktet) til norsk oppdrettsindustri. I 1997 ble det innført en handlingsplan mot lakselus, men til tross for dette eksisterer fortsatt luseproblemet og det er økende. Samtidig ser vi en økning i resistens mot flere medikamenter som har vært benyttet tidligere. Lakselus formerer seg året rundt, men produksjonen av copepoditter som er det infektive stadiet er hyppigere når temperaturen stiger. I kontrast til dette har luseinfeksjonsnivåene vist seg å synke når sjøvannstemperaturene øker (Figur 1, Figur 2, Figur 3)

Det faktum at lakselusnivået reduseres i løpet av våren, kan etter vår mening være relatert til den årlige planteplanktonoppblomstringen langs kysten av Norge. Vårblomstringen består av diatomeer,

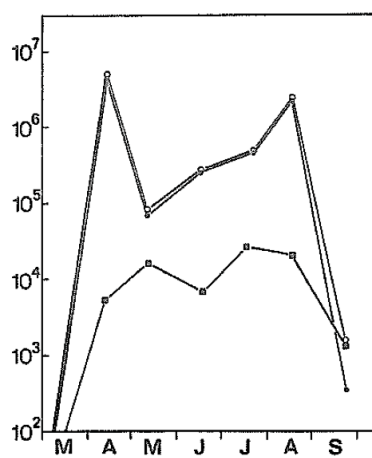
hvorav flere er beskrevet som aldehydprodusenter, samt den tidligere nevnte *Phaeocystis pouchetii* som er dokumentert å være heftig aldehydprodusent (Hansen *et al.*, 2004)



Figur 1 Månedlig middelerverdier (2012–2014) for lakselusinfeksjoner på oppdrettslaks langs norskekysten



Figur 2 Månedlig middelerverdier for lakselusinfeksjoner på oppdrettslaks i Troms



Figur 3 Årlig variasjon i mengde diatomeer langs norskekysten representert med data fra Balsfjorden, Troms (øverste kurve). Merk logaritmisk y-akse. (Eilertsen *et al.*, 1981)

På Sør- og på Vestlandet er våroppblomstringen tidligere enn i nord, rikelige forekomster av diatomeen *Skeletonema costatum* er vanlig, og denne arten er beskrevet som en av de mest vanlige oksylipin–produserende alger (Pohnert, 2005). I nord er våroppblomstringen noe senere og toppes i April, og her er *P.pouchetii* mer vanlig (Degerlund & Eilertsen, 2010). I figurene over (Figur 2 og Figur 3) ser man korrelasjonen mellom tiden for våroppblomstringen og nedgangen i luseinfeksjonen, og deler av vår hypotese er derfor basert på antagelsen at nedgangen i lakselusinfeksjon reduseres på våren som følge av økt oksylipinproduksjon av mikroalger.

I dette prosjektet ønsker vi å demonstrere en mulig ny løsning for å redusere lakselusinfeksjon på laks. Vår hypotese er at den økte lakselusutfordringen har oppstått på grunn av endringer i fettsyresammensetningen i laksefôr, det vil si Omega-3 og Omega-6 fettsyre forholdet i fôret. I de siste årene har det vært en nedgang i høy n-3 fiskeoljer i fôret, mens lav n-3 soya og rapsolje har vært økende i laksedietten. Vår hypotese er altså at det er en sammenheng mellom luseinfeksjon og endringen (reduksjon) av n-3/n-6 flerumettede fettsyre-sammensetning i laksefôret. De flerumettede fetttsyrene er forløpere for oksylipiner, og den reduserte mengden marine oljer fører til redusert utskillelse av oksylipiner fra fiskeskinn og derfor økt lusepåslag. Vi har dokumentert at oksylipiner produsert av mikroalger virker avskrekkende på blant annet copepoditter. Lakselus er en copepode på infektive livsstadie og vår ide er at lakselusinfeksjon kan reduseres med tilsetning av oksylipiner og/eller vedlikehold av et høyere n-3/n-6 innhold i laksefôret.

Vår hovedteori var derfor at luseinfeksjonen kan minskes med endringer i fettsyrer i fôret. For å analysere dette ble det gjennomført oppfôring av laks på ulike dietter, diettene har ulik sammensetning av fettsyrer fra ulike trofisknivå og dermed forventet ulikt oksylipinnivå. Deretter ville vi finne ut om effekten av de ulike diettene gjenspeiles i resultatene fra påslag av lakselus i et kontrollert luseinfeksjonsstudie i småskala. For å kunne verifisere vår hypotese ble det gjennomført analyser av oksylipiner i lakseskinn fra laks som har vært fôret med ulike dietter, der diettene inneholdt samme mengde fettsyrer, men der fettsyren kommer fra ulike kilder.

3 Problemstilling og formål

Grunnleggende funksjonell kunnskap og verktøy utvikles til fordel for akvakultur industrien og vil bidra til økt kostnadseffektivitet og reduksjon i biomassetapet som er aktuelt i dagens oppdrett. Ved å nyttiggjøre lavtrofiske arter i fra en ny industri med lav innvirkning og konkurranse om dyrkbar landareal, kan man skape viktige ressurser til blant annet fôrproduksjon til oppdrettslaks. Prosjektet har potensial til å redusere lusepåslag, redusere bruken av kjemikalier og mekanisk avlusing, som vil ha stor betydning for miljø og fiskevelferd.

