

EX-spot: Mørke flekker i laksefilet

Årsak til dannelse og tiltak som hemmer utvikling

Faglig sluttrapport

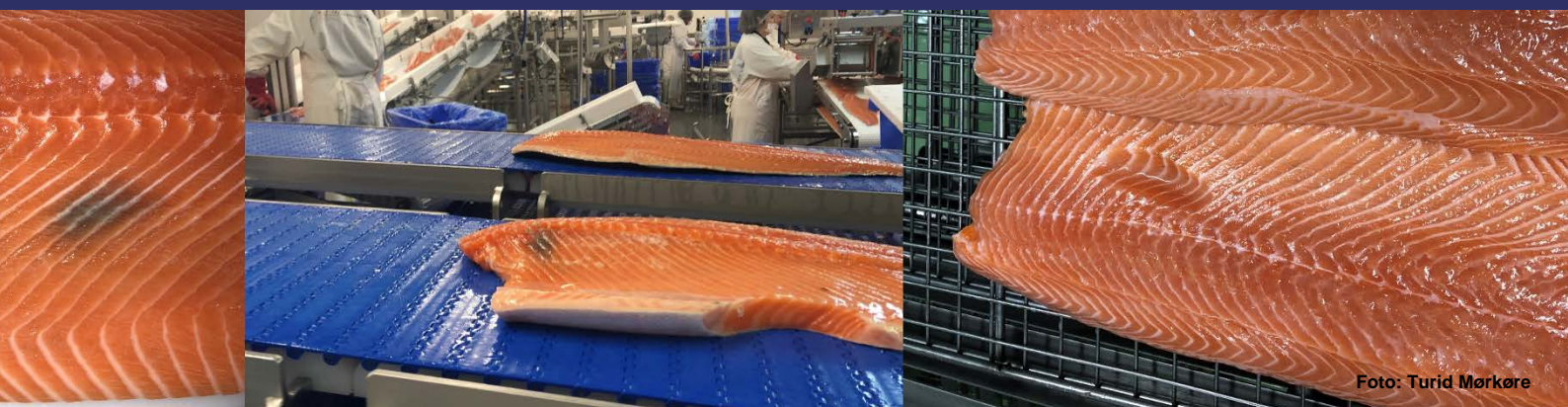


Foto: Turid Mørkøre

Turid Mørkøre¹, Thomas Larsson¹, Raúl Jiménez-Guerrero², Helena Moreno³, Javier Borderias⁴, Bente Ruyter¹, Inger B. Standal⁵, Antonio Sarno⁵, Øystein Evensen⁶, Jens-Erik Dessen¹, Kjell-Arne Rørvik¹, Kristin Hamre⁷, Øivind Andersen¹, Kawasaki Wakamatsu⁸, Shosuke Ito⁸, Kjellrun H. Gannestad¹, Cheng Xu⁶, Tone-Kari Østbye¹, Borghild Hillestad⁹, Jacob Torgersen¹⁰ og Grete Bæverfjord¹

¹ Nofima

² Fakultet for biovitenskap, Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap, NMBU

³ Departmental Section of Food Technology of Veterinary Faculty at Madrid Complutense University (UCM), Madrid, Spania

⁴ Institute of Food Science and Technology and Nutrition, Madrid, Spania

⁵ SINTEF Ocean, Trondheim

⁶ Veterinærhøgskolen, Institutt for parakliniske fag, Faggruppe for akvamedisin, NMBU

⁷ Avdeling for Fôr og ernæring, Havforskningsinstituttet, Bergen, Norge

⁸ Fujita Health University, Japan

⁹ Benchmark Genetics

¹⁰ AquaGen, Ås, Norge

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsen gate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunnalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 27/2022	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-729-7	<i>ISSN:</i> 1890-579X
----------------------------------	-----------------------------------	---------------------------

<i>Dato:</i> 8. desember 2022	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 69 + 4	<i>Prosjektnummer:</i> 12366
----------------------------------	--	---------------------------------

<i>Tittel:</i> EX-spot: Mørke flekker i laksefilet. Årsak til dannelse og tiltak som hemmer utvikling

<i>Title:</i> EX-spot: Dark spots in salmon fillet. Cause of dark spots and preventive measures
--

<i>Forfatter(e):</i> Turid Mørkøre, Thomas Larsson, Raúl Jiménez-Guerrero, Helena Moreno, Javier Borderias, Bente Ruyter, Inger B. Standal, Antonio Sarno, Øystein Evensen, Jens-Erik Dessen, Kjell-Arne Rørvik, Kristin Hamre, Øivind Andersen, Kawasaki Wakamatsu, Shosuke Ito, Kjellrun H. Gannestad, Cheng Xu, Tone-Kari Østbye, Borghild Hillestad, Jacob Torgersen og Grete Bæverfjord

<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi
--

<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)

<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901487

<i>Stikkord:</i> Mørke flekker, melanin, kvalitet, oppdrettslaks

<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> - Mørke flekker oppstår etter overføring til sjø, sammenfallende med økt forekomst av ribbeinsbrudd og andre ribbeinsavvik. Flekkene kjennetegnes ved høyt innhold av fett og bindevev med avvikende sammensetning, betennelsesceller og eumelanin. Innhold av uønskede komponenter er under grenseverdier satt av myndighetene. - Blødninger i muskel grunnet klemskader, slag og fall kan utvikle seg til mørke flekker over tid. - Sjøtemperatur ved utsett og størrelsen på oppdrettsenhetene påvirker forekomsten av mørke flekker - Forekomsten av mørke flekker kan minskes ved å justere fôrets fett- og proteininnhold og fettsammensetning
--

<i>English summary/recommendation:</i> - Dark spots occur after transfer to sea, coinciding with increased rib fractures/-abnormalities. Spots are characterized by accumulation of fat and connective tissue with altered structure, inflammatory cells and eumelanin. The level of unwanted components is below limit values set by the authorities. The prevalence is affected by the temperature at sea transfer, the size of the rearing units and feed composition (fat/protein ratio and fatty acid composition).

Forord

I dette prosjektet inngikk flere fôringsforsøk, celleforsøk samt forsøk der betydningen av miljøforhold ble belyst for utvikling av mørke flekker. I tillegg jobbet vi med utvikling av metoder for analyse av melaninpigmenter i laksefilet og cellekulturer, innenlands og hos internasjonal forskningspartner, kjent for melaninanalyser i andre arter. Det ble opprettet samarbeid med en rekke andre forskningsprosjekter for å utnytte kostbare forsøk som ikke hadde mørke flekker som forskningsspørsmål. Det utstrakte samarbeidet med prosjekter i små- og kommersiell skala har vært en kostnadseffektiv måte å øke kunnskapen om faktorer av betydning for utvikling av mørke flekker. Samarbeidet har vært tilknyttet forsøk finansiert av andre FHF prosjekter, Norges forskningsråd, Benchmark Genetics (SalmoBreed), Cermaq, Cargill og Lerøy. I tillegg har prosjektet hatt stor nytte av tett dialog og utveksling av data og informasjon med bedrifter slik som Nordlaks, Midtnorsk Havbruk, Biomar samt oppdrettsselskaper i Chile og på Færøyene.

Prosjektet bød på en del utfordringer. Først og fremst begrenset eller umuliggjorde koronasituasjonen tilgang til forsøksfasiliteter/laboratorier og kommersielle anlegg. Når slikt skjer, er det ikke bare å starte opp igjen der en slapp – spesielt siden prosjektet hadde som mål å undersøke langtidseffekter ved fôring i ferskvann for utvikling av mørke flekker ved slakt. Også for laboratorieforsøk med planlagt innhenting av celler fra fisk fra spesifikke fôringsforsøk er det kritisk når tilgangen til fisken begrenses og laboratoriene stenges. For å kompensere for tapt fiskemateriale, innhentet vi materiale fra alternative forsøk. Takk til dere som har bidratt! Forholdene medførte en del forsinkelser, men vi klarte å gjennomføre de fleste planlagte aktiviteter i prosjektet.

Flere studenter har tatt sine bachelor- og mastergradsoppgaver i tilknytning til forsøkene i prosjektet (Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) og Nord Universitet). Studentoppgavene har bidratt med vesentlig tilleggs kunnskap og utdanning av kandidater til blant annet norsk oppdrettsnæring.

Siden det er internasjonale partnere/ikke norskspråklige deltakere i prosjektet, er språket i rapporten delvis norsk og delvis engelsk.

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Summary	3
3	Innledning	4
3.1	Faglig bakgrunn	4
3.2	Omfang	6
3.3	Organisering	7
3.4	Referansegruppe	8
4	Problemstilling og formål	9
5	Prosjektgjennomføring	10
5.1	Fôringsforsøk	10
5.2	Ribbein	11
5.3	Celleforsøk	12
5.4	Genetikk og karakterisering av mørke flekker	12
6	Ribbeinsavvik, metodeutvikling	13
6.1	Fiskemateriale	13
6.2	Ribbeinsavvik	14
7	Fôr	16
7.1	Proteinnivå i fôr til laks i storskala oppdrett	16
7.2	Marine vs. plantebaserte ingredienser	18
7.3	Hvor mye marint omega-3 bør fôret inneholde for å hemme utvikling av mørke flekker i laksefilet?	22
8	Miljø og håndtering	24
8.1	Oppvekstmiljø	24
8.2	Fotoperiode og temperaturregime i ferskvann (CtrlAqua)	29
8.3	Tidspunkt for utsett av smolt (Nordlaks)	31
8.4	Kobber	33
8.5	Klemskader	33
8.6	Slag- og klemskader ved sortering	35
9	Genetikk	37
9.1	Fiskemateriale	37
10	Karakterisering av mørke flekker	40
10.1	Registrering av mørke flekker og prøvetaking	40
10.2	Fettinnhold og fettsammensetning	41
10.3	Histologi	43
10.4	Bindevev og aminosyreprofil	44
10.5	Pigmentanalyser	46
10.6	Uønskede komponenter / fremmedstoffer og mineraler	46

10.7	Mulig utvikling	47
11	Cellemodeller - 1	48
11.1	Bakgrunn	48
11.2	Mål	49
11.3	Metodikk	49
11.4	Resultater	51
12	Cellemodeller - 2	56
13	Leveranser	64
13.1	Poster, faktaark (5)	64
13.2	Populærvitenskapelige artikler (4)	64
13.3	Vitenskapelige artikler (4)	64
13.4	Presentasjoner (14)	64
13.5	Andre omtaler	65
13.6	Mastergrader (8)	66
13.7	Bachelorgrader (1)	67
14	Referanser	68

1 Sammendrag

Mørke flekker er den mest kostnadskrevede kvalitetsutfordringen i norsk lakseoppdrett. Flekkene er et lokalt kvalitetsproblem som hovedsakelig skyldes deponering av mørke pigmenter i skadet vev, mens filetfargen og teksturen er upåvirket. Flekkene kan også være røde, men omfanget av disse er lavere. Hovedfokus i prosjektet har vært å fremskaffe kunnskap om hvorfor nettopp bukområdet av laksefileten er så utsatt for å utvikle mørke flekker. Vi har fulgt fisk fra yngel til slaktevekt for å forstå hva som initierer dannelsen av flekkene og utvikling over tid. Små- og storskalaforsøk har blitt utført parallelt, mens grunnleggende mekanismer som påvirker melanin-syntese ble studert i *in-vitro* modellstudier. Prosjektet har hatt utstrakt samarbeid med andre prosjekter med relevant problemstilling, men med andre fokusområder enn mørke flekker. Flere studenter har tatt sine master- og bacheloroppgaver i tilknytning til prosjektet, samt en PhD student. Slik har prosjektet også generert kunnskap utover de sentrale forskningsspørsmålene.

Mørke flekker har blitt grundig undersøkt i prosjektet. Resultatene viser at innholdet av helseskadelige forbindelser for mennesker ligger godt under grenseverdier satt av myndighetene. Flekkene kjennetegnes ved økt forekomst av ribbeinsavvik og brudd, avvikende bindevevsstruktur og akkumulering av fett, bindevev, betennelsesceller og (eu)melanin. Resultatene tyder på ubalanse i fettomsetningen i de røde flekkene, med kraftig akkumulering av mettede fettsyrer og lavt innhold av EPA og DHA i fosfolipidene (membranfettet). Fargen i røde flekker skyldes blod og/eller noen spesifikke, oksyderte proteiner.

I både smolt i ferskvann og villaks var det åtte feil i ribbein i snitt per fisk. Etter smoltutsett i sjø hadde dette tallet økt til 20 feil per fisk, sammenfallende med at flekkene dukket opp. Det var ikke forskjell i avvikende ribbeinsmorfologi mellom villaks og oppdrettslaks i små kar på land. Det er viktig å avdekke årsaken til økningen i ribbeinsbrudd og andre avvik ved overføring til sjø, både av hensyn til filetkvaliteten og dyrevelferden.

Laks i små oppdrettsenheter på land utviklet ikke mørke flekker, mens i større enheter fant vi flekker – både i laks oppdrettet på land i RAS og i sjø. Det ser derved ut til at størrelsen på oppdrettsenheten har betydning for utvikling av mørke flekker. Vi har sett dette gjentatte ganger, men årsaken er uklar.

Laks som var oppdrettet i storskala merder i sjø hadde betydelig færre mørke flekker når den fikk et magert (30 % vs. 35 % fett), proteinrikt (45 % vs. 35 % protein) fôr sammenlignet med et standard fôr. Forskjellen var betydelig gjennom hele oppdrettsfasen og ved slakt var andelen fileter med flekker halvert for laksen som fikk det magre, proteinrike fôret. For store, problematiske flekker var forekomsten ni ganger lavere enn for standardfôr. Slaktevekten var omtrent den samme for fôrgruppene (4,5 kg). Vi fant også langtidseffekter av fôr som laksen fikk i ferskvann, både på dødelighet, beinutvikling og kvalitet ved slakt. Det er viktig å følge opp disse resultatene som er basert på ekstremdietter, men som peker på at fôret i tidlige livsfaser har betydning for sjøfasen.

Resultater fra våre registreringer i forsøk kjørt i andre prosjekter og resultater fra publiserte forsøk spriker noe, men den generelle trenden er klar: Marint omega-3 hemmer utvikling av mørke flekker. Disse resultatene stemmer godt overens med våre resultater fra celleforsøk, som viste at DHA hemmer melaninsyntesen fra tyrosin i makrofager. Gevinsten ved å øke EPA+DHA innholdet i fôret fra 3-5 % til 5-7,5 % var på hele 11 %-poeng (fra 25 % til 14 %), og flekkene var også mindre. En økning av EPA+DHA nivået til 7,5-10 % ga en ytterligere reduksjon på 3 %-poeng. Konklusjonen er at innholdet av EPA og DHA i fôret bør være høyere enn 5 % for å minske risikoen for kraftig innslag av mørke flekker i fileten av oppdrettslaks.

Oppsummering for ulike størrelser av oppdrettsenheter i ferskvann og sjø

For å få en bedre forståelse av utløsende faktorer, har vi sammenstilt resultater fra mange forsøk som har vært direkte eller indirekte tilknyttet FHF-prosjekter i perioden 2012 – 2022. Sammenstillingen viser at størrelsen på oppdrettsenhetene peker seg ut som en relevant enkeltfaktor å se nærmere på i videre studier for å forstå hva som utløser deponering av mørke pigmenter i bukdelene av laksefilet.

Sammenstillingen tyder på at tilstedeværelse av PRV virus, innblanding av planteråstoff i fôret, vaksine og avlusing ikke er utløsende faktorer, selv om disse sannsynligvis påvirker graden av misfarging (dokumentert for fett/protein og fettsammensetning i fôret).

Ferskvann

Resultater fra småskala forsøk (småkar opp til 3 m³) er i hovedsak gjennomført på Nofima, Sunndalsøra (gjennomstrømming), men også ved NMBU (RAS). Resultatene er entydige: laksen hadde kun sporadiske, små røde flekker i filét (blødninger), men ingen svarte flekker.

Laks oppdrettet i kommersielle tanker hadde flere og større blødninger i filet enn laks oppdrettet i småkar. Forekomst av røde flekker ble særlig studert i laks som var oppdrettet i et kommersielt RAS anlegg med høy forekomst av røde flekker før overføring til sjø, spesielt i fremre bukområdet der slaktefisk har flest mørke flekker. Etter en gjennomgang av anlegget, pekte vi på operasjoner rundt sortering som særlig relevante å holde et øye med, mens operasjoner knyttet til vaksinerings ikke syntes å utgjøre en risiko for blødninger i muskel. Studier i modellskala med simulert sortering, viste at problemet med blødninger kunne minskes ved å unngå langvarig sprelling i luft på hardt underlag, at fisken ble hengende og sprelle, sammentrykt mellom stengene under sortering og høyt fall på stål etter sortering (se avsnitt 8.6).

Sjøvann

Etter overføring til åpne merder i sjø, dukker flekker opp i både små- og storskala, men flekkene i småskala har et betydelig lavere omfang, og de er også blekere og mindre. Småskalaforsøkene som danner grunnlaget for disse observasjonene ble gjennomført ved MOWI's anlegg på Averøy, Møre og Romsdal, LetSea, Dønna, Helgeland og GIFAS, Gildeskål, Nordland. Laks oppdrettet i større forsøksmerder hadde et høyere omfang av flekker og flekkene var større (større enn 1500 m³). Vi har ikke observert svarte flekker i laks oppdrettet i små tanker på land, men i større, kom og mersielle tanker forekommer flekker på lik linje med laks oppdrettet i merder i sjø.

Tabell 1 Oversikt over forekomst av røde og svarte filetflekker i laks oppdrettet i ulike størrelser av oppdrettsenheter i ferskvann og sjø, om laksen var positiv for PRV, hadde fått plante-basert fôr, var vaksinert eller avluset.

	RØDE FLEKKER		SVARTE FLEKKER		PRV positive	Planteoljer/ - protein i fôret	Vaksinerte	Avluset
	Små	Store	Små	Store				
FERSKVANN								
Små kar på land, 0.6-3m ³	Ja	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja & Nei	Ja & Nei	Nei
Kommersielle tanker (RAS)	Ja	Ja	Nei	Nei	Ja & Nei	Ja	Ja	Nei
SJØVANN								
Villfisk	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei
<i>På land</i>								
Små kar på land (3-6m ³)	Ja & nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Ja & Nei	Ja & Nei	Nei
Større tanker på land, RAS (1000m ³)	Ja	-	Ja	Ja & Nei	Nei	Ja	Ja & Nei	Nei
Kommersielle tanker på land, RAS (>10.000m ³)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja & Nei	Ja	Ja	Nei
<i>I sjø</i>								
Små merder, forskning 125m ³	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja & Nei	Ja & Nei	Ja & Nei	Ja & Nei
Medium merder, forskning, >1500m ³	Ja	Ja	Ja	Ja	Nei	Ja	Ja	Ja & Nei
Store merder, kommersielle, ≥ 130m diam og >25m dype	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

2 Summary

Focal black spots represent the costliest quality challenge in Norwegian salmon farming. The spots are a local quality problem, mainly due to the deposition of dark pigments in damaged tissue. The spots can also be red, but the occurrence of these is lower, and probably the rise to black spot. The focus of the project has been to obtain basic knowledge about the cranio-ventral area of the fillets, where most spots are located. We have followed fish from fry to slaughter weight to understand what initiates the formation of the spots and development over time. Small- and large-scale experiments were carried out in parallel, while basic mechanisms affecting melanin synthesis were studied in *in-vitro* model studies. The project had extensive collaboration with other projects with relevant research focus, but not with emphasis on dark spots. Several graduate students received their degrees in connection with the project. Hence, the project also generated knowledge beyond the central research question.

Dark stained tissue was thoroughly investigated. The spots are characterized by increased occurrence of rib abnormalities and fractures, abnormal connective tissue structure and accumulation of fat, connective tissue, inflammatory cells and eumelanin. The results indicate an imbalance in fat metabolism in the red spots, with a strong accumulation of saturated fatty acids and a low content of EPA and DHA in the phospholipids (membrane fat). The color of red spots is due to blood and/or some specific, oxidized proteins. The content of compounds harmful to human health is well below the limit values set by the authorities.

The occurrence of fractures and other rib abnormalities more than doubled after the salmon were transferred to large cages at sea, coinciding with the appearance of spots. There was no difference in abnormal rib morphology between wild salmon and salmon farmed in small tanks on land. It is important to uncover the reason for the significant increase in deviating rib morphology during the period of transfer to commercial sea cages; both for reasons of fillet quality and animal welfare.

Salmon in small farming units on land did not develop dark spots, while in larger units we found spots - both in salmon farmed on land in RAS and in the cages in open sea. It thus appears that the size of the farming unit plays a role for the development of dark spots. We have seen this repeatedly, but the reason is still unclear.

Salmon reared in large-scale cages at sea had significantly fewer dark spots when fed a lean (30 % vs 35 % fat), high-protein (45 % vs 35 % protein) feed compared to a standard feed. The difference was significant throughout the seawater rearing phase, and at slaughter the proportion of fillets with spots was halved for the salmon fed the lean, high protein diet. For large, problematic spots, the incidence was 9 times lower compared to standard feed. Carcass weight was approximately the same for the feed groups (4.5 kg).

Through collaboration with other projects, we had access to relevant experimental material and the opportunity to enhance our knowledge about causes of dark spots and limiting measures. Results from registrations in these trials, and results from published trials differ somewhat, but the general trend is clear: Marine omega-3 inhibits the development of dark spots. These findings agree with our results obtained in *in-vitro* cell models, showing that DHA inhibits melanin synthesis from tyrosine in macrophages. The positive effect by increasing the EPA+DHA content in the feed from 3-5 % to 5-7.5 % was as much as 11 %-points; i.e. a drop from 25 % to 14 %, and the spots were smaller. An increase of the EPA+DHA level to 7.5-10 % gave a further reduction of 3 %-points. The conclusion is that the content of EPA and DHA in the feed should be higher than 5 % to reduce the risk of severe dark pigment deposition in the fillets of farmed salmon.

3 Innledning

Laksenæringen rangerer mørke filetflekker som det mest kostnadskrevede kvalitetsavviket som må løses i fremtiden. Tapet som bedriftene rapporterer om er 5 % for små flekker (2-3 cm), mens større flekker representerer et økonomisk tap på 30-100 % (Färber, 2017). Mørke filetflekker er et problem som FHF's Handlingsplan for 2018 hadde som et prioritert forskningsområde. Spesielt ble det pekt på viktighet av å finne årsak(er) til at flekkene oppstår og å utvikle tiltak som hemmer utvikling, og dette var også målsetningen i dette prosjektet.

3.1 Faglig bakgrunn

Forskningsinnsatsen knyttet til mørke filetflekker ble iverksatt i 2011 da næringen rapporterte om økt omfang (FHF900285). I 2003 var andelen norske fileter med flekker på 7 % mens forekomsten hadde økt til 19 % i 2016 (FHF900824). Det finnes ikke statistikk over forekomsten på landsbasis i dag, men bedriftene rapporterer om redusert omfang og størrelsen av flekkene har blitt mindre. Mest sannsynlig har resultater fra tidligere FHF-prosjekt, med anbefalinger knyttet til håndtering og fôr, bidratt til at nivået i dag er noe lavere enn i 2016 – antatt 16 % gjennomsnitt basert på tilbakemeldinger og registreringer hos utvalgte bedrifter.

Økningen av mørke flekker skjedde i en periode med økt innblanding av planteråvarer i fôret og var sammenfallende med økende utbrudd av pankreas sykdom (PD) og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB). Men også andre forhold har endret seg de senere årene, bl.a. oppdrettsforhold med større enheter, økt håndtering og endrede produksjonsregimer. Vi vet at laks med PD har økt risiko for å utvikle mørke flekker, mens betydningen av andre sykdommer er mer usikker.

Over 90 % av flekkene sitter i et avgrenset område under bukhinna, i tilknytning til ribbeina. Flekkene kan være røde eller svarte/grå og størrelsen på flekkene kan variere. De fleste flekkene er opp til 3 cm brede og noen få mm i tykkelse. De første filetflekkene observeres tidlig i sjøvannsfasen, med økende omfang, størrelse og fargeintensitet mot slakt. Som regel er de første flekkene som observeres i sjøfasen røde, og forekomsten av disse er oftest ganske konstant frem til slakt (3-10 %). De første mørke flekkene dukker ofte opp etter at fisken har vært i sjøen i noen måneder. Forekomsten øker gjerne mot slakt, men vi har ikke sett noen generell forskjell i forekomst mellom fiskestørrelser over 3 kg.