Målet med prosjektet var å finne en måte å erstatte planteolje i fiskefôr med marin algeolje, og deretter dokumentere om endringer i oljesammensetninger i laksedietten vil ha betydning for om laksen blir mer eller mindre motstandsdyktig mot lusepåslag senere.

4 Prosjektgjennomføring og metoder

4.1 Møteaktivitet i prosjektet

Det ble gjennomført oppstartsmøte hvor prosjektbeskrivelsen og aktiviteter ble gjennomgått. I løpet av prosjektperioden ble det avholdt møter med referansegruppen hvor noen deltok på telefon og noen deltok på møtene sammen med Nofima. Arbeidet i prosjektet ble diskutert med styringsgruppen og i samråd med referansegruppen ble det gjort endringer i forhold til opprinnelig tidsplan i prosjektbeskrivelsen.

Prosjektet ble ledet og gjennomført av Nofima, i samarbeid med Universitetet i Tromsø og hadde en referansegruppe bestående av:

- Jo Strømholte, Finnfjord smelteverk
- Tommy Hansen, Nordlaks
- Harald Sveier, Lerøy
- Ove Inge Vågen, Svanøy havbruk
- Kristian Prytz, FHF

4.2 Pilotforsøk

Gjennomføring pilotforsøk 2017

Et fôringsforsøk med 2 ulike dietter i triplikate grupper (Testfôr med marine oljer og Kontroll) i totalt 60 dager. Veiing av fisk ved oppstart, etter 30 dager og ved overføring til luselaboratoriet på Havbruksstasjonen (Luslab) etter 60 dager (september 2017). Fisken ble deretter veid ved telling av lakselus 20 og 21 september. Fisken fikk diettfôr hele tiden, også på Luslab under smitteperioden. Temperaturen i fôringsperioden var naturlig sjøvann 8–10 grader, men på Luslab under smitteperioden økte vi temperaturen til 12 grader for å framskynde utviklingen av lus.

Smitte med lakselus ble gjennomført september 2017 etter standard smitteprosedyre ved Havbruksstasjonen i Tromsø, avd. landanlegget. Smittedose ble beregnet ut ifra et forventet snittpåslag på 10 lus per fisk. Telling av lus og avslutning ble gjennomført 14 og 15 dager etter smitte. Og forventet at lusa ville være i det siste fastsittende stadiet, Chalimus 4. Noen lus var likevel utviklet til første pre-adult stadie, og var dermed gått over fra fastsittende til bevegelig stadie. Samme behandling med telling av lus per fisk ved avslutning ble gjort for alle kar. Resultatene fra pilotstudien gav oss et godt grunnlag for beregning av antall forsøksfisk og forsøksoppsett for hovedforsøket med flere dietter.

4.3 Algepasta

For å teste hovedhypotesen i prosjektet at marine oljer i fôret kan føre til redusert lusepåslag ville vi ekstrahere olje fra mikroalger for å inkorporere dette i fôret på samme måte som vegetabilsk olje og fiskeolje. Ekstraksjon av olje fra mikroalger viste seg å være utfordrende.

Det ble i løpet av 2018 gjort mange forsøk på å ekstrahere olje fra algene som kunne inkorporeres i fôret. Det ble brukt både mekaniske metoder (sonikering, knusing med morter, ultrathurrax),

løsemidler (kloroform, metanol etc) samt proteolytiske og karbohydrat-spaltende enzymer (alcalase, protamex, viscozyme, celluclast etc). I tillegg ble kombinasjon av ulike metoder brukt. Metoden som viste best effekt, var bruk av løsemidler. På grunn av det lave fettinnholdet (1 % på våtvektsbasis) var det kun mulig å ekstrahere nok olje (20–30 liter) ved å bruke svært store mengder alger og ekstraksjonsmetoder som er uegnet i industriskala på nåværende tidspunkt. På bakgrunn av utfordringene med å produsere nok alger og ekstrahere algeoljen, ble det i samråd med Fôrteknologisenteret til Nofima i Bergen besluttet at den beste fremgangsmåten ville være å tilsette alger i fôret, i tillegg til noe ekstra marint fett for å få opp mengden EPA/DHA til forsvarlig nivå av fiskehelsehensyn. Og samtidig for å ha noenlunde likt fettinnhold i de ulike fôrene som ble produsert. Ved fôrteknologisenteret har de utviklet en metode for å male algene til en pasta ved hjelp av en kulemølle. Dette har visst seg å være veldig vellykket med andre typer mikroalger som har vært brukt i fôr til laks. Dermed ble det mulig å inkorporere alge-pastaen fra Finnfjord i fiskefôr.

Fettsyreprofilen (Tabell 1) i algene ble analysert og brukes som utgangspunkt for å tilsette mer olje i fôret.

Tabell 1 Fettsyresammensetning i alger fra Finnfjord (UiT)

TAG	5,66 ± 0,20
DAG	10,56 ± 0,54
FFA	9,81 ± 0,70
MGDG	40,06 ± 1,09
DGDG	0,00
PG	19,10 ± 0,41
PC	14,81 ± 0,68

TAG: Triacylglycerol, DAG: Diacylglycerol, FFA: Free fatty acid, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol, DGDG: Digalactosyldiacylglycerol, PG: Phosphatidylglycerol, PC: Phosphatidylcholine

Vann og fettinnhold i algene varierer noe, men ligger vanligvis på mellom 85–90 % vann og 1 % fett (våttvektsbasis) Fettsyresammensetning (resultater ikke publisert enda og tilhører NFH, analyser utført ved Barents Biocentre) viser at algene inneholder 18,6 % mettet fett, 8,5 % MUFA og 72,8 % PUFA. Av dette er det en høy andel 16:4n-1 (31 %) og EPA (26,6 %)

4.4 Fôrproduksjon

Det ble beregnet at fisken har behov for et fettinnhold i fôr på cirka 25 % ved den størrelsen fisken har ved start av forsøket (ca. 100 gram). Det er estimert at det er behov for cirka 100–120 kg fôr av hver diett. For å produsere diett B med nordatlantisk fiskeolje og kontrollfôr D, så var ingrediensene tilgjengelig hos fôrteknologisenteret. For resterende dietter ble det sendt cirka 20–25 kg alger (tilsvarende cirka 3 kg tørrstoff) fra Finnfjord, og 3 liter calanusolje fra Calanus AS til fôrteknologisenteret ved Nofima Bergen for å produsere diett A og C.

Utgangspunkt for forsøksfôr var

- Fôr hvor 20 % er marine alger + fiskeolje (samme kilde som fôr B).
- Fôr med fiskeolje, Nordatlantisk olje
- Fôr hvor vi erstatter 10 % av fiskeoljen med calanusolje.

D. Standard kommersielt fôr (planteolje basert)

Det ble brukt samme grunndiett for alle fôrene og bare endret på oljetilsetning. Kjemisk sammensetning vil da bli identisk, bortsett fra ulik fettsyresammensetning. Det er et litt konservativt nivå av EPA + DHA for kontrolldietten (1,7 % av dietten). Og for diett A med algebiomasse lagt til på toppen av grunndietten. Siden det ikke er så mye tørrstoff i algebiomassen så vil det ikke påvirke den kjemiske sammensetningen av ferdig fôr (da vannet i algebiomassen blir tørket ut i prosessen). Alt av algebiomasse tilgjengelig ble benyttet.

Teorien bak å inkludere Calanus som egen diett er at *Calanus finmarchicus* beiter på marine alger og det er kjent fra litteraturen at lipidprofilen i calanusolje reflekterer algene de beiter på. I tillegg er calanus og lakselus begge copepoditter så det er mulig det også kan ha en effekt på lusepåslag. Ved å inkludere calanus i fôret får man i tillegg enda en variasjon av marine oljer som kan ha effekt på lusepåslag i tillegg til alger og fiskeoljer. Man kan også få en indikasjon på om denne (mulige) effekten vil avta eller opprettholdes med tanke på hvor i næringskjeden lipidene stammer fra. Planteplankton (1. trinn), dyreplankton (2. trinn) eller fisk (3–4. trinn).

Tabell 2 Prosentvis ingredienssammensetning i de ulike forsøksdiettene

Diett	Alger	(B) Fiskeolje	(C) Calanus	(D) Kontroll
Fiskemel	21,55	25,00	25,00	25,00
SPC (soyaproteinkonsentrat)	16,81	19,50	19,50	19,50
Hvetegluten	14,66	17,00	17,00	17,00
Hvete	8,97	10,40	10,40	10,40
Fiskeolje	18,36	21,30	18,90	9,00
Rapsolje	-	-	-	12,30
Calanusolje	-	-	2,40	-
Algebiomasse	13,79	-	-	-
Soya lecithin	0,43	0,50	0,50	0,50
Kolinklorid	0,43	0,50	0,50	0,50
Vitaminpremix	1,72	2,00	2,00	2,00
Monosodiumfosfat (26 % P)	2,16	2,50	2,50	2,50
Carop. Pink (10 % Astax)	0,04	0,05	0,05	0,05
L-Lysin	0,52	0,60	0,60	0,60
DL-Metionin	0,09	0,10	0,10	0,10
Mineral premix	0,43	0,50	0,50	0,50
Vitamin C (35%)	0,04	0,05	0,05	0,05
Sum	100,00	100,00	100,00	100,00

Alle 4 diettene skal testes i forsøk med fisk for å sjekke mulig reduksjon i lusepåslag etter en 60 dagers fôringsperiode. Underveis i forsøket blir fisken målt og veid for å sjekke tilveksten for de ulike gruppene, og i utgangspunktet forventes en dobling av vekten i løpet av denne perioden.

Diett A = Alger

Diett B = Fiskeolje

Diett C = Calanus

Diett D = Kontroll

4.5 Tilvekst og lusesmitteforsøk

All data ble undersøkt med det den statistiske programvaren R, versjon 3.4.0 (R Core Team, 2017) with the car (Fox & Weisberg, 2019; Fox, 2016) package and codes from Schlegel (2016) og visualisert med ggplot 2 (Wickham, 2016).

Effektstørrelsen for vurdering av antall fisk nødvendig i forsøket ble regnet ut basert på pilotstudien for en-veis ANOVA-effektstørrelse. Effektstørrelsen av fôrtypen ble da 0,21 som er regnet som medium effektstørrelse. Denne faktoren ble deretter brukt i en poweranalyse der utregningen ble basert på 4 ulike grupper (k), medium effektstørrelse (f), sig.level = 0,05 og power 0,2. Signifikansnivået for falsk positiv og power er 1 – sannsynlighet for falsk negativ.