Det kan være vanskelig å se flekker gjennom bukhinnen i sløyd fisk, som betyr at en del fisk med mørke flekker i filet eksporteres. Ved filetering blir flekkene trimmet bort. Det medfører merarbeid, svinn og avvikende utseende (Figur 1). Den generelle betegnelsen for mørke flekker er «melaninflekker», men det er uklart om andre pigmenttyper bidrar til misfargingen. Rød eller gråsvart misfarging sees ofte først i de fettrike bindevevsdragene mellom muskelsegmentene i bukområdet der ribbena sitter. Økt kunnskap om ribbenspatologi, sirkulasjonssystemet og kjennetegn for mørkpigmentert vev kan øke forståelsen for hvorfor de mørke flekkene oppstår i nettopp bukområdet, og utviklingen av dem.

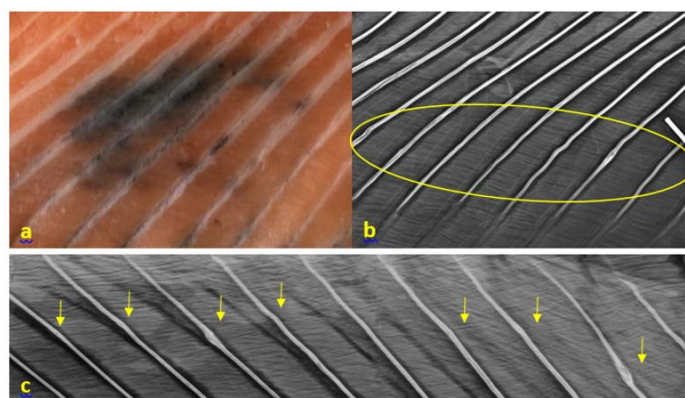


Figur 1 Typisk mørk flekk i filet av oppdrettslaks (bilde til venstre). Mørke flekker blir trimmet bort. Det medfører merarbeid, svinn og avvikende utseende (bilde til høyre) (foto T.Mørkøre).

Mørke filetflekker er et lokalt kvalitetsproblem mens filetfargen og teksturen er upåvirket. Årsaken til de lokale vevsskadene er ukjent, men de kjennetegnes med betennelse med akutte og/eller kroniske forandringer som er tilsvarende for små og store flekker (Brandshaug, 2016). Våre observasjoner av røde flekker i ribbensområdet i smolt, tyder på at vevsskadene kan oppstå allerede i ferskvannsfasen. Vi kjenner ikke utviklingen av flekkene, eller om de blir borte med tiden.

Flekker som visuelt fremstår som blodflekker kan ha samme type forandringer som mørke flekker (FHF900824). Det er behov for mer kunnskap om de patologiske prosessene og karakterisering av pigmenttyper i flekkene for å avdekke utløsende faktorer. Vev fra mørkpigmenterte flekker har høyt innhold av bindevev med unormal struktur (FHF900824). Andre kjennetegn er hard muskel grunnet arrdannelse og forhøyet innhold av enkelte mineraler som jern, sink, kobber og fosfor. Melanin er en effektiv bio-adsorber av fremmedstoffer. Våre tidligere studier har ikke påvist økt nivå av uønskede stoffer i mørke flekker, men det er behov for ytterligere dokumentasjon.

Røntgenundersøkelser ved Nofima i 2016-17 viste at ribbein i oppdrettslaks har til dels vesentlige avvik fra normalen. Avvikene sees hovedsakelig i bukområdet av fileten, men også i ryggstrålene. Siden ribbeinsavvikene i stor grad sitter i samme område som mørke flekker, er det hensiktsmessig å undersøke om det kan finnes en sammenheng (Figur 2) – vi trenger kunnskap om hva som kommer først, beinpatologien eller melaninavleiringen, eller om begge er utslag av en annen og hittil ukjent årsaksfaktor. I studier av mørke flekker har ribbeina sjelden eller aldri vært undersøkt. Det er behov for å forstå samspillet mellom bein, bindevev og muskel, gjennom å studere de ulike vevene systematisk i samme fisk. Dersom avvikene i ribbein kan knyttes til patogenesen av de mørke flekkene, er det tilsvarende viktig å finne mulige årsaker til at ribbeina utvikler seg unormalt, og om det er noen sammenheng med avvik i ryggvirvler, der kunnskapen om årsakssammenhenger er større.



Figur 2 Avvik i ribbein. a) og b) viser en melaninflekk i muskel, og røntgenbilde av samme utsnitt. På røntgenbildet (innringet) vises en rekke mindre uregelmessigheter i ribbein i området for melaninavleiring. c) viser tilsvarende ulike former for avvik fra en annen fiskegruppe. Disse observasjonene danner grunnlaget for videre undersøkelser.

Proteinrike fôr kan se ut til å redusere omfanget av mørke flekker, men ferske studier ved Nofima viser at visse proteinfôrmidler gir økt uttrykk av Cytochrome P450 26A1 (CYP26A1), og i tillegg Pmel17, som er et melanocyt-protein som bidrar i deponering av eumelanin i pattedyr (McGlinchey m.fl., 2009). Vi har vist at ekstra antioksidanter i fôret (Vit E, C, Se) kan minske forekomsten av mørke filetflekker (FHF900824). Melanogenesen øker når nivået av intracellulære antioksidanter er lavt (f.eks. glutathione, GSH) (Galvan & Alonso-Alvarez, 2008), og antioksidantfunksjonen av melanin antas å være en hovedårsak til melanomakrofager i affisert vev (Meyskens m.fl. 2001). Det er interessant at forstyrret signaloverføring/nedbrytning av nerveceller (f.eks. makulapati) kjennetegnes ved intracellulært hyperfosforulerte neurofibrillare «floker» (tau-protein) og ekstracellulært plakk av Amyloid-beta peptid (A β , 4 kD), sammen med opphopning av de samme metall-ionene som er unormalt høye i mørke flekker (Zn, Fe, Cu, P). Vi har også sett at kollagentrådene i mørke flekker fremstår som «floker» under mikroskop (TEM) (FHF900824). Cellestudier (melanoma B16F10) har vist at fettsyren DHA hemmer α -MSH-indusert melaninsyntese (Balcos m.fl. 2014). I en nylig studie hadde laks som fikk økt EPA+DHA i fôret færre mørke filetflekker (Sissener m.fl. 2016), og fôr med DHA-rike alger har likeledes gitt redusert omfang av mørke flekker (FHF901037). Ekstra sink og krill har gitt en viss reduksjon, mens forhøyet kobber har vist en markant økning (FHF900824). Det er uvisst om fôrkomponenter som påvirker skjelettets styrke også påvirker omfanget av mørke flekker.

Oksidativt-/metabolsk stress bidrar i patogenesen av mange sykdommer. *In-vitro* studier har vist at inflammatoriske synteseveier og immunrespons oppreguleres i A β -stimulerte (RPE) celler. Mangel på A-vitamin fremmer oppregulering av CYP26A1 avhengig av helsestatus og nærvær av visse bioaktive komponenter. CYP26A1 anses som en god markør for fettlever i mennesker (Ashla m.fl. 2010). Årsaken til at dette trekkes frem er den økende forekomsten av fettlever hos oppdrettslaks. Våre studier har vist at høy innblanding av rapsolje ga økt dødelighet og problematisk fettlever (FHF900653), men sammenhengen mellom nivå av rapsolje og andre vegetabiliske råvarer i fôret for utvikling av mørke flekker er ikke dokumentert.

Økologisk oppdrettet laks har ofte færre og svakere filetflekker enn konvensjonell laks (FHF900824). Generelt får økologisk laks mer fiskeolje i fôret og naturlige pigmentkilder. Det er mulig at økt høytrykksspyling av kobberimpregnerte nøter (avskalling av Cu/giftige Cu+H₂O₂) stimulerer melaninsyntese. Kobberimpregnering brukes ikke i økologisk oppdrett og medikamentell avlusing er uvanlig. Øvre grensen for tetthet er 10 kg/m³ vs. 25 kg/m³ i konvensjonelt oppdrett. Det er ukjent hvilke belastninger lakseskjelettet tåler og om skader i ribbeinsområdet er assosiert med mørke filetflekker. En teori er at lavere aktivitet/ færre brå bevegelser skåner skjelettet for belastninger og vevsskader, og derved gir færre mørke filetflekker i småmerder (i tråd med hypotesen om årsak til nekrose og atrofi i kylling). Lavt O₂-nivå, flytting av fisk, stress og fysisk trauma kan gi økt omfang. Målrettet avl har resultert i kortere produksjonstid/raskere vekst, men også endrede bindevevsegenskaper (Moreno m.fl. 2016). Effekten på mørke flekker er ikke kjent.

På et FHF-arbeidsmøte i september 2017, mente deltakerne at det er behov for mer kunnskap om utviklingen av mørke flekker over tid og betydningen av forhold i tidlige livsfaser for å forstå hvorfor flekkene oppstår. Mer kunnskap om fôreffekter og oppdrettsbetingelser var andre etterspurte fokusområder. Møtedeltakerne mente at det er viktig å holde fokus på ribbeinsområdet, og oppklare en eventuell kobling mellom avvikende utseende av ribbein og mørke flekker i oppdrettslaks. Vinklingen i dette prosjektet er basert på konklusjonene fra dette FHF møtet.

3.2 Omfang

Problemet med mørke flekker har vist seg å være komplekst. Derfor har prosjektet hatt en bred, men fokusert tilnærming for å avdekke årsaker til at flekkene oppstår og definere tiltak som kan dempe pigmentdeponering i bukområdet av laksefilet.

Hovedfokuset har vært å fremskaffe grunnleggende kunnskap om hvorfor nettopp bukområdet av laksefilet er så utsatt for å utvikle mørke flekker. Dette krever kunnskap om ribbeins-patologier, sirkulasjon og vevskarakterisering. Vi har fulgt fisk fra yngel til slaktevekt for å forstå hva som initierer dannelsen av flekkene/når i laksens liv skadene oppstår og utvikling over tid. Små- og storskalaforsøk har blitt utført parallelt, mens grunnleggende mekanismer som påvirker melanin-syntese ble studert i *in-vitro* modellstudier.

Samarbeid med andre prosjekter om fiskematerialer og analyser har vært en kostnadseffektiv tilnærming for å bidra til økt kunnskapsfangst. For å få nok misfarget vevsmateriale med tilstrekkelig variasjon, kreves et stort fiskemateriale. Vi samarbeidet derfor med FHF-prosjektet completeSCAN om et avlsmateriale med veldokumentert bakgrunn (2000 fisk). Vi har også innhentet relevant fisk fra kommersielt oppdrett.

I prosjektet er det gjennomført:

- Fôringsforsøk med fisk fra yngelstadiet frem til slakt ved ulike miljøbetingelser (små- og storskala) for å avdekke betydningen av fôr og miljø for utvikling av mørke flekker. Fiskematerialet fra fôringsforsøkene ble også benyttet til å undersøke forekomst av ribbeinsavvik og sammenheng mellom ribbeinsavvik og mørke flekker. Forsøkene i småskala ble gjennomført ved Nofimas forskningsstasjon, Sunndalsøra, NMBU Ås og sjøanlegget til Gifas forskningsstasjon. Storskalaforsøkene ble gjennomført ved Nofimas FoU-konsesjon, Lerøy Midt-Norge.
- Vevskarakterisering av mørke og røde flekker (fiskemateriale fra FHF-prosjektet completeSCAN og storskalaforsøket i sjø)
- Celleforsøk for å identifisere næringsstoffer som hemmer/stimulerer melaninsyntese, samt metodeutvikling for analysing av melaninsyntese i *in-vitro* forsøk (Nofima, NMBU, Sintef)
- Undersøkelser av fisk og data fra forsøk gjennomført i andre prosjekter med andre fokusområder enn mørke flekker for å avdekke betydning av:
 - Oppdrettsforhold og produksjonsregimer:
 - Prosjekter og bedrifter: CtrlAqua-prosjektet BENCHMARK; Midtnorsk Havbruk, Nordlaks, registreringer prosesslinje; Fredrikstad Seafood fiskemateriale
 - Fôrsammensetning med vekt på omega-3 (EPA, DHA):
 - Prosjektene Optihealth (FHF901282), A to omega-3, mikroalger (NFR 234057), Nye omega-3-kilder i fôr til laks (FHF901037) og Arctic Salmon Research Centre (Cermaq)

3.3 Organisering

Prosjektet ble gjennomført med Nofima AS som prosjekteier og med Turid Mørkøre som prosjektleder.

Forskningsområder, ansvarlige og sentrale medarbeidere i prosjektet er vist i Tabell 2 nedenfor. I tillegg til medarbeiderne i tabellen nedenfor, har teknisk personale vært involvert, både på forskningsstasjonene, på kommersielle anlegg og ved laboratoriene.

Tabell 2 Forskningsområder, ansvarlige og sentrale medarbeidere i prosjektet

			Fôr		Miljø		Karakterisering flekker					Sirku	Ribbein			Celleforsøk			
			Småskala	Storskala	Ferskvann	Sjø	Fett	Bindevev	Pigmenter	Toksiske komp	Genuttrykk	Histologi	Vaskularisering	Røntgen	Histologi	Mechanical	Kjemi	Gjennomføring	Genuttrykk
Ansvarlige	Turid Mørkøre	Nofima (NMBU)	x	x	x	x	x				x	x			x	x			
	Grete Bæverfjord	Nofima										x	x		x				
	Bente Ruyter	Nofima	x													x	x		
	Øivind Andersen	Nofima									x							x	
Sentrale medarbeidere	Thomas Larsson	Nofima	x			x			x						x				
	Jens-Erik Dessen	Nofima		x		x													
	Kjell-Arne Rørvik	Nofima		x		x													
	Tone-Kari Østbye	Nofima														x	x		
	Aleksei Krasnov	Nofima							x										
	Katerina Kousoulas	Nofima	x																
	Kjellrun H. Gannes	Nofima										x							
	Christian Karlsen	Nofima	x							x	x								
	Raul Jimenez-Gue	NMBU	x	x						x		x	x	x	x				
	Øystein Evensen	NMBU												x			x		
	Cheng Xu	NMBU														x	x		
	Kristin Hamre	Havforskningsinst							x										
	Inger B Standal	Sintef																x	
	Antonio Sarno	Sintef																x	
Kawasaki Wakam	Inst Melanin Chem, Japan							x											
Shosuke Ito	Inst Melanin Chem, Japan							x											
Helena Moreno	CSIC, Madrid							x											
Javier Borderias	CSIC, Madrid							x											
Jacob Torgersen	AquaGen									x									

3.4 Referansegruppe

Randi Nordstoga Haldorsen. Mowi ASA - Group Technical Manager Food Safety & Quality

Borghild Hillestad. Viking Aqua – Genetikksjef (tidligere SalmoBreed)

Thina Kobberstad. Nordlaks Produkter AS – Kvalitetssikringsleder

Trygve Sigholt. Biomar AS – Seniorforsker

Magnus Åsli. Cermaq Norway AS - Kvalitetskoordinator

4 Problemstilling og formål

Mørke flekker er den mest kostnadskrevenende kvalitetsutfordringen i norsk lakseoppdrett. Ut fra tilbakemeldinger fra næringen, antar vi at forekomsten ligger på rundt 16 % i dag i gjennomsnitt. Det er en reduksjon på ca. 3 %-poeng sammenlignet med andelen fileter med mørke flekker i 2016.

Ifølge en spørreundersøkelse blant norske og europeiske selskaper i 2017, gir små, svakt pigmenterte flekker et økonomisk tap på 5 %, tydelige 3 cm brede flekker et tap på 10 % og flekker på 3-6 cm et økonomisk tap på 30 %. Fileter med flekker større enn 6 cm utgår fra filetproduksjonen. Tar man utgangspunkt i disse estimatene, koster mørke flekker næringen et milliardbeløp. Det betyr at selv en begrenset reduksjon av forekomsten vil ha vesentlig økonomisk betydning, og betydning for omdømmet av norsk laks som et kvalitetsprodukt.

Prosjektet har hatt som mål å forstå årsaker til at mørke flekker oppstår i bukområdet til oppdrettslaks og å peke på praktiske tiltak som kan begrense forekomsten.

Prosjektet har hatt følgende delmål:

- 1) Frembringe grunnleggende kunnskap om bukdelen av fileten og kobling til utvikling av mørke flekker med vekt på ribbeinspatologi
- 2) Gjennomføre studier i små- og storskala samt i *in-vitro* modellsystemer for å forstå hva som initierer dannelsen av mørke flekker, på hvilke stadier i laksens liv skadene oppstår og utvikling over tid
- 3) Undersøke om oppdrettsbetingelser påvirker risikoen for at det dannes mørke flekker

5 Prosjektgjennomføring

I prosjektet ble det gjennomført to fôringsforsøk, innsamling av vevsmateriale fra en avlspopulasjon til karakterisering av mørke flekker og en rekke celleforsøk. Videre fikk vi fisk- og vevsmateriale fra andre prosjekter som ikke hadde mørke flekker som fokus. I prosjektet jobbet vi også med å utvikle metoder for analysering av melaninsyntese.

5.1 Fôringsforsøk

Fôringsforsøk 1 (2018-2020)

I det første fôringsforsøket benyttet vi laks fra samme smoltgruppe (Lerøy Belsvik) som ble transportert til småkar ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra og kommersielle nøter i sjø ved Nofimas FoU-konsesjon, Naustneset (Lerøy Midt), der laksen ble oppdrettet frem til slakt. Laksen ved begge lokaliteter fikk samme fôr (standard kommersielt fôr, Skretting). Det var kort avstand mellom lokalitetene (ca. 45 km; begge lokaliteter ved Tingvollfjorden). Siden laksen kom fra samme smoltgruppe og fôret var det samme, kunne vi undersøke betydningen av oppdrettsmiljø for utvikling av ribbensavvik og mørke flekker.

Laksen som ble oppdrettet i nøter i sjø, fikk i tillegg til standard fôr (protein 35 % og fett 35 %) også et proteinrikt fôr (protein 45 % og fett 30 %) for å undersøke om et magert, proteinrikt fôr kunne minske andelen fileter med mørke flekker, slik vi har sett tidligere hos laks etter PD diagnose.

Laks ble tatt ut til undersøkelse gjennom oppdrettsfasen og undersøkt for ribbeinsmorfologi og forekomst av mørke flekker (røde og svarte).

Vi benyttet 3-4 kar på land (0,6-3 m³) og 2-3 nøter per fôrtype i sjø (120 m omkrets og 30 m dype).



Figur 3 Laksen oppdrettet i kar på land eller i merder i sjø kom fra samme smoltprodusent (Lerøy Midt, Belsvik). I sjøfasen ble laksen oppdrettet enten i kommersielle merder i sjø eller i småkar på land (45 km mellom lokalitetene med merder i sjø og kar på land).

Fôringsforsøk 2 (2020-2021)

I dette forsøket fikk laksen vesentlig forskjellige fôr for å undersøke om fôrsammensetningen i ferskvannsfasen kan ha langtidseffekter på utvikling av mørke flekker og ribbensavvik. Fôret som ble produsert på Nofimas Fôrteknologisenter i Bergen hadde følgende sammensetning:

1. Marint protein + marin olje
2. Marint protein + planteolje
3. Planteprotein + marin olje
4. Planteprotein + planteolje

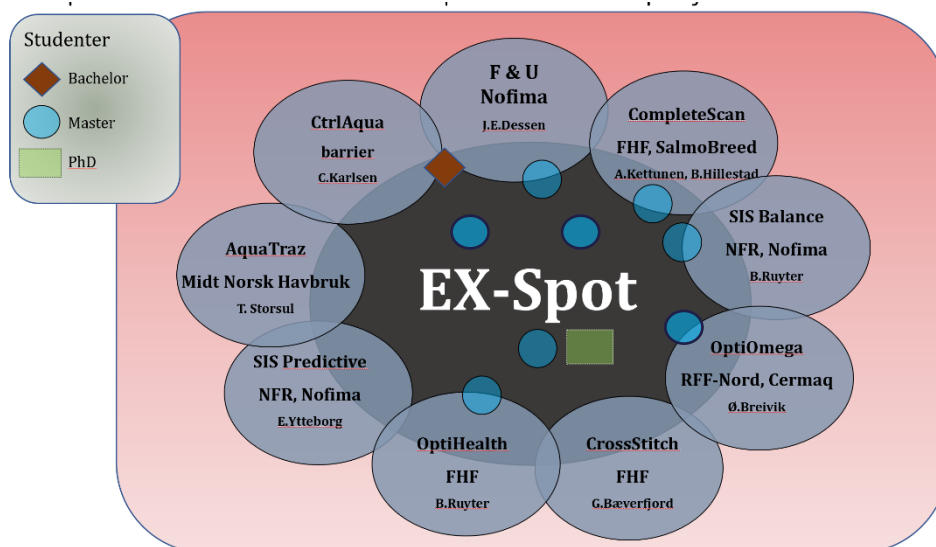
Laksen ble holdt ved Nofimas forskningsstasjon Sunndalsøra, frem til smoltifisering (3-4 kar per fôrgruppe). Laksen var PIT-tag merket ved 30 g og vaksinert etter en periode med lysstyring (12:12). Laksen ble overført til sjø september 2020, til enten 1) Åpne merder i sjø ved Gifas forskningsstasjon eller 2) til kar på land på Sunndalsøra.

Etter overføring til sjø fikk all fisk et standard kommersielt fôr – samme fôr til fisken i merder i sjø og til fisk i kar på land (Skretting, Norge).

1) Laks fra alle fire fôrgrupper ble transportert til Gifas forskningsstasjon der den gikk blandet i to 125 m³ nøter. Etter planen skulle laksen gå i sjøen frem til slakt, men dessverre måtte all fisk ved forskningsstasjonen slaktes etter at fisken hadde gått der i et halvt år (mars 2021). Årsaken var at et naboanlegg hadde fått påvist ILA.

2) Laks fra gruppe 1 (marint protein & marin olje) og gruppe 4 (planteolje & planteprotein) ble holdt i 3 m³ kar på land, bortsett fra de siste tre månedene før slakt da fisken ble overført til en 100 m³ enhet (RAS). Forsøket ble avsluttet i september 2021. Årsaken til at laksen ble overført til en større enhet er at vi ikke har sett utvikling av mørke flekker i små oppdrettsenheter, men i større RAS enheter på forskningsstasjonen på Sunndalsøra.

Figur 4 illustrerer prosjekter som EX-Spot samarbeidet med for å utnytte forsøksfisk som i utgangspunktet ikke ble undersøkt for mørke flekker. Figuren illustrerer også studenttilknytningen i prosjektene. Studentoppgavene (10 studenter) har frembrakt kunnskap utover det sentrale forskningsspørsmålet.



Figur 4 Oversikt over prosjekter som EX-Spot hadde samarbeid med og studenttilknytning

5.2 Ribbein

Ribbeinsmorfologi var et hovedfokusområde i prosjektet. Det ble etablert metodikk for å få en oversikt over forekomsten av avvikende ribbeinsmorfologi og for å undersøke betydningen av disse for utvikling av mørke flekker (røntgen og histologi). Det ble benyttet laks av ulike størrelser fra både små- og

storskalaproduksjon. I tillegg ble villaks undersøkt som kontroll. Fiskemateriale og fremgangsmåte er beskrevet i detalj her:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738697>

Det ble også gjennomført forsøk for å forstå praktiske forhold ved oppdrett som kan føre til ribbeinsbrudd og blødninger i ribbeinsområdet av fileter. Gjennomføring av disse forsøkene i modellskala ble basert på observasjoner ved kommersielle anlegg – bl.a. ble effekt av sortering av smolt undersøkt i modellsystemer ved NMBU Fiskelaboratorium, Ås.

5.3 Celleforsøk

I prosjektet ble det gjennomført celleforsøk, både ved Nofima og ved NMBU. Hovedfokuset i disse *in-vitro*-forsøkene har vært å studere mekanismer knyttet til syntese av melaninpigmenter og samspill med flerumettede fettsyrer (EPA og DHA). I disse forsøkene er det også lagt ned mye arbeid i å etablere metoder for analyse av relevante komponenter i melaninsyntesen.

5.4 Genetikk og karakterisering av mørke flekker

Laks fra en avlspopulasjon fra Benchmark Genetics (tidligere SalmoBreed) ble benyttet til å undersøke arvbarehet for mørke flekker. Siden dette fiskematerialet var på 2000 fisk, klarte vi å samle tilstrekkelig materiale/misfarget vev til biokjemisk karakterisering. Dette verdifulle materialet ble sendt til partnerne i prosjektet, både innenlands (Ås, Bergen, Trondheim) og til de internasjonale partnerne (Spania, Japan).

6 Ribbeinsavvik, metodeutvikling

Deltakere: Raúl Jiménez-Guerrero, Turid Mørkøre, Kjellrun H. Gannestad og Grete Bæverfjord

Det finnes betydelig kunnskap om typer ryggradsdeformiteter hos laks og årsaker til at de oppstår, mens ribbein i laks og i fisk som helhet er lite studert. Derfor ble det lagt ned et omfattende arbeid i å beskrive generell ribbensmorfologi hos laks og i å kartlegge forekomst av ulike typer ribbeinsavvik. Bedre forståelse for ribbeinsmorfologi er interessant for dette prosjektet fordi de fleste røde og svarte flekker ses i muskelen rett under ribbeina (over 90 %).

Resultatene av dette arbeidet ble publisert i *Aquaculture* som del av doktorgraden til Raúl Jiménez-Guerrero:

Jiménez-Guerrero m.fl. (2022) Rib abnormalities and their association with focal dark spots in Atlantic salmon filets, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738697>

6.1 Fiskemateriale

Fiskematerialet som ble brukt for å utvikle metoden var laks fra et forsøk der en smoltgruppe fra en kommersiell oppdretter (Lerøy Belsvik) ble overført enten til små kar på land (0,7 m³ gjennomstrømming) ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra eller til et kommersielt oppdrettsanlegg i sjø (Nofima F&U konsesjoner, Lerøy Midt Nausneset; åpne merder i sjø, 120 m omkrets og 40 m dype). Fisken ved begge oppdrettslokaliteter fikk det samme kommersielle fôret (Biomar) og beliggenheten for begge lokaliteter var i/ved Tingvollfjorden. Villaks fra Finnmark ble benyttet som kontrollgruppe (bifangst sjø). Tidspunkt for uttak, størrelsen på fisken og antall fisk analysert er vist i Tabell 3. Laksen som ble oppdrettet i sjø vokste fortere enn laksen oppdrettet på land (slaktevekt hhv. 4,5 kg og 3,2 kg). Villaksen som ble undersøkt for ribbeinsmorfologi ved røntgen veide 2,2 kg. For ytterligere detaljer om fiskemateriale og oppdrettsforhold, se Jiménez-Guerrero m.fl. (2022) og avsnitt 5.2.

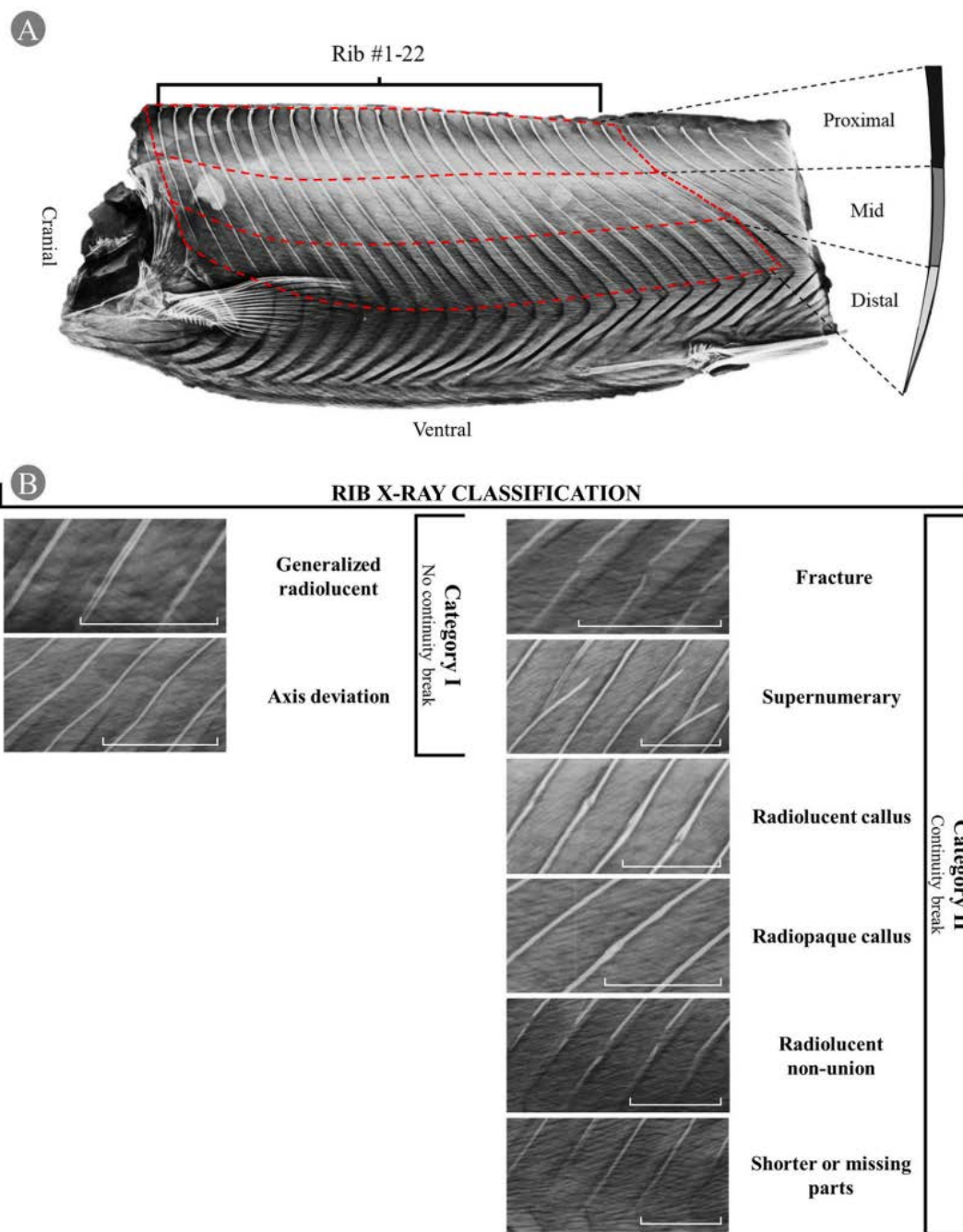
Tabell 3 Tidspunkt for uttak og størrelse på villaks og oppdrettslaks for røntgenundersøkelse av skjelett og ribbein

Miljø	Tidspunkt	Vekt (kg)	Antall fisk
			Ribbein røntgen
Wild-Seawater	April 2019	2.2 : 0.2	
Wild-Freshwater	June 2019	5.1 : 0.2	15
Smolt farm - Freshwater	August 2018	0.1 :	20
Land-based tank - Seawater	November 2018	0.3 :	15
Land-based tank - Seawater	February 2019	0.8 :	15
Land-based tank - Seawater	May 2019	1.4 :	15
Land-based tank - Seawater	November 2019	3.2 :	23
Sea-cage - Seawater	November 2018	0.5 :	10
Sea-cage - Seawater	February 2019	1.2 :	30
Sea-cage - Seawater	May 2019	2 :	10
Sea-cage - Seawater	November 2019	4.5 :	23

6.2 Ribbeinsavvik

Innledningsvis ble det laget en oversikt over typer ribbensavvik, basert på hele fiskematerialet. Dvs. 176 fisk x 22 ribben per fisk; totalt 3872 ribben der avvik ble vurderer for øvre del (proximal nærmest ryggraden), midt del (mid) og nedre del (distal) av ribbeina (11.600 enkeltregistreringer).

Klassifisering av ulike typer ribbeinsavvik er vist i Figur 5.



Figur 5 Type ribbeinsavvik hos oppdrettslaks. A) Viser området av fileten som ble undersøkt (22 ribben) og inndeling av ribbeina i tre områder: øvre («proximal», nærmest ryggraden), midt området («mid») og området lengst fra ryggraden («distal»). B) Viser ulike typer ribbensavvik, klassifisert i to kategorier: Kategori I uten kontinuitetsbrudd og Kategori II med kontinuitetsbrudd. Bredden av de hvite indikatorene nederst til høyre på hvert bilde viser skalaen, satt til 1 cm.

7 Fôr

Deltakere: Turid Mørkøre, Jens-Erik Dessen, Raúl Jiménez-Guerrero, Thomas Larsson, Odd Helge Romarheim, Grete Bæverfjord, Bente Ruyter, Katerina Kousoulaki, Esmail Lutfi, Gerd Marit Berge, Sumeng Sumeng, Vette Skjold og Kjell-Arne Rørvik

To fôringsforsøk vil bli rapportert fra prosjektet (småskala, storskala). Vi gjennomførte et fôringsforsøk i småskala på Nofima, Sunndalsøra som ikke inngår i rapporten ettersom en av ingrediensene i fôret viste seg å være en feilleveranse (mineralmiks uten tilstrekkelig tilsetning av vitamin C fra leverandør). Nofima dekket kostnadene for dette forsøket. Resultater fra fôringsforsøk utført i andre prosjekt finansiert av FHF, NFR og industri som ikke hadde mørke flekker som fokusområde inngår i en samlet vurdering av betydningen av EPA og DHA for utvikling av mørke flekker (avsnitt 7.3).

7.1 Proteinnivå i fôr til laks i storskala oppdrett

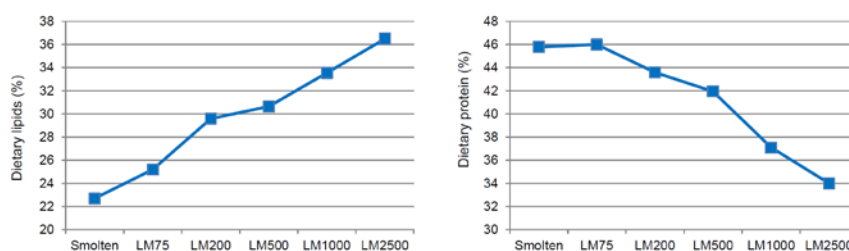
Laksen i dette forsøket ble oppdrettet ved Nofimas F og U konsesjon, Lerøy Midt, Hemnes i Tingvollfjorden. Laksen ble satt i nøter som 100 grams smolt i september 2018 og gitt enten et fôr med standard protein og fettinnhold, eller et fôr med høyt proteininnhold og lavt fettinnhold sammenlignet med det som brukes i næringen (Figur 6). Vi ønsket å undersøke om et magert, proteinrikt fôr kunne minske andelen fileter med mørke flekker, slik vi har sett tidligere hos laks etter PD diagnose.

Fôret som ble brukt i forsøket var produsert av Biomar. Pelletstørrelse og sammensetning av fôret var tilpasset fiskestørrelsen. I perioden før slakt var sammensetningen:

Standard protein og fett: 35 % / 35 %

Høyt protein og lavt fett: 45 % / 30 %

Laks ble tatt ut til undersøkelse for forekomst av mørke flekker jevnlig gjennom hele produksjonen i sjø. Laksen ble slaktet i november 2019 (antall laks undersøkt var 25-200 per uttak per merd).



Figur 6 Standard fett og proteininnhold i dagens laksefôr for smolt, 75 g (LM75), 500 g (LM500), 1 kg (LM1000) og laks større enn 2,5 kg (LM2500)

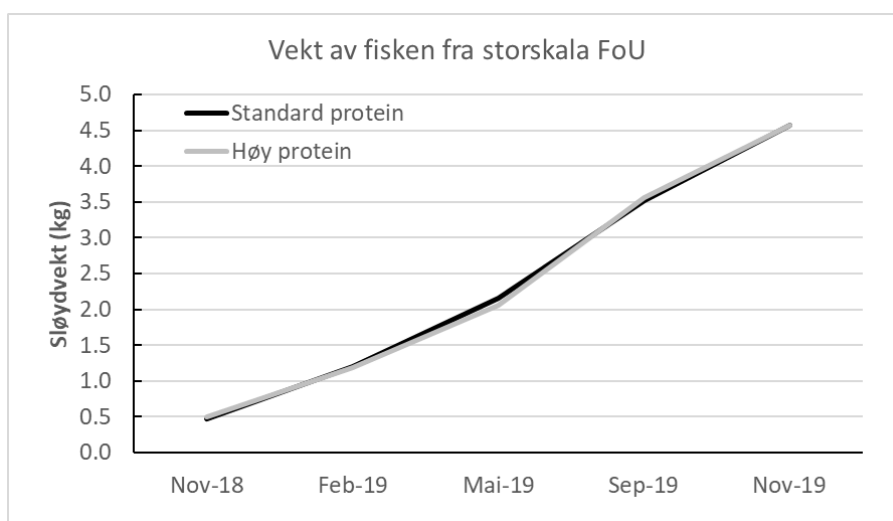
7.1.1 Resultater

Vektutvikling var tilsvarende for laksen som fikk fôr med hhv. standard og høyt innhold av protein, med en gjennomsnittslaktevækt på 4,5 kg i november 2019 (Figur 7).

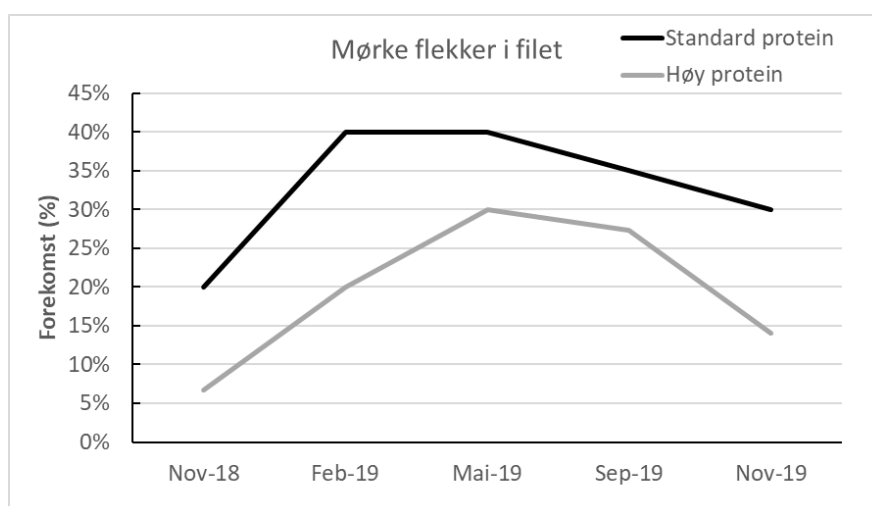
Allerede to måneder etter utsett hadde 20 % av laksen som fikk standardfôr mørke flekker, mens 6 % av laksen som fikk fôr med høyt proteininnhold hadde mørke flekker (Figur 8). Laksen som fikk det proteinrike fôret, hadde lavere forekomst av mørke flekker ved samtlige uttak. For laksen som fikk standardfôr var forekomsten høyest 5-8 måneder etter utsett (40 %), mens den høyeste forekomsten for laksen som fikk det proteinrike fôret ble registrert 8 måneder etter utsett (30 %). Da laksen ble slaktet 14 måneder etter utsett, hadde 30 % av laksen som fikk standardfôr mørke flekker, mens 14 % av laksen som fikk det magrere og proteinrike fôret hadde mørke flekker (vist som sum av svarte og røde flekker).

Fordeling av flekker etter farge og størrelse ved slakt er vist i Figur 9. Forekomsten av røde flekker var mindre enn 2 % og de fleste flekkene var små (mindre enn 3 cm brede; score 1). Det var ikke forskjell mellom fôrgruppene. Forekomsten av tydelige flekker var høyere for laksen som fikk standardfôr. For små, tydelige flekker (score 2) var forekomsten 3 ganger høyere for laks som hadde fått standardfôr sammenlignet med proteinrikt fôr. For store, problematiske flekker var forekomsten 9 ganger høyere for laksen som hadde fått standardfôr. Andelen superior laks ved slakt var høyere for det proteinrike fôret i september (93 vs. 88 %), mens laksen som fikk standardfôret hadde høyere superiorandel i november (90 % vs. 86 %) (kjønnsmodning var en viktig årsak til nedklassing). Kjønnsmoden fisk ble ikke analysert for mørke flekker i dette materialet, men vi har sett tidligere at kjønnsmoden fisk har flere flekker enn umoden fisk.

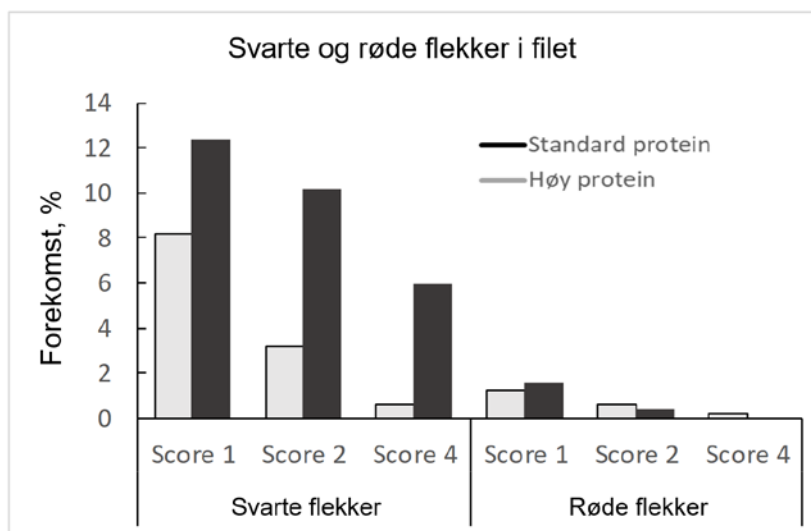
Resultatene tyder på at det er mulig å halvere forekomsten og redusere alvorlighetsgraden av mørke flekker ved å gi laksen et magrere og mer proteinrikt fôr enn dagens standard.



Figur 7 Vektutvikling for laksen som fikk fôr med hhv. standard og høyt innhold av protein



Figur 8 Forekomst av mørke flekker i fileter av oppdrettslaks fôret med et kommersielt standard fôr (standard fôr) eller det samme fôret med høyere protein/fett-ratio (høy protein), fra kort tid etter utsett i sjø i september 2018 frem til slakt i november 2019



Figur 9 Forekomst av svarte og røde flekker fordelt på størrelse av flekkene (score 1, 2 og 4) for oppdrettslaksen føret med kommersielt standard fôr («Standard protein») eller det samme føret med høyere protein/fett-ratio («Høy protein»), ved slakt i november 2019



Figur 10 Registrering av mørke flekker i laksen som hadde fått fôr med hhv. høyt og standard proteinnivå i føret. Bildet til høyre viser fileter der mørke flekker er blitt trimmet bort på filetlinjen (Lerøy Midt, Hitra). 2-300 fileter ble registrert per merd ved slakt og misfarget vev ble skåret ut og frosset ned til senere biokjemiske analyser eller lagt på formalin for senere histologiske analyser.

7.2 Marine vs. plantebaserte ingredienser

I dette forsøket fulgte vi fisk fra ferskvannsfasen frem til slakt (2020-2021).

Laksen fikk vesentlig forskjellige fôr for å undersøke om førsammensetningen i ferskvannsfasen kan ha langtidseffekter på utvikling av mørke flekker og ribbensavvik. Føret som ble produsert på Nofimas Fôrteknologisenter i Bergen hadde følgende hovedingredienser:

- Gruppe 1: Marint protein + marin olje
- Gruppe 2: Marint protein + planteolje
- Gruppe 3: Planteprotein + marin olje
- Gruppe 4: Planteprotein + planteolje

Ingrediensene i det marine fôret var fiskeolje, fiskemel og hvete mens ingrediensene i det plantebaserte fôret var soyaprotein konsentrat, hvete, hvetegluten, maisgluten og rapsolje. Alle fôr var tilsatt en vitamin- og mineralmiks. Protein og fettinnholdet var ganske likt i alle fôrene (Tabell 4).

Tabell 4 Sammensetningen av fôrene som ble benyttet i ferskvannsfasen

	MARINT PROTEIN		PLANTEPROTEIN	
	Marin olje	Planteolje	Marin olje	Planteolje
Ingredienser				
Fiskemel	61	61	0	0
Hvete	20,7	20,7	8,4	8,4
SPC	0	0	34,6	34,6
Hvetegluten	0	0	22	22
Maisgluten	0	0	10	10
Fiskeolje	15,4	0	20,4	0
Rapsolje	0	15,4	0	20,4
Kjemisk sammensetning				
Protein	46,1	45,9	46,9	46,5
Fett	22,3	22,5	22,1	22,3
Stivelse	12,6	12,9	9,3	9,3
Aske	9,7	9,6	5,1	5,1
EPA+DHA g/100 g fett	7+10,2	1,5+3,1	6,2+8,2	0,1+0,1
Energi (MJ/kg)	21,2	21,6	21,9	22,2

Laksen ble oppdrettet ved Nofimas forskningsstasjon, Sunndalsøra frem til smoltifisering (3-4 kar per fôrgruppe). Laksen ble PIT-tag merket (ved 30 g) og vaksinert (Alpha JECT® micro 6, PHARMAQ AS) etter en periode med lysstyring (12:12). Laksen ble overført til sjø 16. september 2020 til enten 1) Gifas forskningsstasjon eller 2) kar på land på Sunndalsøra.

Etter overføring til sjø fikk all fisk et standard kommersielt fôr – samme fôr til fisken i merder i sjø og til fisk i kar på land (Skretting, Norge).

1) Laks fra alle fire fôrgrupper ble transportert til Gifas forskningsstasjon der den gikk blandet i to 125 m³ nøter. Etter planen skulle laksen gå i sjøen frem til slakt, men dessverre måtte all fisk ved forskningsstasjonen slaktes etter at fisken hadde gått der i et halvt år (mars 2021). Årsaken var at et naboanlegg hadde fått påvist ILA.

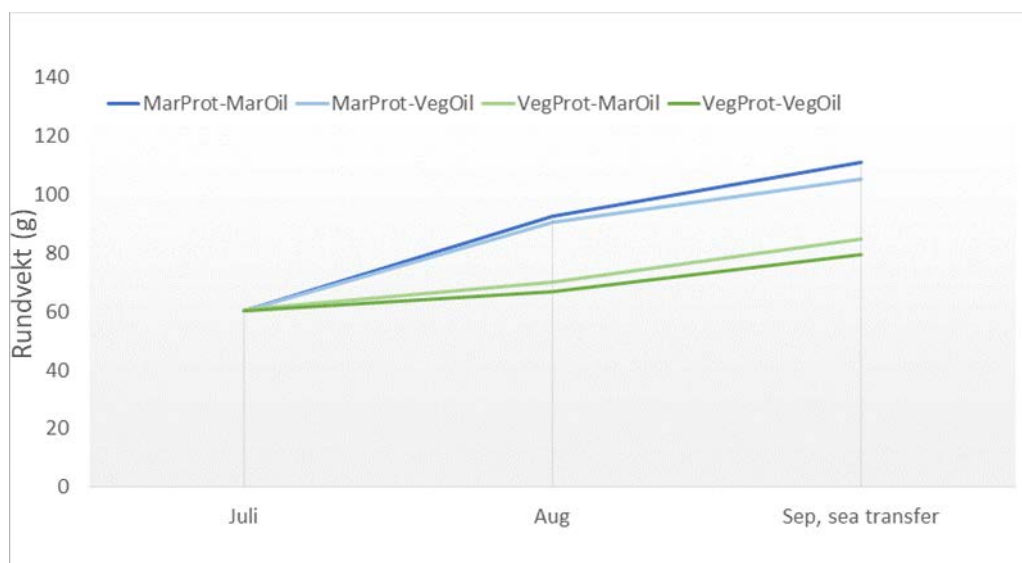
2) Laks fra gruppe 1 (marint protein & marin olje) og gruppe 4 (planteolje & planteprotein) ble holdt i 3 m³ kar på land, bortsett fra de siste tre månedene før slakt da fisken ble overført til en 100 m³ enhet (RAS). Forsøket ble avsluttet 16-17. september 2021. Årsaken til at laksen ble overført til en større enhet er at vi ikke har sett utvikling av mørke flekker i små oppdrettsenheter, men i større RAS enheter på stasjonen på Sunndalsøra.