Tallet på fisk per gruppe er estimert til å måtte være minimum N = 63 fisk per gruppe. Dette tallet tar ikke hensyn til kar-effekt, men 450 fisk fordelt på 4 grupper (~112 fisk per gruppe), er forventet å være tilstrekkelig for å kunne korrigere for en eventuell kar-effekt under fôringsperioden. For smitteforsøket med lakselus blir alle diettgruppene samlet i ett kar slik at kar-effekt ikke er gjeldende.

I forkant av forsøksstart ble 450 laks merket med pit tag (Biomark) samtidig som det ble tatt ut 10 fisk til 0-prøver av skinn (20.5.2019). Etter merking får fisken ro i 17 dager før oppstart og fordeling av fisk i grupper. Ved hvert prøveuttak start, halvveis, før og etter lusesmitte så blir fisken bedøvd for måling og veiing.

Forholdet mellom respons variablene «antall lus» og korresponderende forklaringsvariabel diett; A. alger, B. marine olje, C. calanus og D. kontrollfôr, og Fultons kondisjonsfaktor ved avlivning, er undersøkt med bruk av generalisert lineær modellering (GLM). Fordi responsvariabelen er telledata (ant. lus), ble familie Poisson med log link-funksjon valgt til å forklare spredningen. Etter modellen var klar ble det i tillegg utført en General Linær Hypoteste (glht) (Tukey post hoc test for GLM) for å sammenligne diettene. Både diett og kondisjonsfaktor var signifikante for modellen og for antall lus. Fisk som hadde fått fôr med alger hadde signifikant lavere antall lus enn fisk som var fôret med kontrollfôr og marine oljer. Laks fôret med kontrollfôr hadde signifikant høyest forekomst av lus.

Spesifikk vekstrate (SGR), %/dag⁻¹ blir beregnet som $SGR = 100 (\ln W1 - \ln W0) t^{-1}$, hvor W0 og W1 er gjennomsnittsstart og sluttvekt, og t er antall forsøksdager. All data blir sjekket for homogenitet av varians og normalitet ved visuell inspisering av boksploot og histogrammer. I tillegg ble Lillefors og Levens-test brukt for å sjekke respektivt normalitet og homogenitet. Alla dataen var normalfordelt, men hadde heteroskedastiske tendenser. Triplikatkarene ble nesta under fôringsregime, og effekten av de ulike responsene (SGR, vekt, lengde og kondisjonsfaktor) ble analysert med ANOVA med heteroskedastisitet-korrigert kovarians («White-Huber-covariance») (White, 1980; Long & Ervin, 2000; Cribari-Neto, 2004) og forskjeller mellom grupper ble undersøkt med Games-Howell post-hoc test (Games & Howell, 1976).

Oppstart av forsøket 6.6.2019: Overføring av fisk fra produksjonsavdelingen (C-avd) til forsøksavdeling (D/E-avd.) Fisken ble håvet fra opprinnelseskaret over i benzoak bad for bedøvelse, deretter flyttet til mindre bakke på bordet (vann med svak bedøvelsesløsning) hvor så fisken ble tatt ut en etter en, registrert pit-tag nr, målt lengde og vekt. Fisken ble deretter fordelt i 10 liters bøtter med friskt ferskvann for oppvåkning og transport til forsøkskar på D/E avdeling, 10 fisk per bøtte. Bøttene ble fordelt fortløpende i kar på forsøksavdelingen, fra kar 1 til 12, slik at vi fikk en god fordeling av fisk med

Sluttveiing før overflytting til Fiskehelselaboratoriet (FHL) T2-12.8.19

Gjennomgang mål og vekt av all fisk, 3 fisk per kar til skinnprøver etter samme rutine som for T1. I tillegg blir 6 fisk tatt ut og avlivet etter registrering for å redusere biomassen før overflytting til FHL påfølgende dag.

Til sammen ble 297 fisk med snittvekt på 339g flyttet til Fiskehelselaboratoriet. All fisk ble plassert i ett 4000 liters kar på FHL. Oksygenering av vann ble startet ved overflytting for å unngå oksygenmangel i karene i løpet av smitteperioden. I løpet av perioden på fiskehelselaben vedlikeholdsføres fisken med Standard Skretting Olympic 3mm.

Lusesmitte 14.8.19

Selve lusesmitten gjennomføres av personell fra Havbruksstasjonen etter egen protokoll, forventet påslag av lus per fisk er 10 lus.

Lusetelling og avslutning T3-26 og 27.8

Avslutning av forsøket hvor all fisk telles for lus. Fisken bedøves i overdose benzoak, telles for lus i en bakke med vann. Alle lus på hele fisken telles, inkludert inni munn og på gjeller. Lusetellingen gjennomføres 12 dager etter smitte, vanntemperatur 10 grader. Lusa er da på chalimus-3-stadiet som er ok størrelse å telle, ingen lus var i forsøksperioden rukket å vokse til frittlevende stadie. Fiskens Tag ID registreres, skinnprøver tas av 9 fisk per opprinnelig diettgruppe, og fisken måles og veies.