Tabell 5 Forsøket

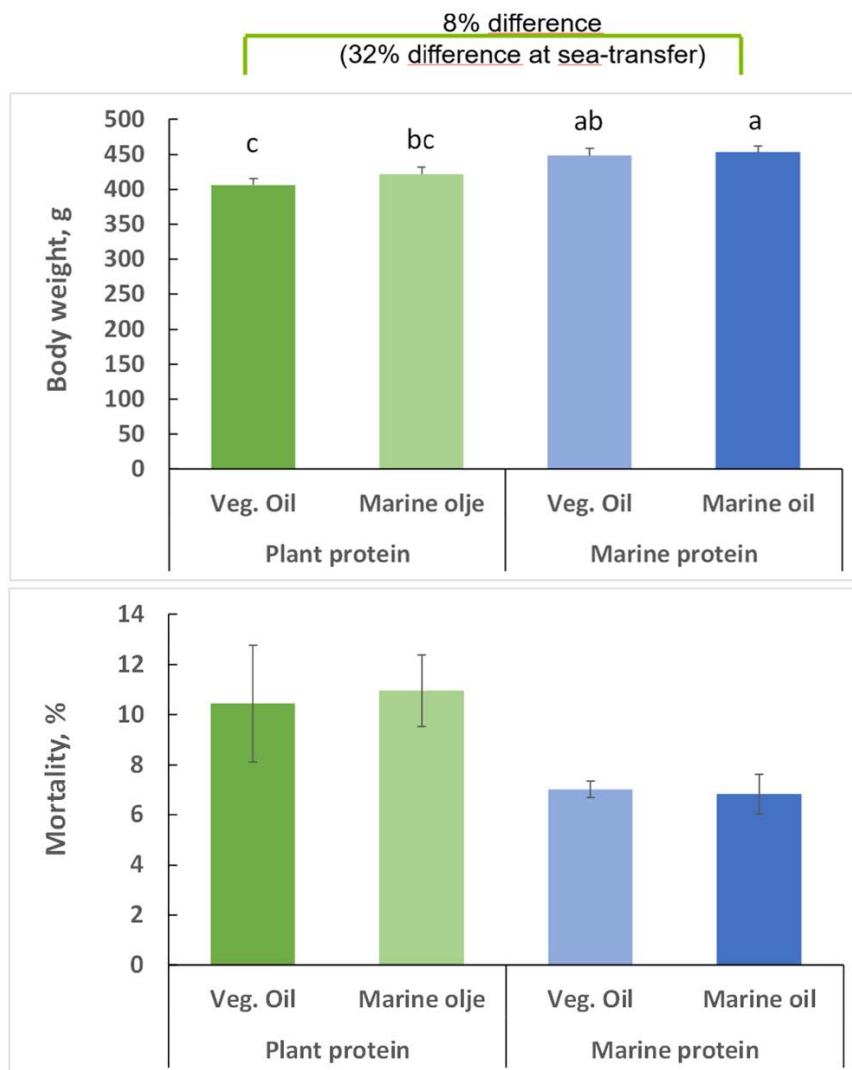
	MARINT PROTEIN		PLANTEPROTEIN	
	Marin olje	Planteolje	Marin olje	Planteolje
Små kar på land				
Fôringsforsøket startet i juli 2020 - Kroppsvekt 50 g - Fisk ble PIT-tagged	4 kar	3 kar	3 kar	4 kar
Vaksinert 25/8 2020 - Kroppsvekt 85 g	492 laks	369 laks	369 laks	492 laks
Dødelighet i ferskvann	<1 %	<1 %	<1 %	<1 %

Laksen som fikk planteprotein i fôret i ferskvannsfasen, hadde lavere vekst enn laksen som fikk marint protein. Effekten av oljekilde på tilvekst var liten (Figur 11). Vektforskjellene mellom fôrgruppene var mindre etter et halvt år i merder i sjø ved Gifas forskningsstasjon, selv om laksen som fikk marint protein og marin olje i fôret i ferskvann fortsatt veide mest. Laksen som fikk vegetabilsk protein i fôret i ferskvann, hadde vesentlig høyere dødelighet i sjø (Figur 12).

Forekomsten av mørke/svarte flekker var numerisk lavest for laksen som fikk marint protein og marin olje i fôret i ferskvann og høyest for laksen som fikk planteprotein og planteolje i fôret i ferskvann (Figur 13). Forskjellene mellom fôrgruppene var ikke statistisk signifikante (all fisk fikk samme fôr i sjøvannsfasen).



Figur 11 Vektutvikling i ferskvann



Figur 12 Vektutvikling i småmerder i sjø og dødelighet (Gifas forskningsstasjon) for laks som hadde fått ulike fôr i ferskvannsfasen. Ved overføring til sjø ble alle fiskegruppene blandet og gitt et standard kommersielt fôr. Figurene viser langtidseffekter av førene laksen fikk i ferskvann.

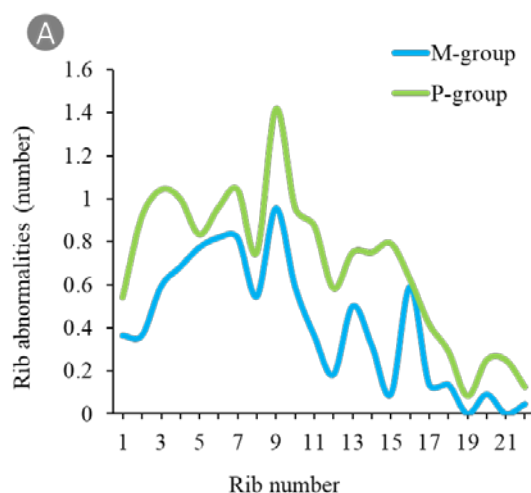
Mørke flekker:	
Marint protein & marin olje	⇒ 9.9%
Marint protein & planteolje	⇒ 11.9%
Planteprotein & marin olje	⇒ 11.8%
Planteprotein & planteolje	⇒ 16.1%

Figur 13 Prevalens (%) av mørke flekker for laksen som fikk marint protein og/eller marin olje i føret i ferskvann

Laksen som ble oppdrettet i små kar på Sunndalsøra frem til slakt hadde svært få mørke flekker. Dvs. at de tre månedene fisken ble holdt i den store oppdrettsenheten før slakt (3 måneder; 100 m³) var ikke tilstrekkelig til at laksen å utvikle betydelige flekker – evt. var tidsrommet for kort eller var fisken for stor og robust ved overføring. Slaktevekten var omtrent den samme for begge fiskegruppene (som hadde gått blandet gjennom hele sjøfasen).

Ved slakt (3 kg) var forekomsten av ribbeinsavvik høyere for laksen som fikk det plantebaserte fôret i ferskvann (Figur 14) og styrken på ribbeina var ca. 20 % svakere, målt instrumentelt. Laksen som fikk det plantebaserte fôret i ferskvannsfasen, hadde bløtere tekstur og mer filetspalting ved slakt.

Disse resultatene viser at fôrsammensetningen i ferskvann kan gi langtidseffekter på kvalitet. I dette forsøket fikk all fisken et standard kommersielt fôr etter at fisken var overført til sjø – dvs. i et helt år. Likevel kunne vi se forskjeller mellom fôrgruppene fra ferskvannsfasen. Fisken i forsøket fikk ekstremdieter i ferskvann for å avdekke om fôret i ferskvann har langtidseffekter. Når vi har fått denne kunnskapen kan vi begynne å se nærmere på *hvilke fôrkomponenter* er spesielt kritiske for fiskevelferden og filetkvaliteten, og derved unngå å få uheldige langtidseffekter av ugunstig fôrsammensetning i ferskvann.



Figur 14 Unormale ribbein i laks som var fôret med enten et plantebasert fôr eller et fôr hovedsakelig basert på marine ingredienser. Resultatene er vist for hvert av ribbeina #1-22, der ribbein #1 er nærmest hodet.

7.3 Hvor mye marint omega-3 bør fôret inneholde for å hemme utvikling av mørke flekker i laksefilet?

Resultater fra dette og andre publiserte/upubliserte prosjekter er sammenstilt nedenfor for å få en helhetlig oversikt over betydningen av fôrets innhold av de marine fettsyrene EPA og DHA for forekomsten av mørke flekker (Figur 15).

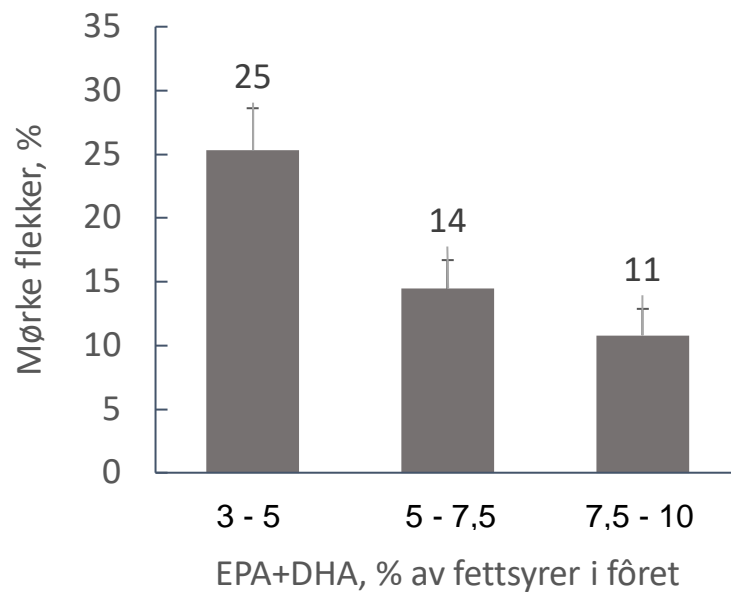
Resultater

Selv om resultatene spriker noe, er den generelle trenden klar: Marint omega-3 hemmer utvikling av mørke flekker.

Resultatene viste at forekomsten av mørke flekker avtok med økende innblanding av EPA+DHA i fôret. (lav n-6/n-3 ratio). Laks som får EPA+DHA nivåer under 5 % av de totale fettsyrene i fôret har økt risiko for å utvikle mørke flekker, og flekkene er også større ved lave EPA og DHA nivåer. Gevinsten ved å øke EPA+DHA innholdet i fôret fra 3-5 % til 5-7,5 % var på hele 11 %-poeng; dvs. et fall fra 25 % til 14 %. En økning av EPA+DHA nivået til 7,5-10 % ga en ytterligere reduksjon på 3 %-poeng.

Konklusjon

Innholdet av EPA og DHA i fôret bør være høyere enn 5 % for å minske risikoen for kraftig innslag av mørke flekker i filet av oppdrettslaks.



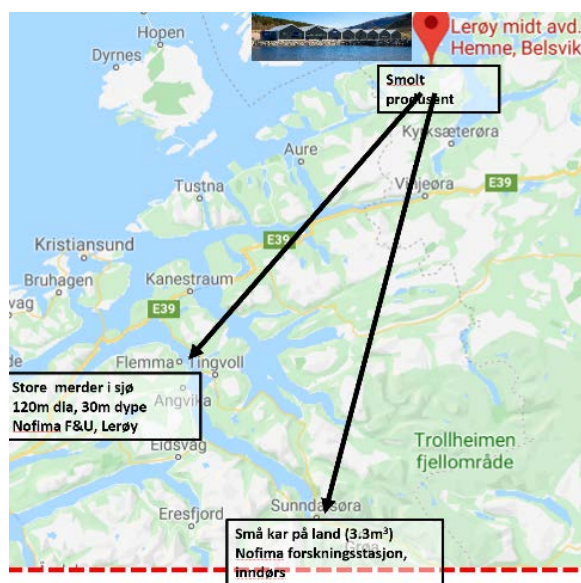
Figur 15 Forekomst av mørke flekker i fileter av oppdrettslaks fôret med varierende nivåer av EPA og DHA. Resultater (% av totalt fettsyreinnhold i fôret) er hentet fra flere forsøk: Sissener et al., 2016; Mørkøre et al., 2021; Lufti et al., 2022; prosjektet OptiOmega RFFNord/Cermaq, Cargill, NMBU, Nofima (2019-2021) samt upubliserte resultater fra fôringsforsøk ved Arctic Salmon Research Centre, Cermaq Norge.

8 Miljø og håndtering

Deltakere: Raúl Jiménez-Guerrero, Turid Mørkøre og Grete Bæverfjord

8.1 Oppvekstmiljø

Laks fra samme smoltgruppe (Lerøy Belsvik) ble transportert til småkar ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra og til kommersielle nøter i sjø ved Nofimas F&U konsesjon, Nausneset (Lerøy Midt), der laksen ble oppdrettet frem til slakt (november 2019). Laksen ved begge lokaliteter fikk samme fôr (standard kommersielt fôr, Biomar). Det var kort avstand mellom lokalitetene (ca. 45 km; begge lokaliteter ved Tingvollfjorden) (Figur 16). Siden laksen kom fra samme smoltgruppe og fôret var det samme, kunne vi undersøke betydningen av oppdrettsmiljø for utvikling av ribbensavvik og mørke flekker. Villaks fra Finnmark (bifangst) ble benyttet som kontroll (2,2 kg).



Figur 16 Laksen som ble oppdrettet i kar på land eller i merder i sjø kom fra samme smoltprodusent (Lerøy Midt, Belsvik). I sjøfasen ble laksen oppdrettet enten i merder i sjø eller i kar på land (45 km mellom lokalitetene med merder i sjø og kar på land).

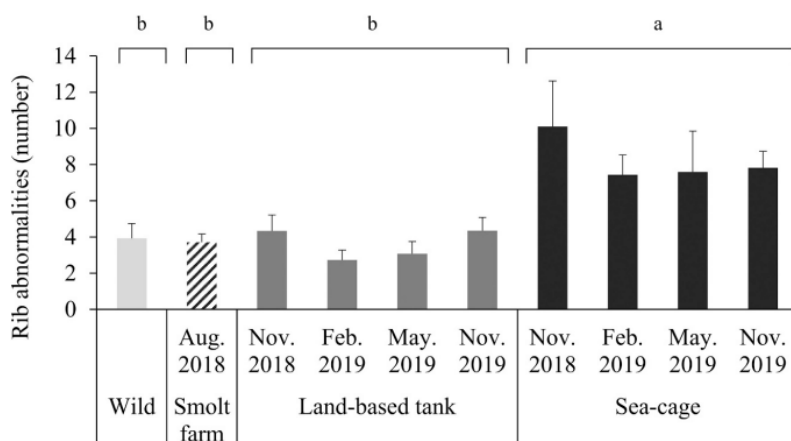
Laks ble tatt ut til undersøkelse gjennom oppdrettsfasen (Tabell 6) og undersøkt for ribbeinsmorfologi og forekomst av røde og svarte flekker. Laksen gikk i 3-4 kar på land (0,6-3 m³) og to nøter per fôrtype i sjø (120 m omkrets og 30 m dype).

Resultatene av dette arbeidet ble publisert i Aquaculture som del av Jiménez-Guerrero m.fl. (2022) Rib abnormalities and their association with focal dark spots in Atlantic salmon fillets, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738697>.

Forekomsten av ribbensavvik var så å si lik for villaks, smolt og laks oppdrettet i kar på land (Figur 17). Derimot var det en brå økning i ribbensavvik etter at laksen ble overført til merder i sjø. Den brå økningen i ribbensavvik ble registrert to måneder etter overføring (november 2018). Etter at laksen hadde gått i sjøen i fem måneder hadde forekomsten av ribbensavvik stabilisert seg på et noe lavere nivå, men andelen laks med ribbensavvik var fortsatt dobbelt så høy som for laks oppdrettet i kar på land og villaks (Figur 17). Eksempler på røde og mørke flekker i forsøket er vist i Figur 18. En oversikt over ulike typer ribbensavvik er vist i Tabell 6. Antallet ribbein med avvik var høyest i området mellom ribbein #9-15 i oppdrettslaks, mens det ikke var noe mønster for villaksen. For laksen oppdrettet i merder i sjø var hovedandelen av misfargede muskelsegmenter i samme område som det med flest ribbensavvik (segment 9-15) (Figur 19).

Ribbeina ble analysert ved røntgen som standard, men vi benyttet også histologi og mikro-CT. Ved mikro-CT så vi også på ribbeinsbrudd i 3D (Figur 20).

Siden laksen kom fra samme smoltgruppe, kan vi utelukke den genetiske bakgrunnen til fisken som en hovedårsak til økningen. Ettersom all oppdrettslaks fikk samme fôr (til enhver tid fra samme fôr- batch), kan vi også utelukke fôret som en hovedårsak til denne økningen i forekomst av ribbeinsavvik hos laksen i merder i sjø. Da står vi igjen med miljøeffekter, eventuelt sortering og transport (laksen på Sunndalsøra ble ikke sortert før den ble overført til sjø). Den brå økningen i ribbeinsavvik sammenfaller med økende forekomst av røde flekker i sjø og etter hvert mørke flekker. Selv om andre faktorer enn ribbeinsavvik kan ha betydning for forekomsten av mørke flekker, er denne kraftige økningen etter overføring et tydelig signal om å undersøke forhold som forårsaker en slik økning av hensyn til dyrevelferden så vel som for kvaliteten.

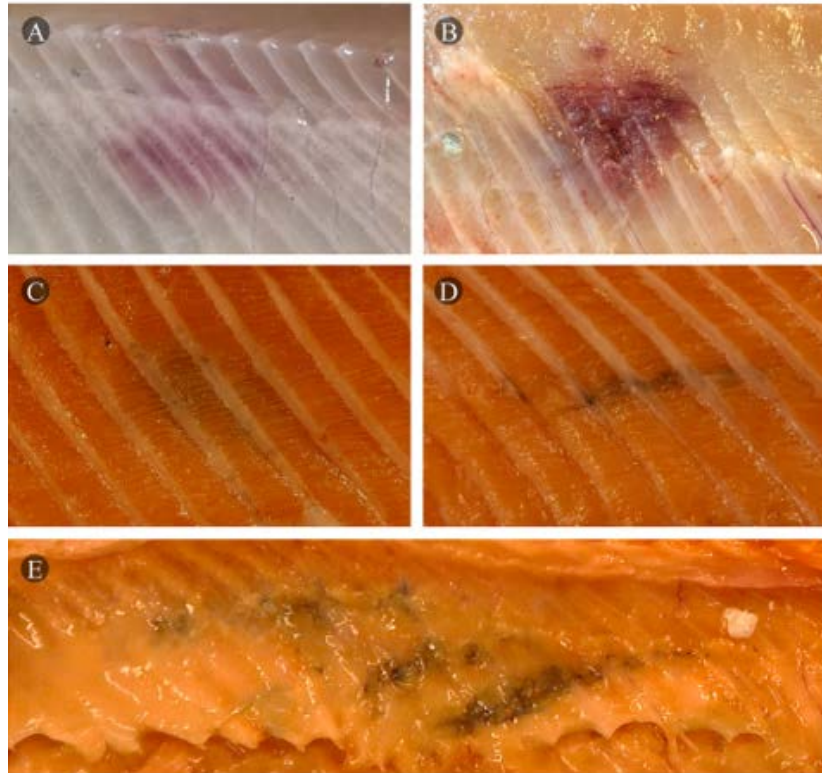


Figur 17 Antall ribbeinsavvik for oppdrettslaks før og etter overføring til landbaserte tanker og merder i sjø og villaks (Fra Jimenez-Guerrero et al., 2022)

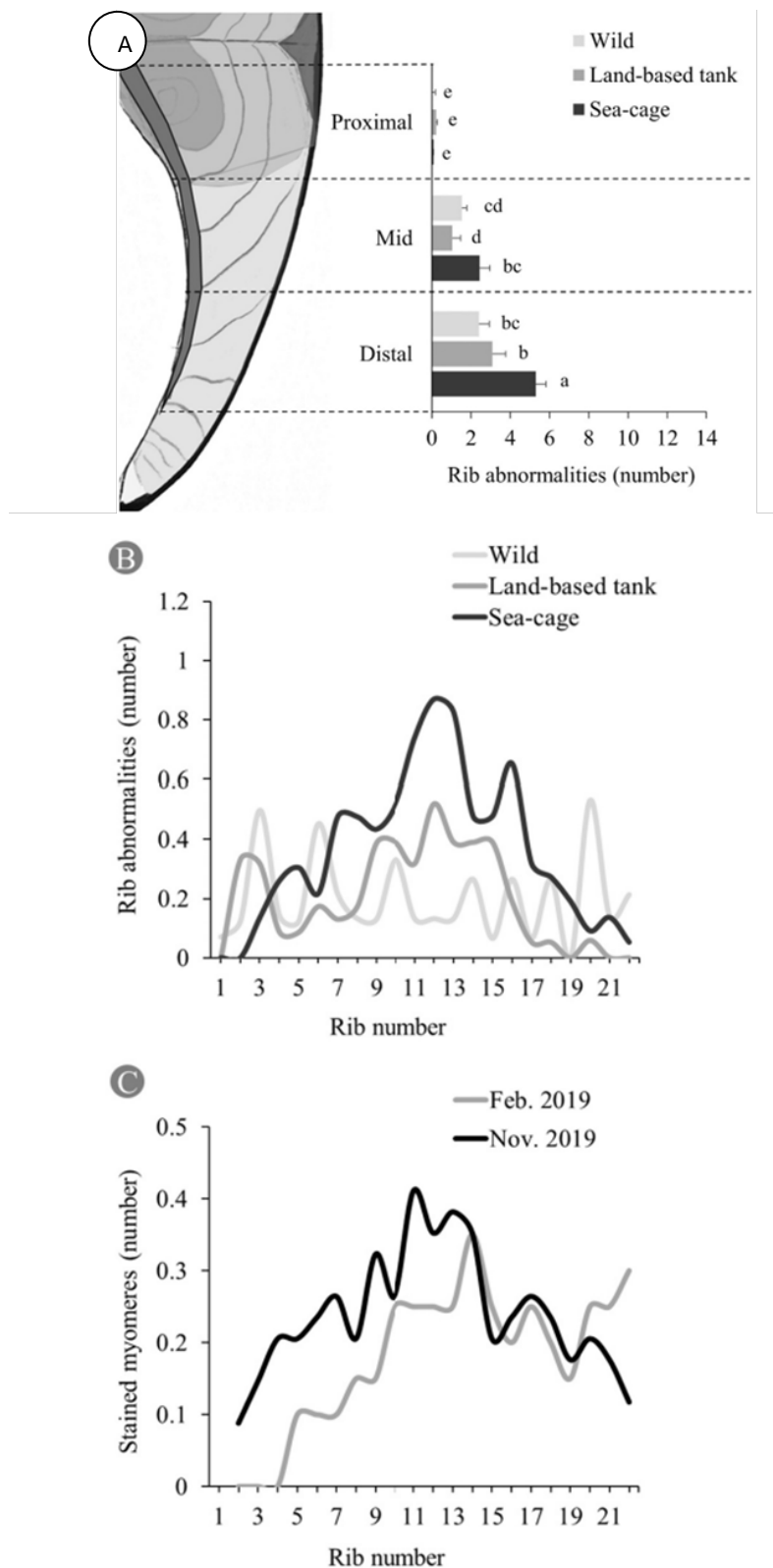
Tabell 6 Antall ulike typer ribbeinsavvik (per ribbeinside) for villaks og oppdrettslaks før og etter overføring til landbaserte tanker og merder i sjø. (Fra Jimenez-Guerrero et al., 2022).

Abnormality group n	Wild	Smolt farm	Land-based tank				Sea-cage			
	Jun. 2020	Aug. 2018	Nov. 2018	Feb. 2019	May. 2019	Nov. 2019	Nov. 2018	Feb. 2019	May. 2019	Nov. 2019
	15	20	15	15	15	23	10	30	10	23
Category I - No continuity break										
Generalized radiolucent	1.3 ± 0.5 ^{bcd}	0.1 ± 0.1 ^d	1.7 ± 0.5 ^{bc}	0.7 ± 0.2 ^{bed}	1.1 ± 0.5 ^{bc}	0.3 ± 0.1 ^{cd}	5.2 ± 1.4 ^a	1.7 ± 0.4 ^{bc}	2.2 ± 0.7 ^b	1.3 ± 0.3 ^{bcd}
Axis deviation	5.7 ± 1.1 ^{cde}	6.7 ± 0.8 ^{bc}	6.5 ± 1.2 ^{bcd}	4.8 ± 0.8 ^{de}	4.2 ± 0.9 ^e	12.9 ± 1 ^a	7.1 ± 1.4 ^{bc}	1.2 ± 0.4 ^f	1.8 ± 0.6 ^f	8.2 ± 0.9 ^b
Any Category I	7 ± 1.2 ^{bcd}	6.8 ± 0.8 ^{bcd}	8.2 ± 1.3 ^{abcd}	5.5 ± 0.8 ^{cde}	5.3 ± 0.9 ^{cde}	13.1 ± 1.1 ^a	12.3 ± 2.1 ^{ab}	2.9 ± 0.6 ^e	4 ± 1 ^{de}	9.5 ± 0.9 ^{abc}
Category II - Continuity break										
Fracture	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0 ± 0	0 ± 0	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0 ± 0	0 ± 0
Supernumerary	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.1
Radiolucent callus	1.1 ± 0.4 ^{ab}	0.1 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.3 ^a	0.2 ± 0.2 ^b	0.1 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.4 ^{ab}	0.7 ± 0.2 ^{ab}
Radiopaque callus	0.5 ± 0.3 ^b	1.7 ± 0.3 ^{ab}	0.9 ± 0.4 ^b	0.5 ± 0.2 ^b	0.4 ± 0.2 ^b	0.7 ± 0.2 ^b	0.9 ± 0.4 ^b	1.2 ± 0.4 ^b	1.7 ± 0.5 ^{ab}	3 ± 0.5 ^a
Radiolucent non-union	0 ± 0	0.1 ± 0.1	0 ± 0	0.1 ± 0.1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Shorter or missing part	0.7 ± 0.3 ^c	1.5 ± 0.3 ^{bc}	1.4 ± 0.3 ^{bc}	1.2 ± 0.3 ^{bc}	1.3 ± 0.3 ^{bc}	1.5 ± 0.3 ^{bc}	3.4 ± 0.8 ^a	3.2 ± 0.4 ^a	2.7 ± 0.9 ^{ab}	2.6 ± 0.6 ^{ab}
Any Category II	2.7 ± 0.6 ^b	3.7 ± 0.5 ^{ab}	2.6 ± 0.7 ^b	2 ± 0.4 ^b	1.9 ± 0.4 ^b	4.1 ± 0.6 ^{ab}	4.9 ± 1.3 ^{ab}	5.7 ± 0.9 ^{ab}	5.4 ± 1.8 ^{ab}	6.5 ± 0.8 ^a

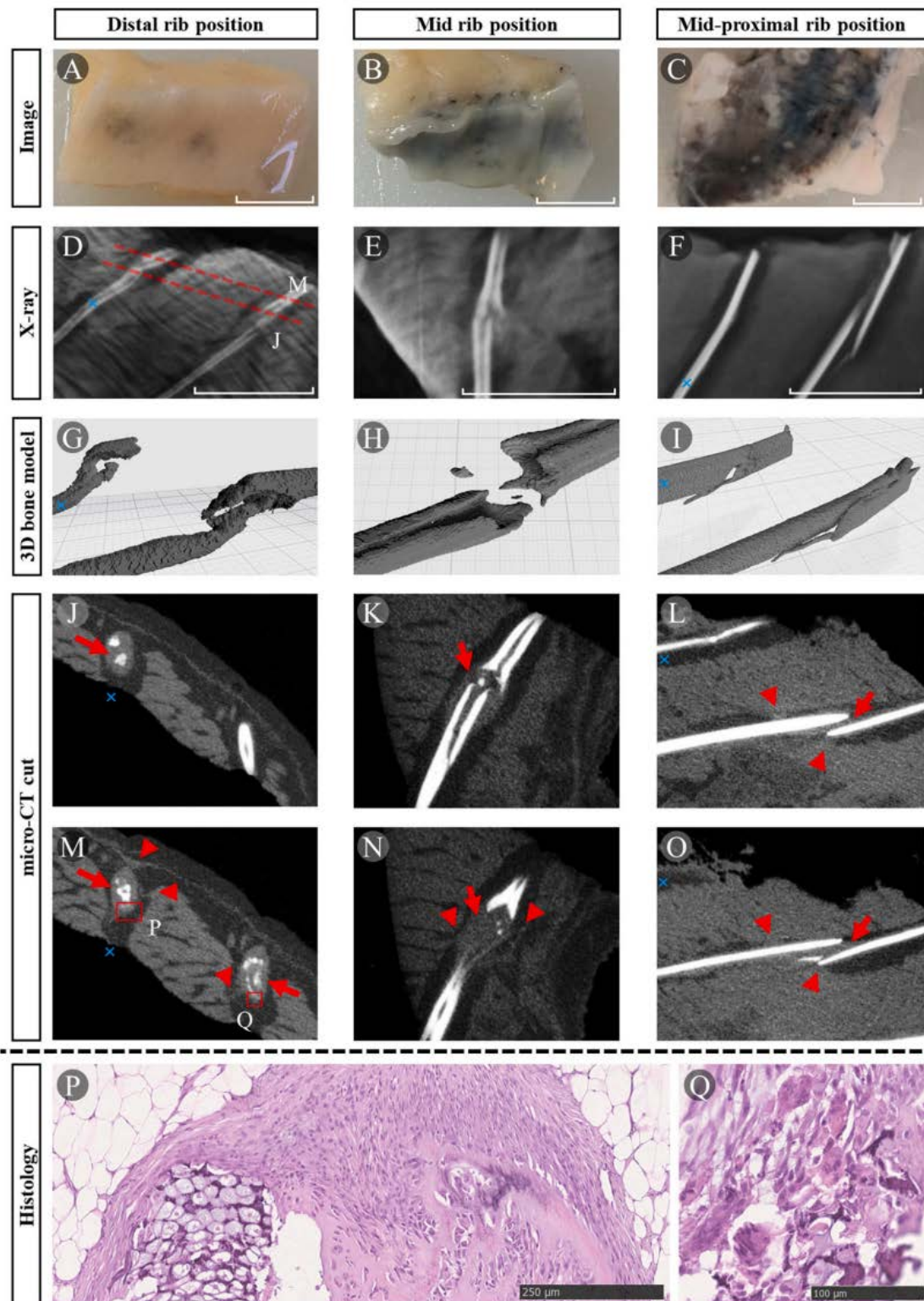
Values shown as mean ± SEM in the same row between environments and life stages with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).



Figur 18 Ulike typer filetflekker i laks: A) Rød flekk i laks i ferskvann (smolt), B) rød filetflekk i laks etter overføring til sjø, C) mørk flekk med rund form, D) mørk flekk med lineær form, og E) mørkfarget bukkinne. (Fra Jimenez-Guerrero et al., 2022).



Figur 19 A) Avvikende ribbeinsmorfologi fra området nærmest ryggraden (proximal) og utover, B) antall ribbein med avvikende morfologi og antall misfargede muskelsegementer fra ribbein nr 1 – 22 (nr 1 er nærmest hodet). Resultatene fra analyser av villaks og laks oppdrettet i kar på land eller i merder i sjø. Figur C viser kun laks oppdrettet i merd siden villaks og laks oppdrettet i kar på land ikke hadde misfargede muskelsegementer (mørke flekker). (Fra Jimenez-Guerrero et al., 2022).



Figur 20 Mørke flekker med ribbeinsbrudd/-avvik analysert ved røntgen, mikro-CT og histologi. (Fra Jimenez-Guerrero et al., 2022).

8.2 Fotoperiode og temperaturregime i ferskvann (CtrlAqua)

Deltakere: Trine Ytrestøyl, Grete Bæverfjord, Jelena Kolarevic, Mari Solheim, Turid Mørkøre, Per Brunsvik og Bendik F. Terjesen

Forekomst av mørke flekker ble registrert ved slakt av laks som var utsatt som enten 100 g, 200 g eller 600 g fisk. Laksen var oppdrettet ved ulike lys og temperaturregimer i ferskvann ved Nofima's forskningsstasjon, Sunndalsøra (CtrlAqua).

Betydning av produksjonsbetingelser i RAS for ytelse og kvalitet i sjøfasen hos atlantisk laks

Trine Ytrestøyl, Grete Bæverfjord, Jelena Kolaevic, Mari Solheim, Turid Mørkøre, Per Brunsvik, Bendik Fyhn Terjesen







Centre for Closed-Containment Aquaculture
CtrlAQUA

Målet for prosjektet var å evaluere effekten av ulike produksjonsregimer i RAS på ytelse, helse og velferd i RAS og i sjøfasen. Vårt prosjekt bidro med registreringer av mørke flekker i filet, filetfarge og filetspalting. De ulike behandlingene i ferskvann er vist i Figur 21 nedenfor.

<ul style="list-style-type: none"> • Fotoperiode: <ul style="list-style-type: none"> • Vintersignal (12:12, 4 uker) • 24 timer lys hele perioden i RAS • Salinitet <ul style="list-style-type: none"> • Brakkvann (12 ppt) • Ferskvann • Utsett på 200 og 600 g • Kontroll: 100 g lysstyrt smolt 	Freshwater	Brackish	
	12 hour	FW +	12 ppt +
	24 hour	FW	12 ppt +

Figur 21 Produksjonsregimer av laks i ferskvann. Laksen ble oppdrettet i sjø ved Gildeskål forskningsstasjon (Gifas). Alle fiskegrupper fikk samme fôr.

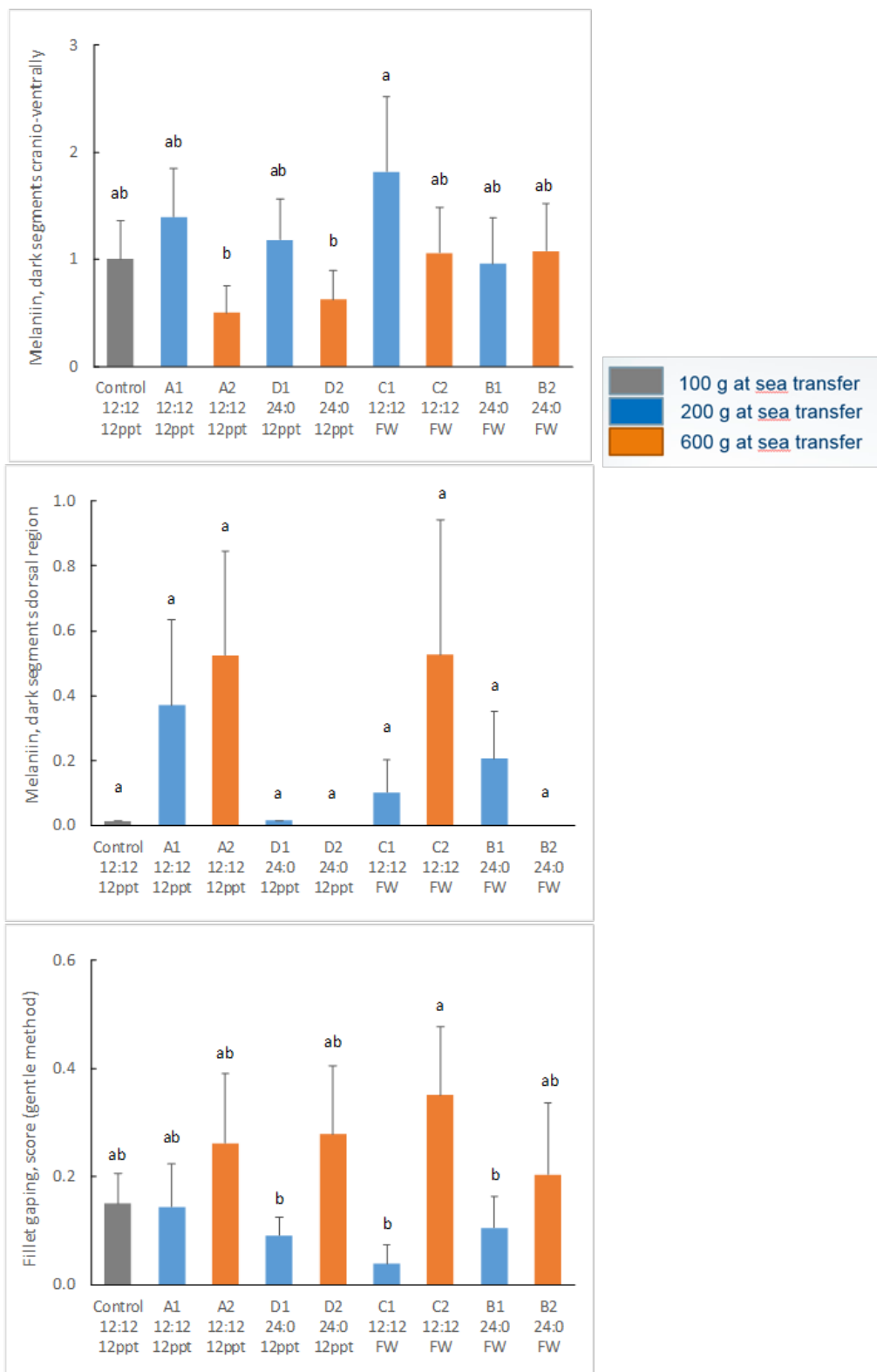
8.2.1 Resultater

Resultatene viste at produksjonsregime i ferskvann påvirket forekomsten av mørke flekker i filet ved slakt da laksen veide 4-5 kg (Figur 22).

Antallet misfarga muskelsegmenter var høyere i ryggen hos laks som var holdt ved fotoperiode 12 timer lys: 12 timer mørke sammenlignet med 24 timer lys ($P = 0,03$). Mønsteret var det samme for bukområdet, men ikke statistisk signifikant ($P > 0,09$).

Det var en klar tendens til at laks som var holdt i brakkvann før overføring til sjø hadde færre misfarga muskelsegmenter enn laks som var holdt i ferskvann ($P = 0,06$).

Fiskevekten ved overføring til sjø hadde ingen systematisk effekt på forekomsten av mørke flekker eller på størrelsen av flekkene, men laksen som ble satt ut som 600 g fisk hadde mest filetspalting.



Figur 22 Misfargede muskelsegmenter i bukområdet (A), ryggen (B) og filetspalting hos laks oppdrettet ved ulike lysregimer (12 timer lys:12timer mørke; 24 timer lys), ulike salinitet (hhv. 0 og 12 ppt). Laksen ble overført til sjøvann enten som 100 g (kontroll), 200 g eller 600 g.

8.3 Tidspunkt for utsett av smolt (Nordlaks)

Deltakere: Turid Mørkøre

Nordlaks har i en årrekke samlet inn data over forekomst av mørke flekker i laks og ørretfilet. I et tidligere FHF-prosjekt (FHF 900824), ble registreringene fra Nordlaks sammen med registreringer fra andre norske filetanlegg samlet i en database som dannet en oversikt over utvikling av mørke flekker på landsbasis. Etter at innhenting av data fra kommersielle anlegg ble nedprioritert, fortsatte Nordlaks å sende inn sine registreringer sammen med informasjon om fisken – for eksempel tidspunkt for utsett i sjø, genetisk opphav, helsestatus mm. Til sammen 140.000 laks er med i oversikten der vi har sporbarhet på fisken. Resultatene fra disse registreringene er tatt med i rapporten, selv om arbeidet med registreringer, databehandling og tolkning ikke er en direkte del av prosjektet.

8.3.1 Resultater

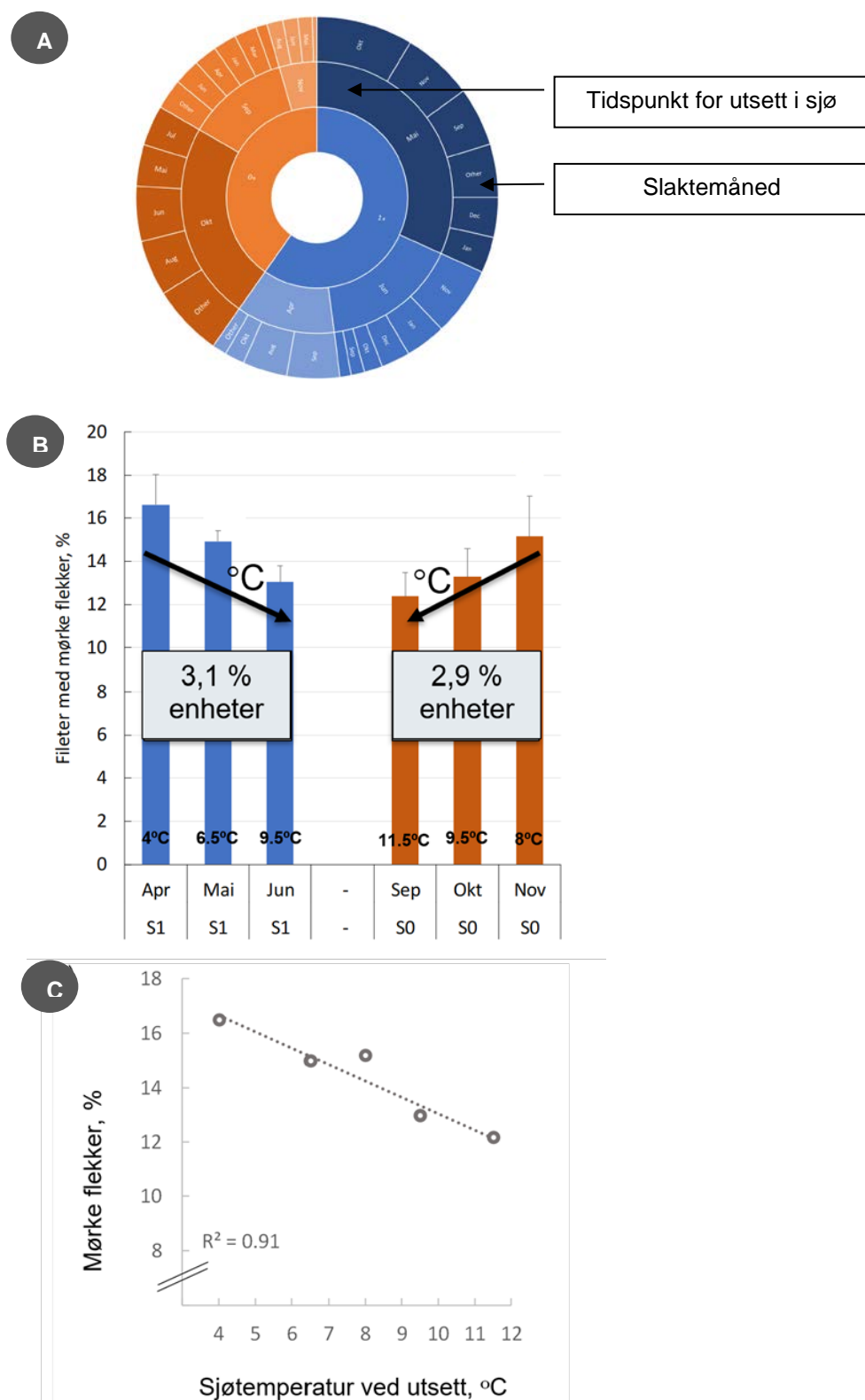
Hovedandelen av fisken som bearbeides hos Nordlaks settes i sjøen vårmånedene april, mai og juni, og høstmånedene september, oktober og november. Tidspunktet for slakting av de ulike utsettene varierer (ytterste ringen i Figur 23a). Dvs at slaktetidspunktet for laks satt ut i for eksempel april kan variere med flere måneder (august, september, oktober), avhengig av vekst og andre forhold.

En dybdeanalyse av registreringene viser at slaktetidspunktet ikke har betydning *per se* for forekomsten av mørke flekker. Derimot viser sjøtemperaturen ved utsett en omvendt proporsjonal sammenheng med forekomsten av mørke flekker (Figur 23). Dvs. at dess lavere temperatur ved utsett, desto flere fileter med mørke flekker ved slakt. Denne sammenhengen er så sterk at det er lite sannsynlig at den er tilfeldig. Det er imidlertid mulig at andre faktorer enn temperaturen spiller en rolle, slik som temperatur/lysregime ved ulike årstider i ferskvann mm.

Med en totalvariasjon på i overkant av 4 %-poeng forskjell i forekomst av mørke flekker mellom laveste og høyeste temperatur ved utsett, er det grunn til å undersøke sammenhengen nærmere for å forstå den underliggende årsaken til observasjonen i kommersiell skala.

Resultatene er en observasjon fra registreringer fra prosessanlegg over lang tid og viser at det det kan betale seg for kommersielle anlegg å prioritere tidsbruk på registreringer i samarbeid med forskningsmiljøer. Det kan være mange faktorer som har betydning for problematiske forhold, slik som mørke flekker. Derfor kreves gode rutiner for registreringer over tid og arbeid med å knytte registreringene til historiske data for partiet med fisk. For fisken registrert for flekker kunne vi ikke dokumentere vesentlig sammenheng til for eksempel sykdomshistorikk, vaksine, fôrleverandør eller sultetid før slakt.

Registreringene har pekt på interessante problemstillinger som bør undersøkes nærmere for å avdekke årsaker til at tidspunkt for utsett av smolt i sjø påvirker forekomst av mørke flekker ved slakt – kunnskap om underliggende årsaker til at problemene oppstår kan være viktige for å peke på tiltak som kan begrense at problemene oppstår i fremtiden.



Figur 23 Andel fileter med mørke flekker for laks satt i sjøen vårmånedene april, mai, juni, eller høstmånedene september, oktober, november A) tidspunkt for når laksen ble overført til merder i sjø (midterste ring) og når denne fisken ble slaktet (slaktemåned, ytterste ring), B) fileter med mørke flekker ved slakt for S1 og S0, C) sammenheng mellom andel fileter med mørke flekker ved slakt og sjøtemperatur da fisken ble i sjøen. Resultatene er basert på registreringer ved filetanlegget til Nordlaks <https://www.nordlaks.no/> (totalt 140.000 fileter registrert).

8.4 Kobber

Deltakere: Turid Mørkøre

Det var planlagt å undersøke betydningen av kobberkonsentrasjonen i vannet for utvikling av mørke flekker. Kobber er interessant fordi et kobberholdig enzym katalyserer produksjonen av melanin (tyrosinase), og vi har tidligere sett at kobbertilsetning i fôret øker avleiringen av mørke melaninpigmenter i laksemuskel (FHF#900824; Vedlegg 2).

Impregnering ved bruk av kobber er en effektiv måte å begrense begroing av oppdrettsnøter i sjø (Figur 24). Etter at nøtene er satt i sjøen, vil det være en betydelig avskalling av kobber, slik at den forventede konsentrasjonen i vannet øker. Det ble etablert samarbeid med Selstad i Måløy, som var særdeles imøtekommende og positive til å bidra med både råstoff og utstyr. Dessverre førte koronasituasjonen til at vi ikke kunne gjennomføre undersøkelser for å avdekke om kobberimpregnerte nøter øker risikoen for forekomst av mørke flekker i oppdrettslaks.

Vi har derfor ikke grunnlag til å konkludere om laks oppdrettet i kobberimpregnerte nøter er mer utsatt for å utvikle mørke flekker.



Figur 24 Kobberimpregnerte nøter (rødfargen)

8.5 Klemskader

Deltakere: Turid Mørkøre og Thomas Larsson

Det ble undersøkt om muskelskader som følge av simulert sorteringsbehandling (klemskade) kan utvikle seg til mørke flekker over tid. Nullåring, overført til sjø i september, ble utsatt for kontrollert trykk fra begge sider av kroppen i området mellom gjeller og ryggfinne 1,5 måneder etter utsett (simulert klemskade). Da trykkbehandlingen ble utført veide laksen 135 gram i gjennomsnitt (totalt 80 bedøvde fisk) og forsøket var godkjent av Mattilsynet. Både behandlet og ubehandlet laks var PIT-tag-merket og de gikk blandet i små forsøksnøter (125 m³). De elektroniske PIT-merkene gjorde det mulig å spore den trykkbehandlede laksen og sammenligne den med ubehandlet fisk.