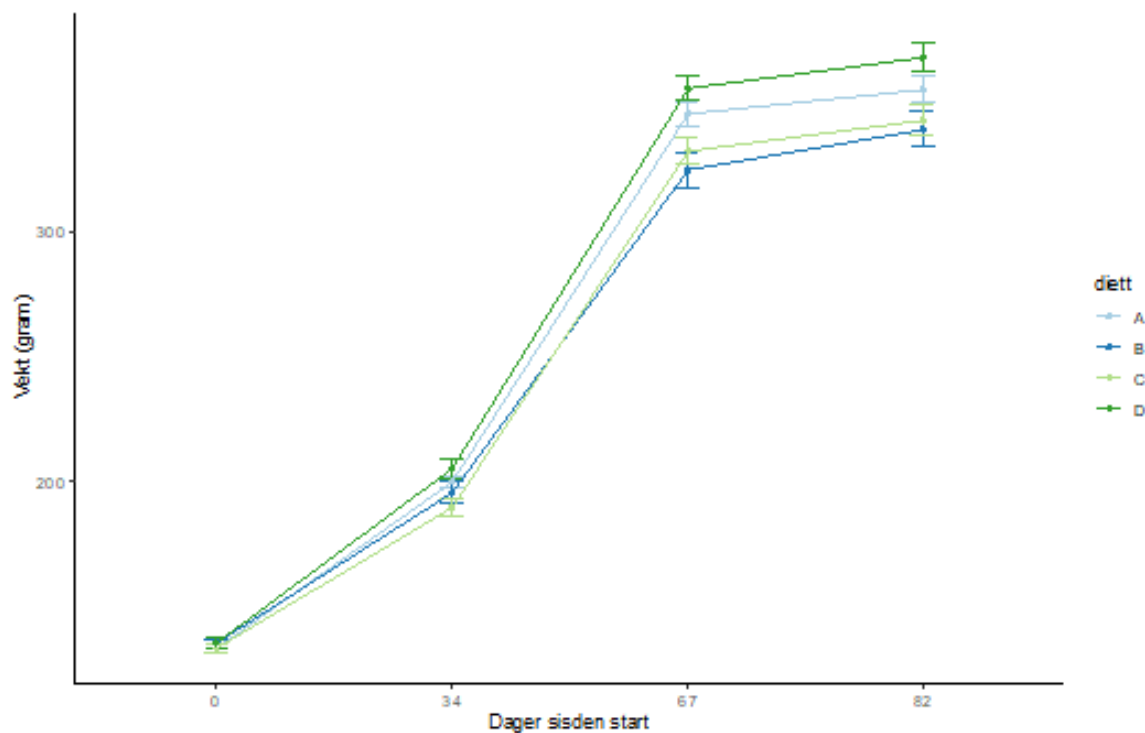
5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Alger og fôr

Driftstekniske problemer med oppskalering av produksjon av alger i Finnfjord gjorde at det ikke ble produsert mer enn 25–30 kg alger i januar 2019. Dette er i stor kontrast til de 3000 kg vi ville trengt for å få ut 30 liter algeolje. På bakgrunn av dette ble det rapportert avviksmelding høsten 2018 av prosjektleder Ragnhild D. Whitaker. Analyser av de ulike diettene med tanke på fettsyresammensetning ble gjennomført av universitetet i Tromsø.

5.2 Tilvekst og lusesmitteforsøk

Laksen i forsøket hadde en startvekt på $134,9 \pm 15,4$ g (gjennomsnitt \pm SD) og sluttvekt etter 82 dager på $340,2 \pm 49,2$ g (gjennomsnitt \pm SD) ($N = 291$) med en gjennomsnittlig forventet daglig tilvekst (SGR) på $1,4 \pm 0,2$ % dag⁻¹. Forventet daglig tilvekst var høyest mellom dag 0 til 34 i forsøket (se tabell 3 og figur 4 for detaljer om SGR ved ulike måletidspunkt). Fiskens fôret med diett D (Kontroll), hadde signifikant bedre tilvekst (nested ANOVA, $p < 0,001$) sammenlignet med fisk fôret med Diett B og C, men ingen forskjell til diett A (Figur 4). Fiskens fôret med diett B hadde en signifikant lavere forventet daglig tilvekst enn fisk fôret med både diett A og D, men det var ingen signifikant diettrelatert effekt på vekt, lengde og kondisjonsfaktor.



Figur 4 Vekst under forsøket til laks fôret med 4 ulike dietter; A. alger, B. marine olje, C. calanus og D. kontrollfôr. Punktene viser gjennomsnittsvekt \pm standardfeil.

Tabell 3 Oversikt over specific growth rate (%) ved de ulike måleintervallene 34 dager og 67 dager. Tabellen viser gjennomsnittsverdier \pm standardfeil.

Diett \ Dag	Specific growth rate (%)			
	A	B	C	D
0-34	1,18 \pm 0,03	1,06 \pm 0,05	1,01 \pm 0,04	1,20 \pm 0,04
34-67	0,82 \pm 0,01	0,75 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01	0,83 \pm 0,02
0-67	1,42 \pm 0,02	1,29 \pm 0,03	1,35 \pm 0,02	1,44 \pm 0,02

Ved mellomveiei T1 observerte vi også mye skjelltap, mange sårete ryggfinner med aktiv skade (blodig og flisete), noen med blodflekker i halen og rødprykkete i buk. Skjelltap og slitt ryggfinne er det mest markante, men det ser ikke ut til at det er et skille på diettene.



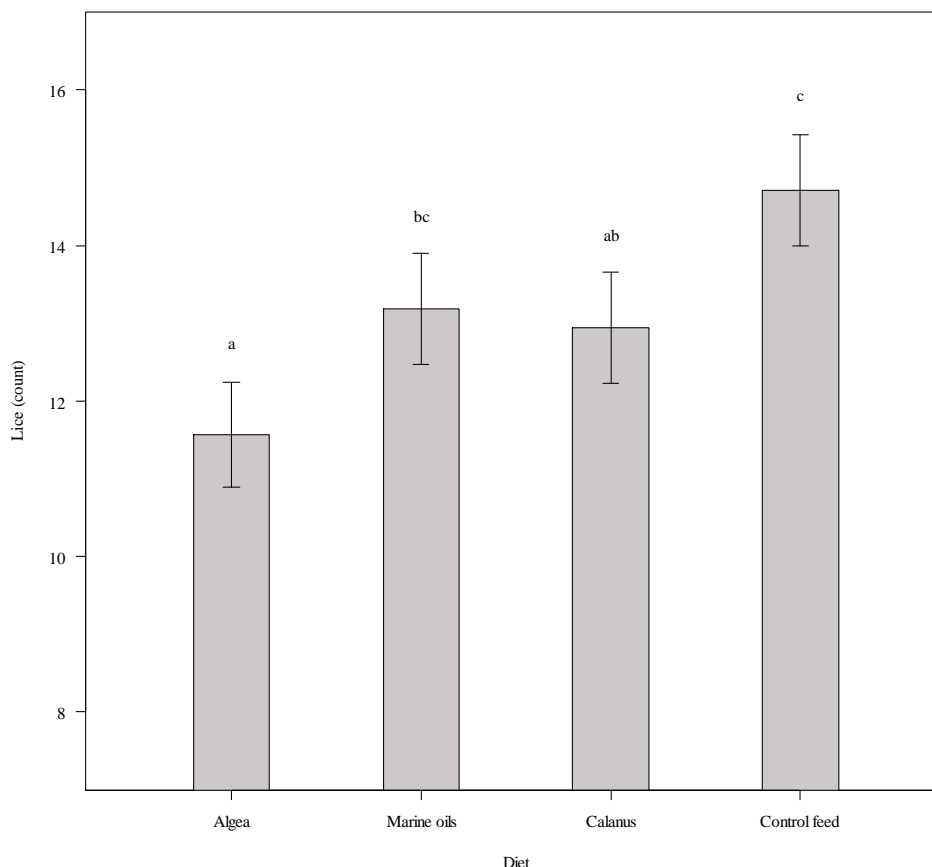
Bilde 4 Skjelltap og slitt ryggfinne som var vanlige ytre skader på fisken på uttak T1.

Ved veiing før flytting til fiskehelselaboratoriet T2 så fisken mye bedre ut med tanke på sår og skjelltap, og flere fisk hadde også vokst betydelig de siste 30 dagene i forhold til tilveksten den første perioden.

Ved avslutning og telling av lus T3 registreres det igjen en del skader på fisken. 2 fisk var død under smitteperioden (en fra hver diett A og D) og det observeres en god del sårete fisk, blant annet en del splitte finner, blodige finnestråler, i tillegg til sår på buk og sidene ved halen. Slike skader kan komme av lusepåslaget, stress ved håndtering og flytting av fisk osv. Siden det ikke er noen spesielle grupper som utmerker seg som mer skadeutsatt, så er sannsynligheten størst for at dette kommer av drift.

Tilvekst- og lusepåslagdataen er analysert med statistisk software R, versjon 3.4.0 (R Core Team, 2017). Forholdet mellom responsvariablene «antall lus» og korresponderende forklaringsvariabel diett; A. alger, B. marine olje, C. calanus og D. kontrollfôr, og Fultons kondisjonsfaktor ved avlivning, er undersøkt med bruk av generalisert lineær modellering (GLM). Fordi respons variabelen er telledata (ant. lus), ble familie Poisson med log link-funksjon valgt til å forklare spredningen. Etter modellen var klar ble det i tillegg utført en General Linær Hypoteste (glht) (Tukey post hoc test for GLM) for å sammenligne diettene.

Både diett og kondisjonsfaktor var signifikante for modellen og for antall lus. Fisk som hadde fått fôr med alger hadde signifikant lavere antall lus enn fisk som var fôret med kontrollfôr og marine oljer. Laks fôret med kontrollfôr hadde signifikant høyest forekomst av lus (Figur 5).



Figur 5 Lusepåslag registrert for de ulike diettene

5.3 Skinnanalyzer

For å se etter oxylinener i skinn av laks, valgte vi ut et sett med de mest studerte oxylinene i marine organismer: Decadienal, oktadienal og heptadienal. Standarder av disse ble kjøpt inn, og en metode for analyse av disse ble etablert ved bruk av væskechromatografi og høyopløselig massespektrometri (UHPLC-HR-MS). utfordringen med analyser av disse forbindelsene er at de er ustabile. Vi ønsket derfor å benytte en analysemetode som inneholdt færrest mulige steg slik at sjansen for at analyttene ble brutt ned ble minimalisert. Skinn av laks ble ekstrahert med en blanding av diklormetan og metanol, sentrifugert, og supernatanten ble redusert i volum under en strøm av nitrogen gass for å oppkonsentrere analyttene. Deretter ble prøvene injisert på en UHPLC-HR-MS. Vi klarte ikke å detektere noen av de tre oxylinene i våre prøver. Det kan skyldes at oxylinene ikke var tilstede i skinnprøvene, men det kan også skyldes at prøvene inneholdt oxylinene i så lave konsentrasjoner at de ikke ble detektert med den metoden vi benyttet.