Den trykkbehandlede laksen ble undersøkt for skjelltap og flekker i fileten én måned etter behandling og etter et halvt år.

Én måned etter simulert klemskade hadde 90 % av laksen røde flekker i filéten. Flekkene var hovedsakelig i muskelen inn mot ryggbeinet og under ribbeina, heller enn mot skinnen, som en kanskje hadde forventet. Halvparten av laksen hadde synlig skjelltap. Skjelltapet var større over enn under sidelinjen, men ikke betydelig (gjennomsnitt 1 poeng; se Figur 25). Det ble ikke observert mørke flekker

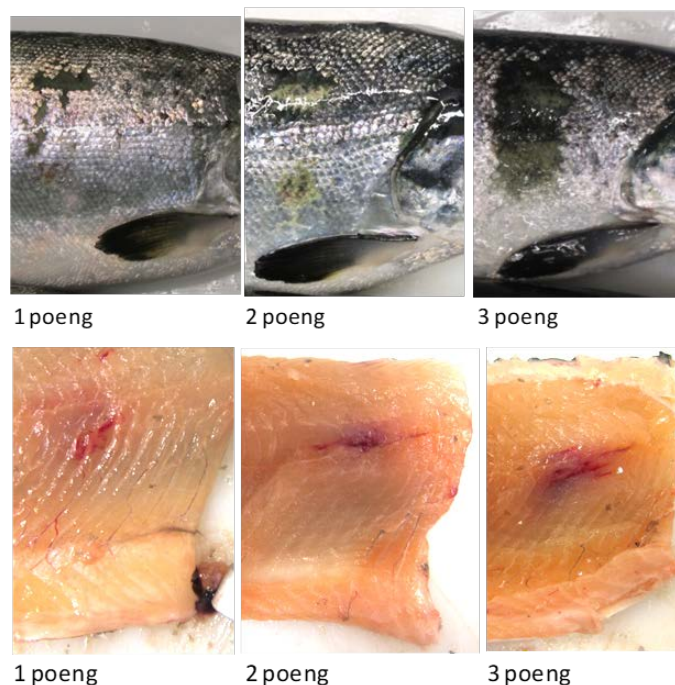
(melanin flekker), kun røde. Den ubehandlede laksen hadde verken røde eller mørke flekker, og ingen kontrollfisk hadde skjelltap. Laksen veide 160 gram i gjennomsnitt.

Et halvt år etter den simulerte klemskaden, hadde 37 % av laksen mørke flekker mens 3 % av den ubehandlede laksen hadde mørke flekker. Forekomsten av røde flekker var ca. 2 % for begge grupper (Figur 26). Det var ikke de samme fiskene som ble undersøkt ved de ulike tidspunktene, men resultatene tyder på at hver tredje røde flekk i januar utviklet seg til en mørk flekk i juni, mens to av tre røde flekker var borte. De mørke flekkene satt hovedsakelig i fremre delen av bukområdet. Laksen veide 500 gram i gjennomsnitt.

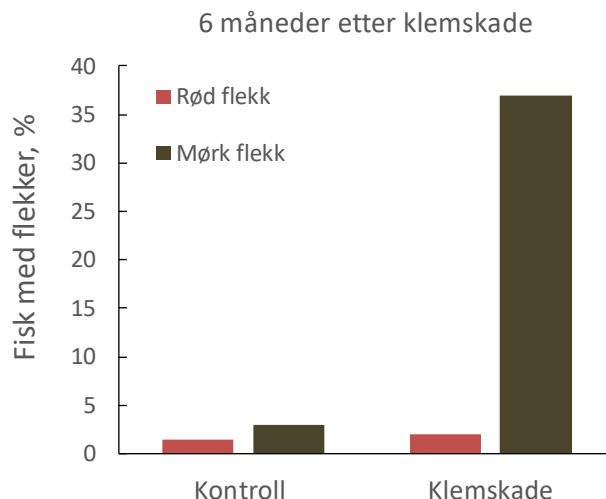
Resultatene tyder på at vevsskader/blødninger i indre muskulatur, ikke nødvendigvis utvikler seg til mørke flekker som er synlige lang tid etter skaden, men risikoen øker betydelig. Derfor er det viktig å sikre at laksen ikke utsettes for klem- eller slagskader; for eksempel ved sortering og pumping. I tillegg til å sikre skånsom sortering og pumping, kan forekomsten av vevsskader begrenses ved å unngå at fisken faller ned på hardt underlag ved sortering eller annen behandling.

Metoden som ble utviklet i forsøket for å simulere klemskader ser ut til å være egnet, men fisken bør følges opp tettere og helst undersøkes levende ved gjentatte målinger for å få en bedre forståelse for helingsprosessen. Det vil kreve et større fiskemateriale og utvikling av analysemetodikk som er egnet for å analysere fisken levende.

Resultatene viser at laks som utsettes for klemskader har økt risiko for å utvikle mørke flekker. Resultatene understreker viktigheten av å behandle laksen skånsomt, slik at en unngår vevsskader; både av dyrevernshensyn og av hensyn til filetkvaliteten.



Figur 25 Grad av skjelltap og blødning i muskel vurdert én måned etter simulert klemskade. Det var ikke direkte sammenheng mellom grad av skjelltap og blødninger i muskel.



Figur 26 Andel fisk med rød eller mørk flekk 6 måneder etter påført klemskade. Kontrollfisken og fisken utsatt for klemskade gikk blandet i samme not (laksen var PIT-merket).

8.6 Slag- og klemskader ved sortering

Deltakere: Turid Mørkøre, Raul Jimenes-Guerrero og Grete Bæverfjord

Etter at vi fant røde flekker i laks oppdrettet i ferskvann hos kommersiell smoltleverandør, identifiserte vi sortering som en kritisk operasjon som sannsynligvis kunne resultere i blødninger i filet. Andre operasjoner ved smoltanlegget, slik som vaksinerings ble ikke ansett som like kritisk. Derfor ble det gjennomført modellstudier i småskala for å undersøke om sortering *per se* kan føre til blødninger og/eller om øvrig handtering knyttet til sorteringen kan ha betydning (se også avsnitt 1).

Vi gjennomførte ulike typer undersøkelser ved Fiskelaboratoriet ved NMBU (Senter for Bærekraftig Akvakultur), der både selve sorteringen ble undersøkt (det at fisken blir hengende låst og sprelle mellom sorteringsstengene), sprelling på stål etter pumping og fall på hardt underlag etter sortering (Figur 27). Videre utførte vi innledende studier for å kartlegge bevegelsesmønsteret til laksen når den er ute av vannet. Undersøkelsene baserte seg på video, med søkelys på biomekaniske studier for å øke forståelsen for muskelkraft/akselerasjon av ulike deler av laksekroppen/kraftgenerering med vekt på fremre delen av kroppen/ribbeområdet. Dette er et område med svært mangelfull dokumentasjon som vil være nyttig for å forstå betydningen av handtering/operasjoner på anlegget for utvikling av muskel og skjelettskader. Slik kunnskap kan også være viktig grunnlag for teknologileverandører for å kunne designe fremtidige løsninger på fiskens premisser.

Vi lyktes ikke så godt med våre undersøkelser av selve sorteringen, men vi fikk klare resultater som viste at laks som faller på stål og det at laksen har relativt lang vei der den spreller i luft på stål frem til sorteringsrørene er svært kritisk. Basert på observasjonene er våre anbefalinger:

- Tiden kortes ned der fisken er ute av vann
- Fisken bør få sprelle/falle i vann heller enn på hardt stål
- Fallhøyden minskes
- Tiden fisken henger mellom sorteringsstengene kortes ned og gjøres mer skånsom for å unngå muskel og skjelettskader

1. KOMMERSIELT SMOLTANLEGG

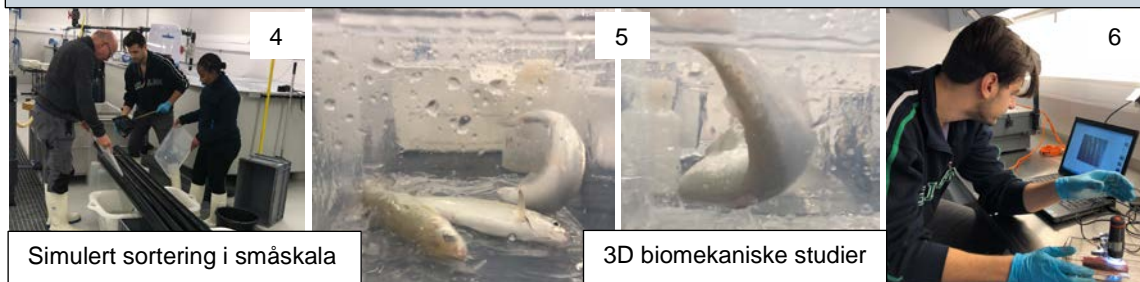


1 Laks henger mellom sorteringsstengene

Fall på stål

Laks pumpes til sortering, spreller i luft på stål til sorteringsstengene

2. MODELLSTUDIER I SMÅSKALA

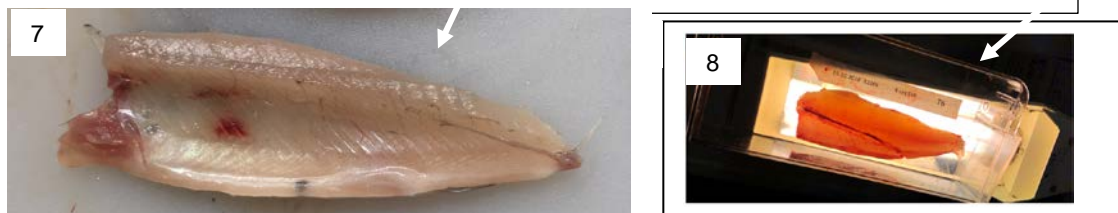


4 Simulert sortering i småskala

5 3D biomekaniske studier

3. LAKSEFILETER FRA UNDERSØKELSENE I SMÅ- OG STORSKALA

Filet fra kommersielt smoltanlegget og fra undersøkelsene i modellskala



Figur 27 Laksesmolt pumpes til sortering og spreller i luft på veien til sorteringsstengene (1) der fisken blir hengende mellom sorteringsrørene (2) og sprelle, med et relativt høyt fatt på hardt stål (3). For å undersøke om denne prosedyren var årsak til observerte blødninger i filet (7), gjennomførte vi forsøk i småskala, der effekt av sortering ble undersøkt (4) og laksens bevegelser (biomekaniske studier/kinematiske parametere) ble undersøkt. Svømmebevegelser hos fisk er studert for mange fiskeslag, men bevegelsesmønster og kraftpåvirkning av ulike deler av kroppen hos laks som er ute av vannet er ukjent. Her undersøkte vi tredimensjonale bevegelsesmønstre av laksekroppen når den var ute av vannet (biomekaniske analyser basert på video/bilder og blødninger i filet (6, 8). Vi har fått et inntrykk av de enorme kreftene som er i sving og hvilke deler av laksekroppen som utsettes for de største kreftene når den er ute av vannet – observasjoner som kan danne grunnlag for videre undersøkelser. Konklusjonen fra undersøkelsen i småskala var at dersom laksen spreller på hardt stål er risikoen for at det oppstår blødninger i filet stor, mens laks som får sprelle på en «seng» av vann er mindre usatt.

9 Genetikk

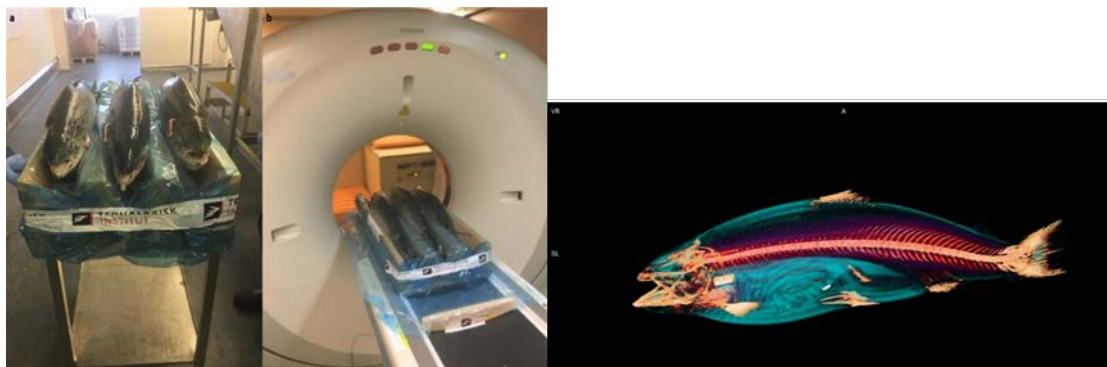
Deltakere: Turid Mørkøre og Borghild Hillestad

Med bakgrunn i omfanget av problemet med mørke flekker, har det blitt lagt ned store ressurser i forskning for å forstå årsakssammenheng til dannelsen av flekkene. SalmoBreed (nå Benchmark Genetics) har bidratt til å undersøke om forekomsten av mørke flekker er arvbar og om det er mulig å redusere forekomsten gjennom avlsarbeid. Blant annet ble det registrert melaninflekker under testslakt i august 2014 hos 1678 fisk, fordelt på 100 familier fra SalmoBreeds avlskjernefisk (2012-årsklassen). Resultatene avdekket noe høyere forekomst av melaninflekker hos hanfisk enn hos hunfisk, og høyere forekomst hos kjønnsmoden fisk. Mørke filetflekker viste ingen arvelig variasjon, men det ble konkludert at dette bør etterprøves i et annet fiskemateriale.

9.1 Fiskemateriale

Som en del av prosjektet CompleteScan (FHF 901491) ble det i 2018 analysert 3044 fisk fra 276 familier av årsklasse 2016. Det ble etablert samarbeid med dette prosjektet for også å analysere mørke flekker i et utvalg av fiskematerialet (2090 laks).

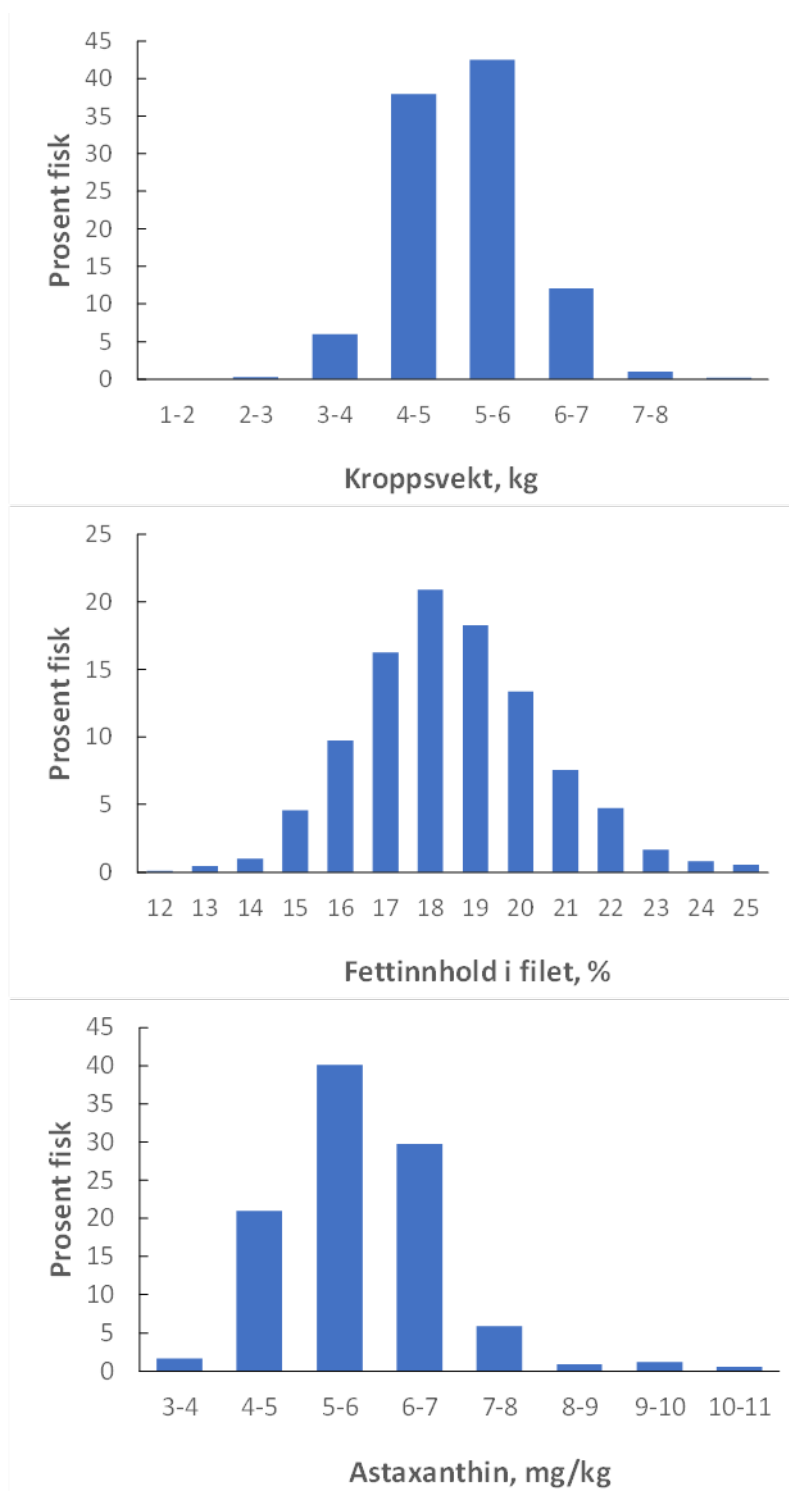
Laksen fra Benchmark Genetics sitt avlsprogram var oppdrettet i merder ved LetSea forsøksstasjon, Dønna. Laksen ble slaktet februar 2018 og undersøkt ved Austevoll Laksepakkeri etter en måneds fryselagring. Laksen som hadde en gjennomsnittsvekt på 4,2 kg ble først analysert ved computertomografi (CT-skanner, Figur 28), for blant annet å undersøke om det er mulig å detektere mørke flekker uten å skjære i fisken. Kriteriet for å klare å se mørke flekker gjennom CT-bilder avhenger av om det er tetthetsforskjeller mellom det friske vevet og mørke flekker. Selv ved detaljerte målinger hver 2 mm i tverrsnitt lot det seg dessverre ikke påvise mørke flekker med CT-scanner.



Figur 28 Fisken ble undersøkt ved CT-Scanner. Det var ikke mulig å registrere mørke flekker. Undersøkelsene ble gjennomført i samarbeid med FHF prosjektet CompleteScan <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901491/>

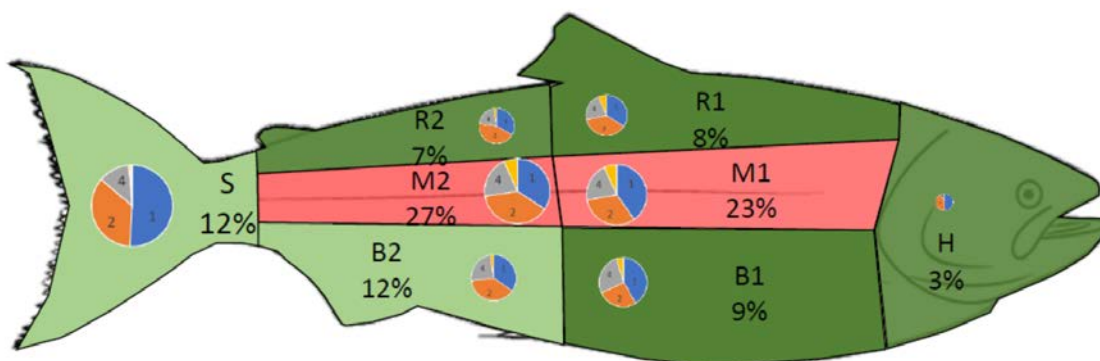
Etter CT-scanning ble laksen veid, og utvendige sår ble registrert etter en visuell skala som hensyntar størrelsen på sårene og plassering (se vedlegg 1). Dette ble gjort for å undersøke om hudsår viser arvelig variasjon og om laks med mørke flekker har økt forekomst av hudsår (andre avvik). Deretter ble fisken filetert for hånd og alle fileter ble vurdert for forekomst av mørke flekker.

Laksen i denne undersøkelsen hadde en gjennomsnittsvekt på 4,1 kg (Figur 29). Kondisjonsfaktoren var på 1,49 i gjennomsnitt og slakteutbyttet og filetoutbyttet var på hhv 87,0 % og 60,6 %. Fettinnholdet og pigmentinnholdet i filet var på 18,4 % og 5,7 mg/kg i gjennomsnitt (ved NIR målinger; Folkestad et al. 2008).



Figur 29 Laksen i forsøket (n = 2090) fordelt i vektclasser (a), fettinnhold i filet (b) og astaxanthin (c) i filet

Forekomsten av sår var høyest midt på fisken (rødt område i Figur 30) og de største sårene ble også registrert i dette området (23-27 % av fisken hadde sår langs midtlinjen). I ryggen, buken og sporen hadde 4-12 % av fisken sår. Forekomsten av sår var lavest i hodet (3 %).



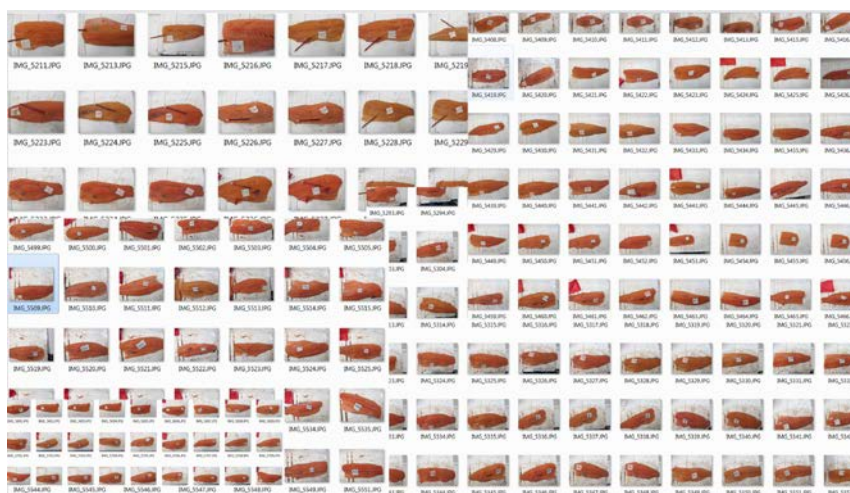
Figur 30 Forekomst av sår i ulike områder av laksen for hele fiskematerialet

Totalt 636 laks hadde mørke flekker (Figur 31). Flekkene ble registrert mht. størrelse (mm²), antall segmenter som misfargingen dekket og fargen på flekkene (rød/mørk). Alle flekker ble fotografert, dissekert og frosset ned enkeltvis for senere analyse.

I underkant av 32 % av laksen i forsøket hadde røde og mørke flekker, med noe overvekt av mørke flekker. Ca. 7 % av fiskene hadde både mørke/svarte og røde flekker.

Arvbarhet ble beregnet for alle de ulike registreringene av både røde og svarte/grå flekker. Resultatet viste ingen eller svært lav arvbarhet for de ulike melaninegenskapene: Ja/nei, størrelsen på flekkene gitt som score 1-8 og mm², antall misfargede muskelsegmenter.

Konklusjonen fra forsøket er at mørke flekker ikke er en arvelig egenskap, slik den er målt til nå. Det har ingen hensikt å avle for en egenskap som ikke er arvelig, men kun miljøbetinget.



Figur 31 Alle flekker ble fotografert (636 bilder). Det ga en unik mulighet til å undersøke morfologiske egenskaper ved flekkene og pigmentering (farge). Dessuten har vi sporbarhet på hver enkelt flekk benyttet til karakterisering av biokjemiske egenskaper.