5.4 Nytteverdi og videre anvendelse

Våre resultater er de første som viser at det er mulig å begrense lusepåslag ved bruk av mikroalger. Videre så viser forsøkene at også dyr som calanus på høyere trofisknivå har tilsvarende effekt om ikke så god som mikroalge. Videre viser forsøkene at tilvekst til laksen ikke blir påvirket ved bruk av alger i fôr noe som svært viktig ved en eventuell kommersialisering av resultatene. Resultatene vi har

oppnådd gjelder for dette forsøket under de gitte forutsetningene og bør repeteres for å validere funnene.

Ekstraksjon av olje fra mikroalger viste seg å være utfordrende og vanskelig å skalere opp og få lønnsom med dagens teknologi. Man bør jobbe videre med nye miljøvennlige metoder for å ekstrahere olje for å kunne nytte gjøre seg rein olje fra mikroalger. Våre forsøk viser derimot at bruk av hele mikroalger i fiskefôret gir et signifikant lavere lusepåslag enn et standard laksefôr som brukes i dag. Metoden er mulig å oppskalere til en kommersiell skala.

6 Hovedfunn

- Algetilsetning i laksedietten over en periode på 60 dager gir signifikant lavere påslag av lakselus i kontrollerte smittestudier.
- Algetilsetting i fôr gir ikke signifikant dårligere tilvekst enn standardfôr ved en fôringsperiode på 60 dager.
- Ekstraksjon av olje fra mikroalger viste seg å være utfordrende.
- Knusing og maling av alger i en kulemølle gjør det mulig å inkorporere hele mikroalger i laksefôr og gi god tilvekst for laksen.

7 Leveranser

Detaljert oversikt over leveransene i prosjektet:

2020		FHF sluttrapport	
2020		Manus vitenskapelig artikkel	
26.10.2019	Nrk.no	Håper ny fiskemat vil gi mindre lakselus	https://www.nrk.no/troms/haper-ny-fiskemat-vil-gi-mindre-lakselus-1.14756571
25.10.2019	NRK Troms morgensending	Alger mot lakselus	https://www.nrk.no/troms/alger-mot-lakselus-1.14756344
25.10.2019	Fiskeribladet/Tekfisk	Fôr med alger kan bidra til å holde lakselusen unna	https://fiskeribladet.no/tekfisk/nyheter/?artikkel=69686
24.10.2019	Aquafeed.com	Can microalgae reduce sea lice infection?	http://www.aquafeed.com/news/headline-news-article/9093/Can-microalgae-reduce-sea-lice-infection/
23.10.2019	Intrafish	UiT er et steg nærmere å holde lakselusen unna med fôr	https://www.intrafish.no/fou/1867834/uit-er-et-steg-naermere-aa-holde-lakselusen-unna-med-for
22.10.2019	Bladet Tromsø	Tromsø-forskere tror de har funnet en måte å holde lakselusa unna	https://www.itromso.no/nyheter/2019/10/22/Troms%C3%B8-forskere-tror-de-har-funnet-en-m%C3%A5te-%C3%A5-holde-lakselusa-unna-20217225.ece
15.10.2019	UiT.no	Hvordan bli kvitt lakselus?	https://uit.no/nyheter/artikkel?p_document_id=649503&p_dim=88163
15.10.2019	Ilaks.no	I dette smelteverket foregår det noe som kan hjelpe oppdrettere i lusekampen: dette er kjempespennende	https://ilaks.no/i-dette-smelteverket-foregar-det-noe-som-kan-hjelpe-oppdretterne-i-lusekampen-dette-er-kjempespennende/
30.12.2018	Fremtid i nord	Skal se om algemat kan gi mindre lus hos oppdrettslaks	https://www.framtidinord.no/nyheter/2018/12/30/Skal-se-om-algemat-kan-gi-mindre-lus-hos-oppdrettslaks-18158483.ece
28.12.2018	Troms folkeblad	Skal se om algemat kan gi mindre lus hos oppdrettslaks	https://www.folkebladet.no/nyheter/2018/12/28/Skal-se-om-algemat-kan-gi-mindre-lus-hos-oppdrettslaks-18154364.ece
23.11.2018	Kyst.no	Tester om algefôr kan gi mindre lusepåslag hos laks	https://www.kyst.no/article/kan-algefr-gi-mindre-lusepaaslag-hos-laks/