10 Karakterisering av mørke flekker

Deltakere: Turid Mørkøre, Helena Moreno, Javier Borderias, Thomas Larsson, Kristin Hamre, Jacob Torgersen, Shosuke Ito og Kawasaki Wakamatsu

Fiskematerialet som ble benyttet til karakterisering av mørke flekker var fra avlspopulasjonen beskrevet i avsnitt 9. I dette forsøket samlet vi inn vevsmateriale fra 636 svarte/grå og røde flekker av ulik størrelse og utseende. Siden de fleste flekker er veldig tynne, kreves et stort antall flekker for å få tilstrekkelig mengde vev til analysering. Derfor var dette materialet svært godt egnet. Full sporbarhet for fiskematerialet er også gunstig for tolkning av resultater for fiskematerialet der vi hadde detaljert informasjon om genetisk bakgrunn, og all fisk hadde fått samme fôr og oppdrettsmiljø.

16 % av fisken hadde røde flekker som er høyt sammenlignet med det som er normalt for kommersielle populasjoner (normalt under 10 %). For vårt formål var det imidlertid gunstig siden vi fikk tilstrekkelig mengde vev til analysering. 18 % av filetene hadde mørke/svarte flekker, mens 7 % av laksen hadde både røde og svarte flekker. Størrelsen av flekkene varierte betydelig, slik illustrert i Figur 33.

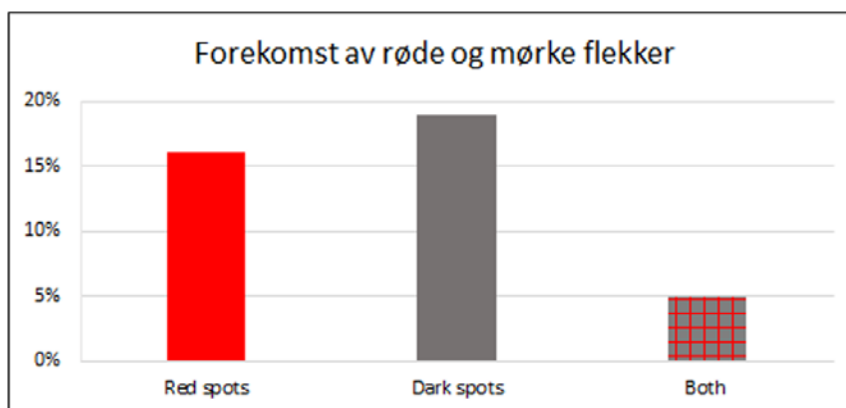
10.1 Registrering av mørke flekker og prøvetaking

Forekomst av flekker ble registrert umiddelbart etter filetering og trimming. Etter fotografering av hver enkelt flekk, ble det misfargede vevet skåret ut med skalpell og i tillegg normal muskel fra den samme fileten (3 cm fra det misfargede vevet). Misfarget og normalt vev ble lagret individuelt i forseglede plastposer og lagret ved -25 grader. Røde og mørke/svarte flekker ble sortert i kategoriene:

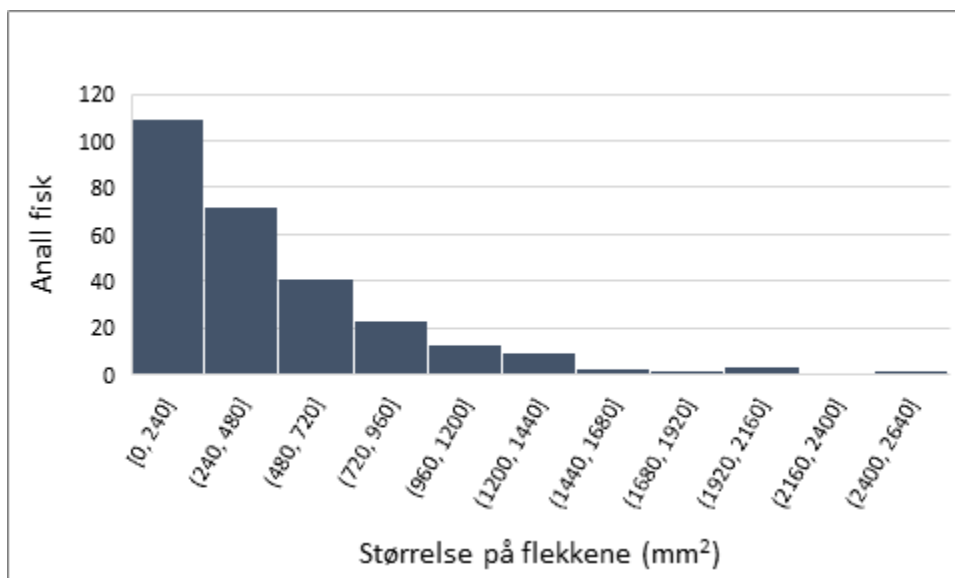
- Små, svakt pigmenterte flekker opp til 3 cm i diameter
- Tydelig pigmentert flekker opp til 3 cm i diameter
- Tydelig pigmenterte flekker større enn 3 cm i diameter

Hver enkelt flekk ble trimmet for normalt vev, før det ble laget samleprøver av vev fra hver av de tre kategoriene nevnt ovenfor. Den samlede vevsmengden varierte fra 22 gram for små svakt røde flekker til 260 gram for tydelige svarte flekker opp til 3 cm i diameter. Eksempel på utseende av flekkene fra de ulike kategoriene og vevsmengde er vist i Figur 34.

Vevet fra de ulike kategoriene ble sendt til partnerne i prosjektet for biokjemisk karakterisering.



Figur 32 Forekomst av røde flekker (16 %), mørke flekker (18 %) og fileter med både røde og mørke flekker (7 %)



Figur 33 Størrelsen på flekkene som ble registrert (mm høyde x mm bredde; mm²)

Dark spots		
Small, 9102	Medium, 7126	Large, 9029, 6992
Amount of tissue available: 72g	Amount of tissue available: 260g	Amount of tissue available: 154g
Red spots		
Small, 9107	Medium, 7758	Large, 8375, 7930
Amount of tissue available: 22g	Amount of tissue available: 123g	Amount of tissue available: 170g

Figur 34 Flekkene som ble benyttet til biokjemisk karakterisering og vevsmengde (gram) fra de ulike kategoriene

10.2 Fettinnhold og fettsammensetning

Fettinnhold og fettsyresammensetning ble analysert ved Nofima. Resultatene viste at fettinnholdet var høyest i tydelig pigmenterte mørke flekker (28 % fett), mens fettinnholdet i normalt vev, røde flekker og små, svakt pigmenterte mørke flekker var på 20-21 % (Figur 35). Fettinnholdet i det normale vevet var noe høyere enn i fileten (18 %). Det skyldes at det kun ble tatt flekker fra bukområdet av fileten, ikke ryggen. Bukområdet av fileten er generelt feitere enn resten av fileten.

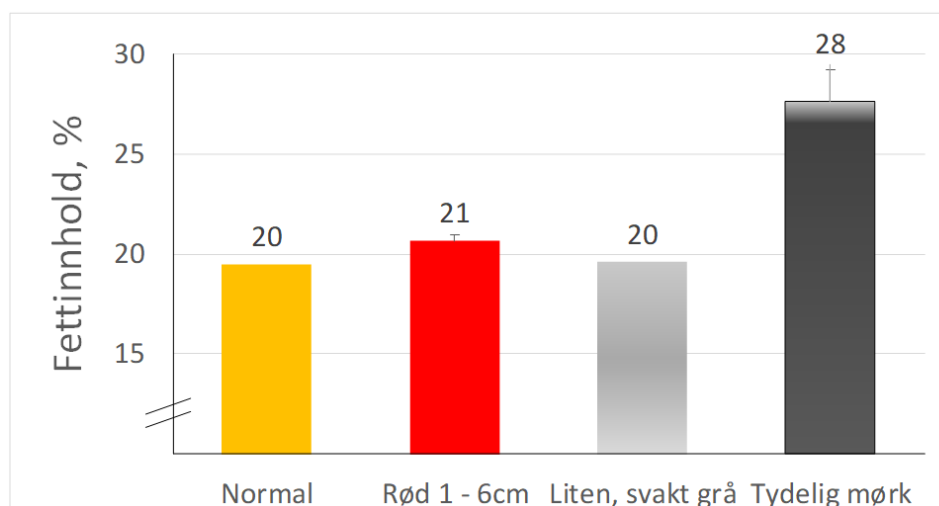
Det er velkjent at fettsyresammensetningen i muskel gjenspeiler fettsyresammensetningen i fôret. All fisk som ble analysert i dette forsøket hadde fått samme fôr. Derfor kan endringer i fettsyresammensetningen i flekkene ikke kobles til ulik fettsyresammensetning i fôret.

Fettsyresammensetningen ble analysert i triglyseridene (lagerfett) og i fosfolipidene (membranfett) (Nofima, Ås). Cellemembranen omslutter alle celler og danner en beskyttende yttergrense for cellenes indre strukturer. Cellemembranen er også viktig kommunikasjon og transport inn i og ut av cellen. Fosfolipidene er viktige for alle cellefunksjoner fordi membranen rundt cellene er bygget opp av nettopp disse.

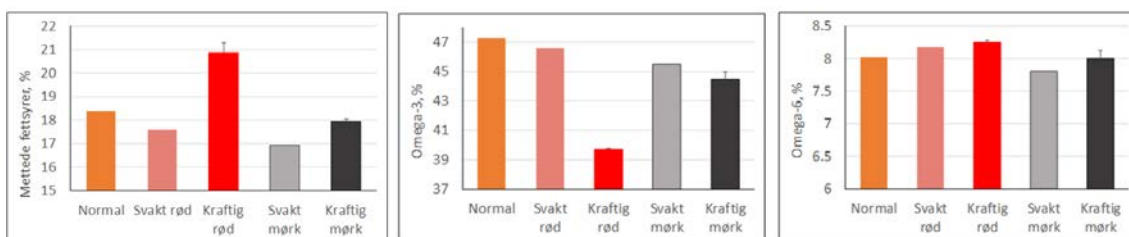
Resultatene viser at fettsyresammensetningen var tilnærmet lik i triglyseridene som er lagerfettet i muskelen (ikke vist). Derimot var innholdet av mettede fettsyrer i fosfolipidene høyest i kraftig røde flekker, mens nivået av omega-3 fettsyrer var lavest. Innholdet av de flerumettede omega-3 fettsyrene EPA og DHA var lavere i kraftig røde flekker. Variasjonen i omega-6 fettsyrer var lav mellom normal og misfarget muskel.

Sammensetningen av fettsyrer i fosfolipidene har vesentlig betydning for deres biofysiske egenskaper. Ubalanse mellom mettede og umettede fettsyrer har vist seg å resultere i dramatisk cellulær dysfunksjon. Høy akkumulering av mettede fettsyrer (overbelastning) omtales ofte som lipotoksisitet, som fører til celledød ved apoptose i alle testede celledsystemer (Bacle og Ferreira, 2019; Bacle m.fl. 2020). Muskelvev synes å være mer sensitiv for slik ubalanse enn andre vev.

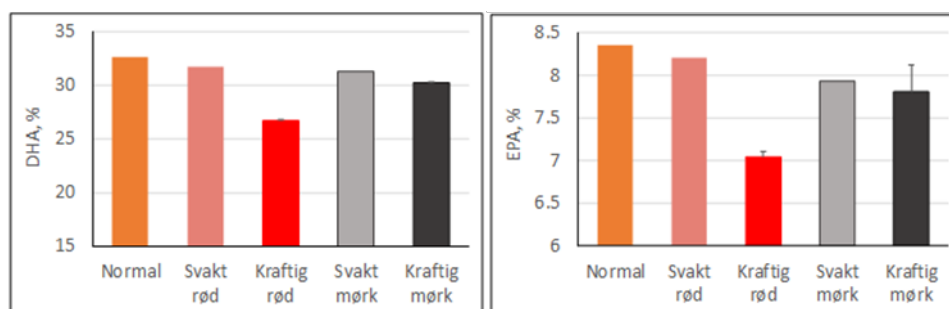
Resultatene tyder på ubalanse i fettomsetningen i de røde flekkene.



Figur 35 Fettinnhold i normal muskel og røde, grå og tydelig mørke flekker



Figur 36 Innhold av mettede fettsyrer, omega 3 og omega 6 i fosfolipidene i flekkene



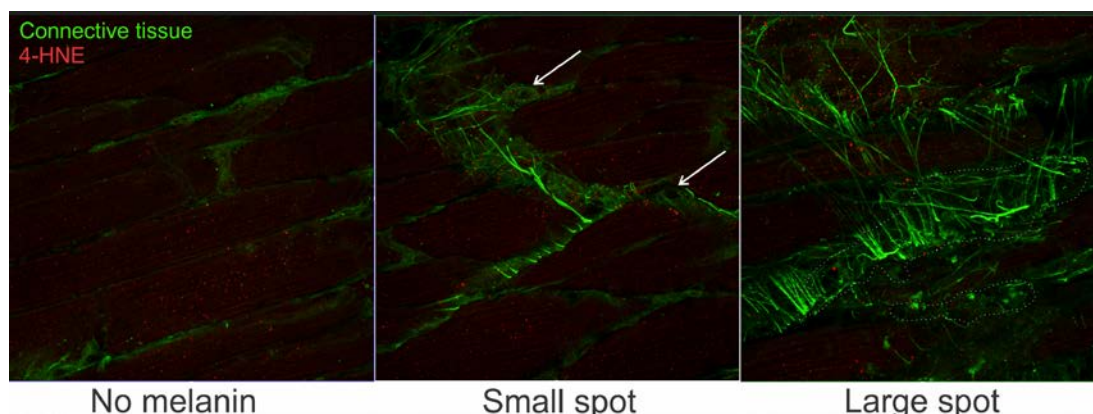
Figur 37 Innhold av DHA og EPA i fosfolipidene

10.3 Histologi

Deltakere: Jacob Torgersen og Turid Mørkøre

Vev fra laks i fôringsforsøket i storskala (høyt-/lavt protein) ble tatt ut ved slakt til histologisk analyse (se avsnitt 7.1). Prøvene ble tatt fra slaktelinjen fra normalt vev, svakt pigmenterte flekker mindre enn 3 cm og store, tydelig pigmenterte flekker større enn 3 cm. Vevet som ble tatt fra laks fôret med lavt/standard protein, ble fiksert i formalin («vasket» etanol). Vevet ble farget for bindevev og lipid oksidasjon (4-HNE).

Resultatene viste betydelig akkumulering av bindevev i de mørke flekkene, spesielt i store flekker. Videre var det noe høyere akkumulering av 4-HNE i bildene av melaninflekk enn vanlig muskel. Det tyder på at oksiderte lipider i mørke flekker (Figur 38).

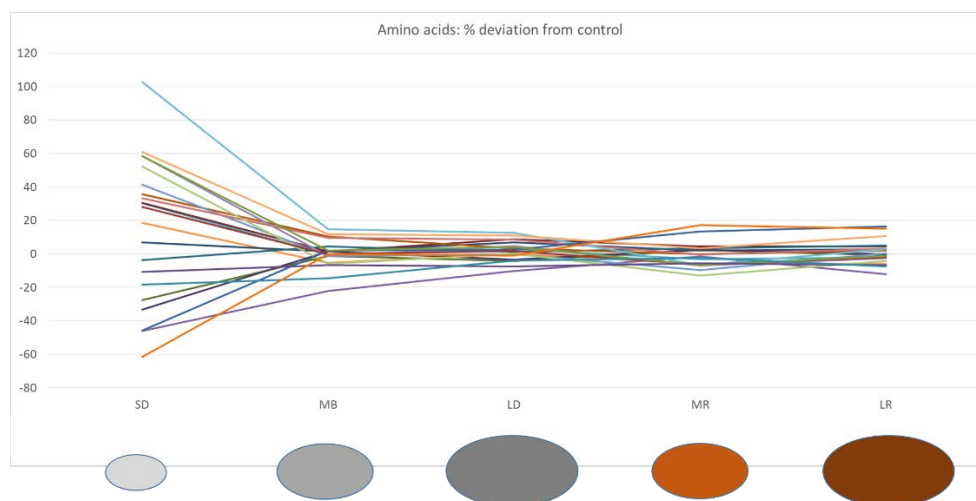


Figur 38 Histologiske snitt fra normal muskel, liten mørk flekk og stor mørk flekk. Grønne områder viser til bindevev mens røde felter i bildene indikerer oksiderte lipider.

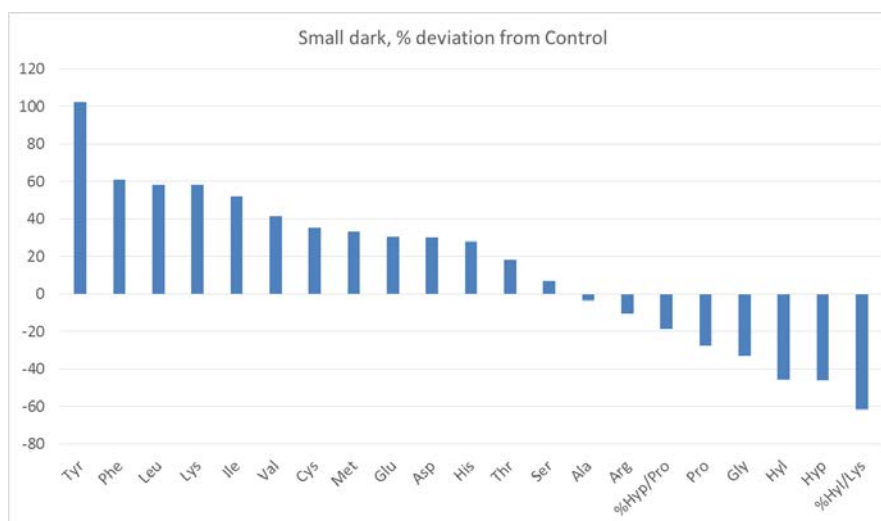
10.4 Bindevev og aminosyreprofil

Deltakere: Helena Moreno og Javier Borderias

Aminosyreprofil i materialet for karakterisering av flekker ble målt med HPLC (Moreno et al. 2012). Figur 39 viser en oversikt over avvik i prosent mellom profiler fra flekker sammenlignet med profil fra kontroll-muskel. Det er spesielt i små, mørke flekker som profilen avviker fra kontrollmuskel; Figur 40 viser aminosyrer og % avvik, der spesielt nivået av tyrosin, som omdannes til eumelanin, var ca. dobbelt så høyt som i uaffisert muskel. Dette kan indikere at en liten, mørk flekk kan bli større og kraftigere/mørkere ved at tyrosin omdannes til melanin.



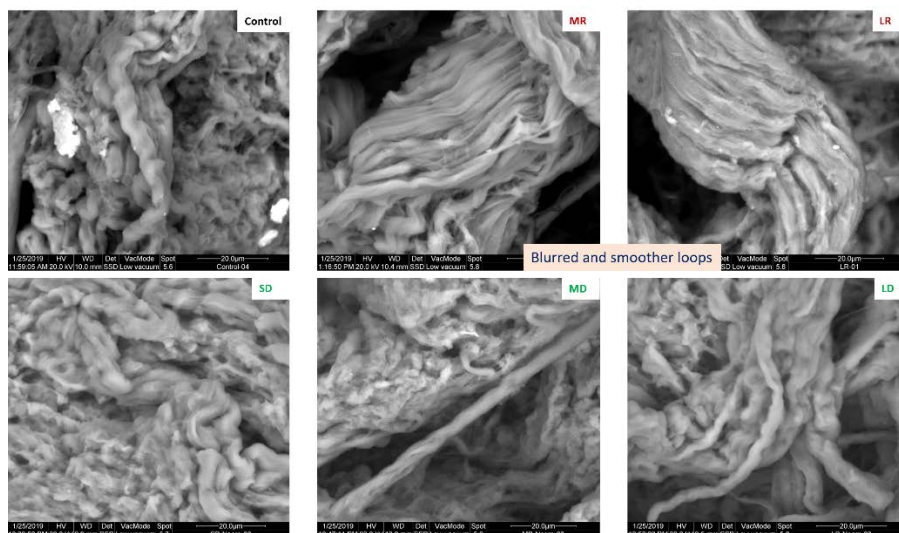
Figur 39 Aminosyreprofil; oversikt over avvik i prosent mellom profiler fra flekker sammenlignet med profil fra kontroll-muskel. D: mørk flekk (“Dark”), R: rød flekk (“Red”), S: liten flekk (“Small”), M: medium flekk (“Medium”), L: stor flekk (“Large”).



Figur 40 Aminosyreprofil; avvik i prosent mellom profilen fra små, mørke flekker sammenlignet med kontroll-muskel

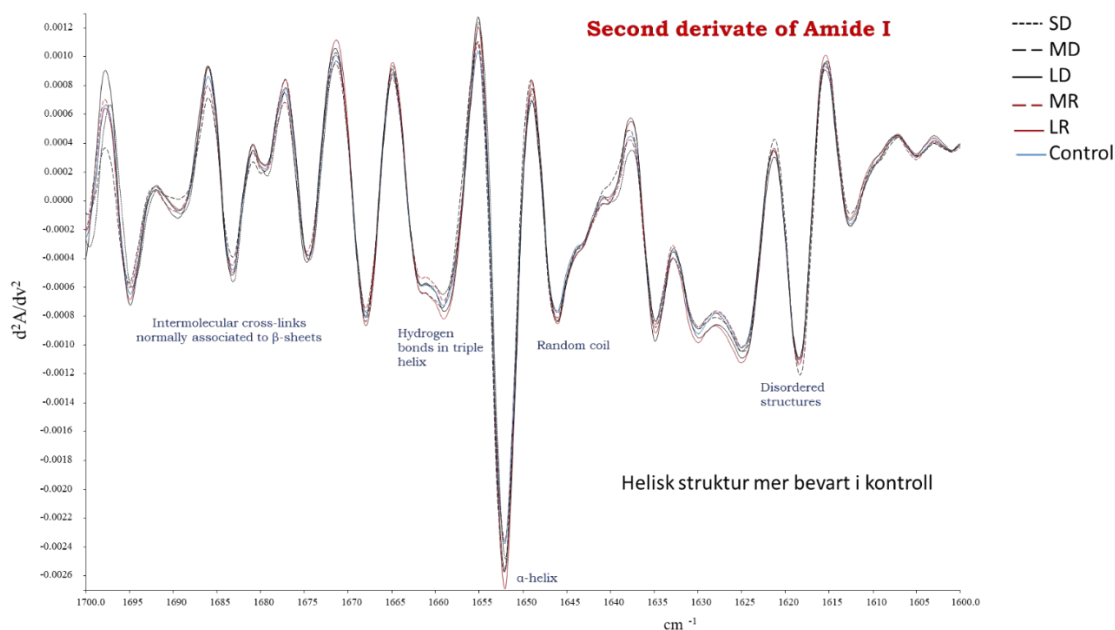
Bindevevet i muskelen fra prøvene ble også analysert for termisk stabilitet, struktur og morfologi til fibre ved “Scanning electron microscopy” (SEM, Figur 41) og “Fourier transform infrared spektroskopi” (FTIR, Figur 42) (Moreno et al. 2012 og 2016).

SEM viste mer utydelig helisk struktur til bindevevsfibre, og glattere fibre i røde flekker sammenlignet med kontroll (Figur 41). Mørke flekker lignet mer på kontroll-muskel, selv om det kunne se ut til at fibre ble glattere, med mindre helisk struktur med økende størrelse på flekkene.



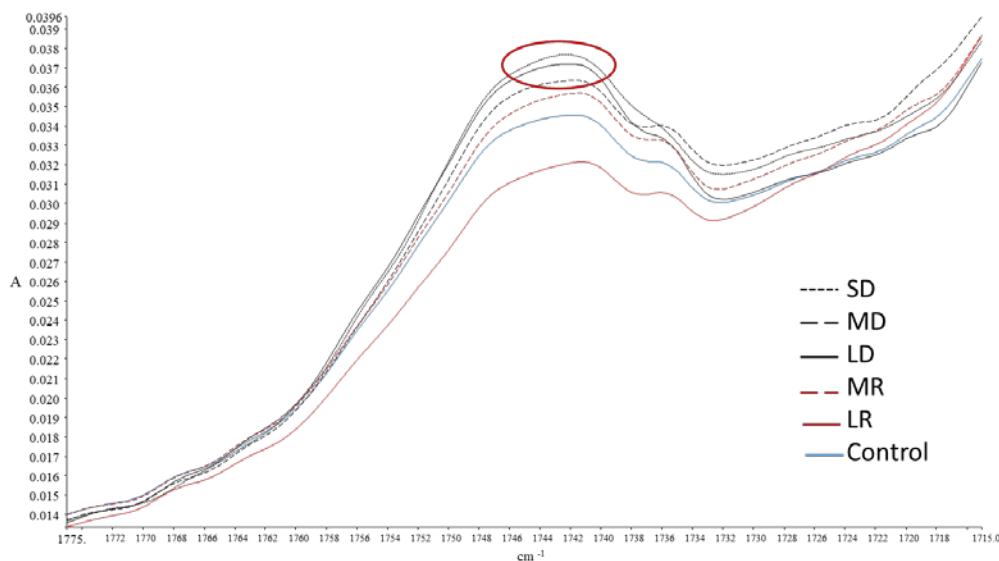
Figur 41 Scanning electron microscopy (SEM) av bindevevet fra de forskjellige prøvene. D: mørk flekk (“Dark”), R: rød flekk (“Red”), S: liten flekk (“Small”), M: medium flekk (“Medium”), L: stor flekk (“Large”).