8 Referanser

- Adolph, S., S. Bach, M. Blondel, A. Cueff, M. Moreau, G. Pohnert, S. A. Poulet, T. Wichard & A. Zuccaro (2004). Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla. *Journal of Experimental Biology*, **207**:17, pp. 2935–2946.
- Aursand, M., B. Bleivik, J.R. Rainuzzo, J. Leif & V. Mohr (1994). Lipid distribution and composition of commercially farmed atlantic salmon (salmosalar). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **64**:2, pp. 239–248.
- Barofsky, A., P. Simonelli, C. Vidoudez, C. Troedsson, J.C. Nejstgaard, H.H. Jakobsen & G. Pohnert (2010). Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* spp. *Journal of Plankton Research*, **32**:3, pp. 263–272.
- Barton, D., K. Nakanishi & O. Meth-Cohn (1999). *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier Ltd.
- Borowitzka, M. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, **7**:1, pp. 3–15.
- Burka, J.F., M.D. Fast & C.W. Revie (2012). *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*. Wallingford:CABI Publishing, Wallingford.
- Cribari-Neto, F. (2004) Asymptotic inference under heteroskedasticity of unknown form. *Computational Statistics and Data Analysis*, **45**, pp. 215–233.
- Caldwell, G.S. (2009). The influence of bioactive oxylipins from marine diatoms on invertebrate reproduction and development. *Mar Drugs*, **7**:3, pp. 367–400.
- d'Ippolito, G., G. Romano, T. Caruso, A. Spinella, G. Cimino & A. Fontana (2003). Production of Octadienal in the Marine Diatom *Skeletonema costatum*. *Organic Letters*, **5**:6, pp. 885–887.
- Degerlund, M. & H. Eilertsen (2010). Main Species Characteristics of Phytoplankton Spring Blooms in NE Atlantic and Arctic Waters (68–80° N). *Estuaries and Coasts*, **33**:2, pp. 242–269.
- Douglas, H.D., 3rd (2013). Colonial seabird's paralytic perfume slows lice down: an opportunity for parasite-mediated selection? *Int J Parasitol*, **43**:5, pp. 399–407.
- Eilertsen, H.C., B. Schei & J.P. Taasen (1981). Investigations on the plankton community of Balsfjorden, Northern Norway. The phytoplankton 1976–1978. Abundance, species composition, and succession. *Sarsia*, **66**, pp. 129–141.
- Eilertsen, H.C. & J. Raa (1995). Toxins in seawater produced by a common phytoplankter: *phaeocystis pouchetii*. *Journal of marine biotechnology*, **3**:1, pp. 115–119.
- Feussner, I. & C. Wasternack (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, pp. 275–297.
- Field, C.B., M.J. Behrenfeld, J.T. Randerson & P. Falkowski (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, **281**:5374, pp. 237–240.
- Fox, J. (2016) *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*, Third Edition. Sage.
- Fox, J. & S. Weisberg (2019). *An R Companion to Applied Regression*, Third Edition, Sage.
- Games, P.A. & J.F. Howell (1976). Pairwise multiple comparison procedures with unequal N's and/or variances: A Monte Carlo study. *Journal of Educational Statistics*, **1**:2, pp. 113–125.
- Hansen, E., A. Ernstsen & H.C. Eilertsen (2004). Isolation and characterisation of a cytotoxic polyunsaturated aldehyde from the marine phytoplankter *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim. *Toxicology*, **199**:2-3, pp. 207–217.
- Hansen, E., Y. Even & A.M. Genevriere (2004). The alpha, beta, gamma, delta-unsaturated aldehyde 2-trans-4-trans-decadienal disturbs DNA replication and mitotic events in early sea urchin embryos. *Toxicol Sci*, **81**:1, pp. 190–197.

- Huseby, S., M. Degerlund, G.K. Eriksen, R.A. Ingebrigtsen, H.C. Eilertsen & E. Hansen (2013). Chemical Diversity as a Function of Temperature in Six Northern Diatom Species. *Marine Drugs*, **11**:11, pp. 4232–4245.
- Ianora, A. & A. Miralto (2010). Toxigenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes: a review. *Ecotoxicology*, **19**, pp. 493–511.
- Ianora, A., S.A. Poulet, A. Miralto & R. Grottoli (1996). The diatom *Thalassiosira rotula* affects reproductive success in the copepod *Acartia clausi*. *Marine Biology*, **125**:2, pp. 279–286.
- Johnson, S.C. (1998). Crustacean Parasites. Fisheries and Oceans Canada: Nanaimo, BC.
- Long, J.S. & L.H. Ervin (2000). Using heteroscedasticity consistent standard errors in the linear regression model. *The American Statistician*, **54**, pp. 217–224.
- Miralto, A., G. Barone, G. Romano, S.A. Poulet, A. Ianora, G.L. Russo, I. Buttino, G. Mazzarella, M. Laabir, M. Cabrini & M.G. Giacobbe (1999). The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, **402**:6758, pp. 173–176.
- Mosblech, A., I. Feussner & I. Heilmann (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem*, **47**:6, pp. 511–517.
- Nelson, D.M., P. Treguer, M.A. Brzezinski, A. Leynaert & B. Queguiner (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles*, **9**:3, pp. 359–372.
- Pohnert, G. (2005). Diatom/copepod interactions in plankton: the indirect chemical defense of unicellular algae. *Chembiochem*, **6**:6, pp. 946–959.
- Schlegel, A. (2016). Gameshowell. R. <https://gist.github.com/aschleg/ea7942efc6108aedfa9ec98aeb6c2096> (Accessed November 2019).
- Smetacek, V. (2001). A watery arms race. *Nature*, **411**:6839, pp. 745–745.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- White, H. (1980). A heteroskedastic consistent covariance matrix estimator and a direct test of heteroskedasticity. *Econometrica*, **48**, pp. 817–838.
- Wickham, H. (2016). *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag New York.