I FTIR-analysen er amid I ofte den mest interessante toppen da den indikerer endringer i sekundærstrukturen til kollagen. Figur 42 viser sekundærderivat av spekter som gir økt oppløsning rundt amid I, og viser en mer bevart helisk struktur til kollagen fra kontroll-muskel enn muskel fra flekker (mørk og rød).



Figur 42 Sekundær derivat av Amid I fra “Fourier transform infrared spektroskopi” (FTIR) av bindevevet fra de forskjellige prøvene. D: mørk flekk (“Dark”), R: rød flekk (“Red”), S: liten flekk (“Small”), M: medium flekk (“Medium”), L: stor flekk (“Large”).

I regionen av FTIR-spektra som fokuserer på binding mellom karbohydrat og kollagen, var det tegn til høyere akkumulering av reduserende karbohydrater i bindevevet fra mørke flekker (Figur 43); dette indikerer mer stabile kryssbindinger mellom karbohydrater og lysin og/eller arginin i mørke flekker sammenlignet med kontroll og røde flekker.



Figur 43 Region fra "Fourier transform infrared spektroskopi" (FTIR) der link mellom karbohydrat og kollagen, i bindevevet fra de forskjellige prøvene, kan ses. D: mørk flekk ("Dark"), R: rød flekk ("Red"), S: liten flekk ("Small"), M: medium flekk ("Medium"), L: stor flekk ("Large").

Oppsummert viste bindevevsanalysene:

- Avvikende aminosyreprofil i små, mørke flekker sammenlignet med kontroll, røde flekker og større og mer intense mørke flekker
- Større grad av ikke-hydrolyserbare bindinger og intermolekylære kryssbindinger i kollagenet fra røde og mørke flekker, og spesielt hos store mørke og røde flekker, sammenlignet med kontrollmuskel
- Bedre bevart helisk struktur i kontrollmuskel
- Mer stabile kryssbindinger i kollagen fra mørke flekker (arrvev)

10.5 Pigmentanalyser

Deltakere: Kawasaki Wakamatsu og Shosuke Ito

Hensikten med studien var å identifisere kjemisk identitet til mørke og røde flekker ved kjemisk nedbrytning av melaninpigmenter for å undersøke hvordan mørke og eventuelt røde pigmenter produseres *in situ*. Resultatene viste at pigmentet i mørke flekker knyttes til eumelanin. Røde flekker viste seg å være avledet fra oksiderte proteiner. For å styrke denne hypotesen ble det utført tyrosinaseoksidasjon av DOPA i nærvær av laksefiletproteiner. Disse resultatene er svært interessante og tyder på at fargen på røde flekker kan knyttes til blod og/eller en spesiell type oksiderte proteiner.

10.6 Uønskede komponenter / fremmedstoffer og mineraler

Deltakere: Kristin Hamre og Thomas Larsson

Materialet beskrevet ovenfor ble analysert for tungmetaller (Berntssen et al. 2010), polyklorerte bifenyler (PCB) og pesticider (Eurofins) og mineraler (Mørkøre et al. 2015).

Mht. pesticider ble prøvene analysert for følgende tre stoffer: organonitrogene pesticider (MS1 + MS2) og organofosforylerte pesticider, og ingen av de ble detektert i noen prøver.

Nivå av fremmedstoffer, tungmetaller og mineraler var langt under EU's maksnivå (der dette eksisterer) for alle prøver (Tabell 7). Nivået av jern var noe høyere i alle typer flekker, spesielt i røde flekker, sammenlignet med kontroll. Melanin kan være en effektiv bioadsorber av fremmedstoffer, men våre studier har ikke påvist økt nivå av uønskede stoffer i mørke flekker.

Tabell 7 Tungmetaller og mineraler i røde og mørke flekker av medium og stor størrelse, og i kontrollmuskel

	PCB6 (ng/g ww) ¹	Dioksinlike PCB (pg/g ww) ^{2,3}	Dioksins (pg/g ww) ^{2,3}	Dioksins and dl-PCB (pg/g ww) ^{2,3}	Sum PAH4 (ng/g ww)	Fe (mg/kg ww)	Cu (mg/kg ww)	Total As (mg/kg ww)	Cd (mg/kg ww)	Hg (mg/kg ww)	Pb (mg/kg ww)
Kontroll	4,5	0,38	0,19	0,57	<0,5	2,3	0,5	0,85	<0,002	0,02	<0,009
Mørk flekk, medium	5,9	0,5	0,23	0,73	<0,5	5,5	0,32	1,1	<0,002	0,017	<0,009
Mørk flekk, stor	6,4	0,53	0,24	0,77	<0,5	6,3	0,3	1	<0,002	0,015	<0,009
Rød flekk, medium	4,3	0,35	0,17	0,52	<0,4	7,2	0,38	0,83	<0,002	0,017	<0,008
Rød flekk, stor	4,3	0,37	0,18	0,55	<0,4	9,1	0,48	0,89	<0,002	0,016	<0,008
EU maks	75	io	3,5	6,5	io	io	io	io	0,05	0,5	0,3

¹ PCB6: 6 selekterte PCB'er som ikke er dioksin-lignende.

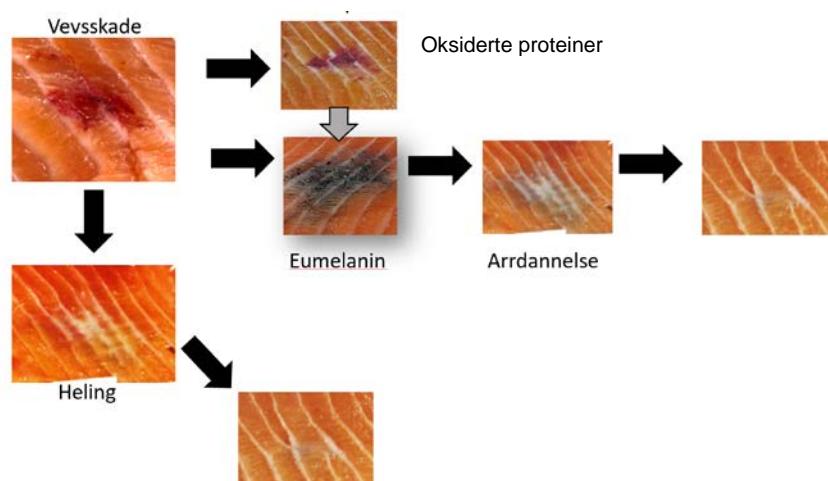
² UB: upper boundary / øvre grense, nivået av PCB'er som er under kvantifiseringsgrensen (LOQ) settes til LOQ.

³ For dioksiner, iht. TEQ2005: data tar hensyn til konsentrasjon og toksisitet ved å multiplisere konsentrasjon med en faktor som tilsvarer toksisitet-score.

io: ikke oppgitt

10.7 Mulig utvikling

Basert på de ulike resultatene vi har oppnådd i prosjektet, foreslås følgende modell (Figur 44):



Figur 44 Mulig utvikling av røde og mørke flekker

11 Cellemodeller - 1

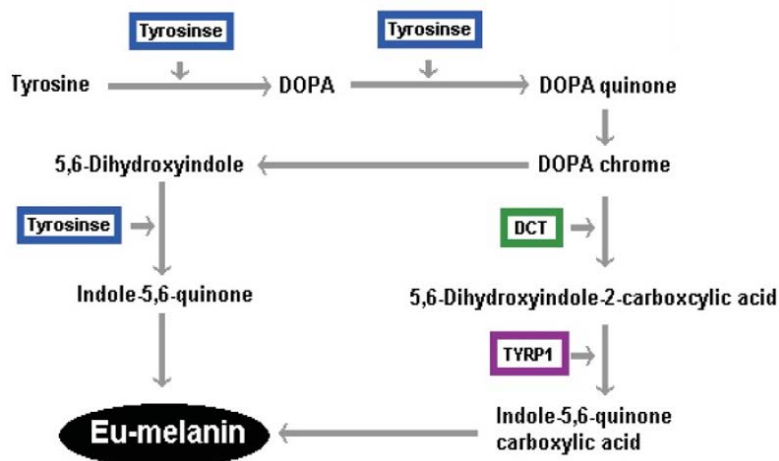
Deltakere Bente Ruyter, Antonio Sarno, Tone Kari Østbye, Marta Bou, Øivind Andersen og Inger B. Standal

11.1 Bakgrunn

Mørke flekker i filèten til laks, såkalte melaninflekker, må skjæres vekk på fileteringslinja og fører dermed til lavere pris på filèten. Dette utgjør det største og mest kostnadskrevene kvalitetsproblemet for norsk oppdrettsnæring. Man vet relativt lite om hvilke faktorer som påvirker selve melaninsyntesen og dannelsen av de mørke melaninflekkene i laksemuskel. Vi ønsket å utvikle en *in vitro* modell for å øke kunnskapen om hvilke faktorer og mekanismer som påvirker melaninsyntesen i laksen.

Ved betennelsestilstand i muskel vil en type immunceller som kalles makrofager tiltrekkes til betennelsesstedet. Disse cellene produserer melanin og kan være en medvirkende årsak til mørke melaninflekker i filet. Vi ønsket dermed å teste om primære makrofager isolert fra hodenyren til laks er egnet til studier av melaninsyntesen.

Melaninsyntesen er relativt lite studert i fisk, men fra pattedyr vet man at melanogenesen reguleres av såkalte melanogene enzymer som tyrosinase, tyrosinase-relatert protein 1 (TRP1), og tyrosinase-relatert protein 2 (TRP2), BOO, Yong Chool *et al.*, 2020. (Figur 45). Tyrosinase er et bifunksjonelt enzym som spiller en sentral rolle i melaninproduksjonen ved å katalysere hydroksyleringen av tyrosin til DOPA og deretter ved å katalysere oksidasjonen av DOPA til DOPA-quinone. TRP2 enzymet fungerer som DOPAchrome tautomerase og katalyserer omdanningen av DOPAchrome til 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylsyre (DHICA) TRP1 enzymet oksiderer deretter DHICA til en karboksylert indol-kinon.



Figur 45 Melaninsyntesen (omdanningen fra tyrosin til eumelanin som forårsaker mørke flekker i muskel (BOO, Yong Chool *et al.*, 2020)

Tidligere resultater tyder på at redusert mengde fiskeolje i fôret til laks fører til økt mengde mørke flekker i fileten (Lutfi *et al.*, 2022). I et forsøk der laks ble fôret med lavt (1–1,3 %), middels (1,6 %) og høyt (3,5 %) innhold av marine fettsyrer ble mørke flekker vesentlig redusert i muskel til laksen fôret med høyt innhold av marine fettsyrer. Mens kun 8,6 % av oppdrettslaksen som fikk mye marint fett i fôret hadde mørke flekker, lå tilsvarende tall på rundt 20 % og over, for fisk som fikk lite og middels høyt innhold (inngår som en del av 7.3).

11.2 Mål

1.1. Hovedmål: Etablere en *in vitro* modell for studier av melaninsyntesen i laks

1.2. Delmål

1. Etablere metodikk for kvantifisering av melaninsyntese i celler
 - a. Fluorescensspektroskopi
 - b. LC-MS
 - c. Immunomerking
2. Studere effekter av omega-3 fettsyrer og oksydativt stress på melaninsyntesen i makrofager

11.3 Metodikk

11.3.1 Forsøk med lakseparr føret to nivåer (1,4 og 2,8 %) av DHA for bestemmelse av melaninsyntese i makrofager

Et fôringsforsøk ble gjennomført ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra våren 2018 i prosjektet SIS-Balance (Nofima-finansiert strategisk prosjekt). Laks i ferskvannsfasen ble fordelt på 6 kar med 100 fisk i hvert kar. Fisken ble føret 2 forskjellige dietter med to nivåer av fettsyren DHA i triplikate kar. Startvekt var 4,5 gram og laksen vokste til ca. 15 gram. Ved slutt av fôringsforsøket ble makrofager isolert fra 2 laks per diettgruppe per kar (totalt 6 laks per diettgruppe).

11.3.2 Laks på ca. 400 gram føret kommersielt fôr

Laks på 200 til 400 gram i ferskvannsfasen ble hentet fra Fiskelaboratoriet ved NMBU (Senter for Bærekraftig Akvakultur) og benyttet til isolering og dyrking av makrofager for studier av effekter av oksidativt stress og DHA på melaninsyntese i makrofager.

11.3.3 Isolering av makrofager (Gjøen et al., 2007):

- Laks bedøves i MS-222, og heparin (1000 IU/kg fisk) injiseres i kaudalvenen for å forhindre blodkoagulasjon.
- Hodenyren fjernes og presses gjennom et 100 µm nylonfilter ved bruk av L-15-medium inneholdende 100 U/ml penicillin, 0,1 mg/ml streptomycin og 4 mM L-glutamin, heparin 40 U/ml) og 2 % føtalt kalveserum.
- 3,3–4 ml av cellesuspensjonen ble deretter tilsatt på toppen av en 37 %/54 % Percoll-gradient og sentrifugert ved 600xg i 40 minutter ved 4 °C (37 % Percoll-løsning ble fortynnet i fosfatbufret saltvann (PBS; 0,15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) og 54 % Percoll-løsningen ble fortynnet i L-15 medium).
- Etter gradientsentrifugering ser man et bånd av celler mellom Percoll-lagene. Dette laget tas ut og sentrifugeres ved 400xg i 10 min ved 4 °C i 20 mM PBS med 2 % BSA og heparin (40 U/ml).
- Cellene resuspenderes i L-15 dyrkningsmedium med 0,1 % FBS til en konsentrasjon på 2x10⁶ celler/ml og såes deretter ut i 6-brønners plater ved ved 13 °C.
- Ca. 4 timer etter utsåing ble de ikke-adherente cellene fjernet ved å vaske med PBS.



Figur 46 Isolering av makrofager fra hodenyren til laks

11.3.4 Celleforsøk med makrofager

Forsøk 1

Makrofager isolert fra laks (15 gram) føret høyt (2,8 %) og lavt (1,4 %) DHA nivå i føret.

Forsøk 2: Pilotforsøk for å teste effekt av DHA og oksydativt stress på melaninsyntese

Makrofager ble isolert fra laks på ca. 400 gram og dyrket i 25 cm² flasker i L-15 vekstmedium med 5 % føtalt kalveserum. Alle behandlingsgrupper (12 celleflasker) ble tilsatt 0,01 mM tyrosin (substrat for melaninsyntesen). 6 celleflasker ble tilsatt 50 µM DHA til dyrkningsmediet og 6 celleflasker som kontroller uten tilsetning av DHA ble dyrket i 3 dager. Deretter ble 3 celleflasker i hver gruppe tilsatt oksydativt stressor 4 µM Menadion og dyrket videre et døgn før høsting av celler til genuttrykksanalyse av tyrosinase og melaninbestemmelse vha LC-MS.

Forsøk 3: Påvise forekomst av melanin vha LC-MS, Fluorescensspektroskopi og immunomerking

Makrofager ble isolert fra laks på ca. 200 gram og dyrket i 25 cm² flasker i L-15 vekstmedium med 5 % føtalt kalveserum. Alle behandlingsgrupper (12 celleflasker) ble tilsatt 0,01 mM tyrosin (substrat for melaninsyntesen). 3 celleflasker ble tilsatt 50 µM DHA til dyrkningsmediet og 3 celleflasker som kontroller uten tilsetning av DHA ble dyrket i 3 dager. Deretter ble 3 celleflasker i hver gruppe høstet til melaninbestemmelse i både dyrkningsmediet og cellepellet vha LC-MS og Fluorescensspektroskopi. Makrofager ble også dyrket på mikroskopi objektglass for immunomerking med melanin antistoff.

Forsøk 4: Dose responsforsøk med DHA

Makrofager ble isolert fra laks på ca. 200 gram og dyrket i 6 brønnsbrett i L-15 vekstmedium med 5 % føtalt kalveserum. Alle behandlingsgrupper ble tilsatt 0,01 mM tyrosin (substrat for melaninsyntesen). Cellene ble inkubert med henholdsvis 0, 5, 10, 20, 30 og 50 µM DHA til dyrkningsmediet i 3 dager. Deretter ble cellene høstet til melaninbestemmelse vha. fluorescensspektroskopi.

11.3.5 Fluorescensspektroskopi for kvantifisering av melanin i *in vitro*-dyrkede makrofager

Melaninnivået i celler ble kvantifisert ved Fluorescensspektroskopi som beskrevet av Fernandes et al., 2018.

Celler ble sådd ut i 6-brønnsplater med en tetthet på ca. $3,5 \times 10^5$ celler/brønn. Cellene tilsatt 0,2 % (v/v) etanol ble benyttet som negativ kontroll. Ved slutt av forsøk med ulike behandlinger ble celler høstet, pelletert og re-suspendert i 500 µL 1M NaOH 10 % (v/v) DMSO. Etter inkubasjon ved 80 °C i 1 time ble cellelysaten sentrifugert ved 3000 g i 5 minutter og absorbansen målt. Deretter ble en hydrogenperoksidoppløsning tilsatt til prøvene til endelig konsentrasjon på 30 % (v/v) og inkubert ved 25 °C i 4 timer. Resulterende fargeløs til lysegule løsning ble deretter sentrifugert for å fjerne celledbris og fluorescensen i prøvene målt (470nm/550nm). Melaninnhold ble beregnet ved bruk av syntetisk melanin som standardkurve. Resultatene ble normalisert ved analyse av enten proteinnivåer eller celleantall i hver prøve. Proteininnholdet i prøvene ble bestemt ved hjelp av (Bio-Rad, CA, USA) med bovint serumalbumin (BSA) som proteinstandard.

11.3.6 Melaninkvantifisering ved bruks av LC-MS

Celler ble direkte ekstrahert etter tining. Melanin er generelt ikke løselig i vandig løsning. 1 ml cellemedium og celle-pellets ble ekstrahert og analysert. Kontrollprøver besto av laksefilet med og uten svarte flekker. Prøvene ble ekstrahert og oksidert ved å tilsette 250 µl 30 % hydrogenperoksid og 250 µl 2 M ammoniumhydroksid per 25 mg vev, celle-pellets og 1 ml cellemedium. Prøvene ble deretter sentrifugert i 1 minutt og inkubert ved romtemperatur i 4 timer. Deretter ble oksidasjonsreaksjonen stoppet ved å tilsette 100 µl 10 % NH₄SO₃. Prøvene ble deretter vakuumsentrifugert ved romtemperatur til de var tørre og løst på nytt i 500 µl milliQ vann for LC-MS/MS-analyse. Prøvene ble deretter filtrert

gjennom 0,2 µm polyetersulfonfiltre (PALL). Prøver ble analysert på en Agilent 1260 HPLC koblet til et Agilent 6470 trippel kvadropol massespektrometer utstyrt med en elektroprayonkilde som opererer i negativ modus. Injeksjonsvolumet var 5 µl. HPLC-kolonnen var en Agilent ZORBAX RX-SIL-kolonne (2,1 x 100 mm, 1,8 µm partikkelstørrelse) i HILIC-modus ved 25 °C. Mobilfasen besto av (A) 0,1 % (28 %) ammoniumhydroksid i acetonitril og (B) 200 mM ammoniumhydroksid (pH 9,0). HPLC-strømningshastigheten var 300 µl/min med følgende 20 minutters program: 20 % B i 6,5 min, til 60 % B i 6,6 min, til 20 % B i 10 min, og ved 20 % B i 20 min. Masseovergangene for PTCA var 198 -> 154 og 198 -> 110 for kvantifisering.

11.3.7 Melanin antistoff (gave fra Dr Ekaterina Dadachova, University of Saskatchewan)

Konsentrasjon av antistoff: 5 mg/mL, Bruksløsning 20 µg/mL.

Opphav: mus

Antistoffer er beskrevet i følgende publikasjoner; Dadachova, Ekaterina, et al. "Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin." Proceedings of the National Academy of Sciences 101.41 (2004): 14865-14870.

Rosas, Ángel L., et al. "Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents." Infection and Immunity 68.5 (2000): 2845-2853.

Sekundært antistoff: Anti-mus

11.3.8 Immunumerking av makrofager med melanin antistoff

Cellene ble fiksert i 10 % formaldehyd, vasket 3x5 min i PBS og deretter inkubert 10 min i 50 mM NH₄Cl. Etter 2x vask i PBS ble cellene permeabilisert med 0,1 % Triton X-100 i PBS i 10 min.

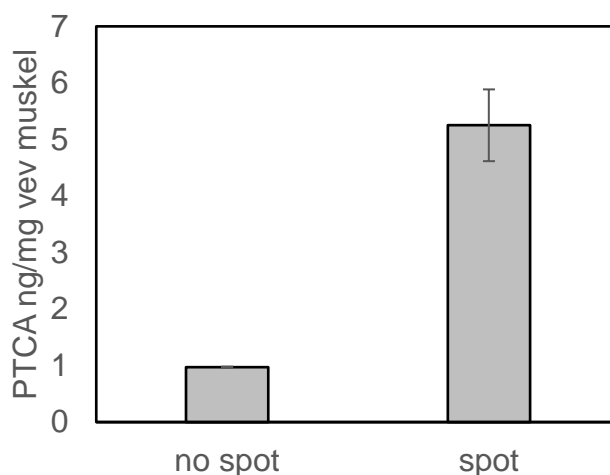
Cellene ble vask 1x med PBS før blokkering i 1 % BSA i PBS i minimum 30 min.

Primært antistoff ble fortynnet i 1 % BSA i PBS. Cellene ble inkubert i minimum 1t i primært antistoff og så vasket 3x 10 min i PBS. Sekundært antistoff ble fortynnet i 1 % BSA i PBS. Cellene ble inkubert minimum 30 min (mørkt) før v 3x 10 min vask i PBS.

11.4 Resultater

11.4.1 Analyse av muskel med og uten mørke flekker for test av LC-MS metode for bestemmelse av melanin

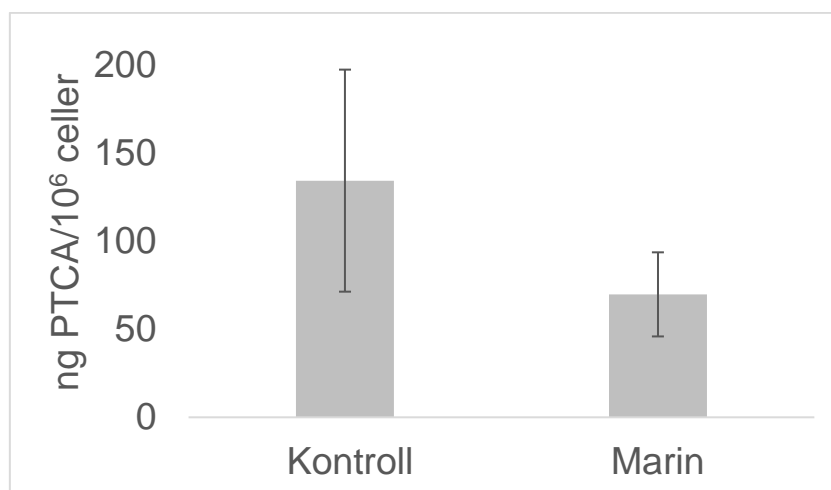
Før vi startet å analysere melanin i isolerte makrofager ønsket vi å teste ut følsomheten på analysemetodikken ved å analysere ekstrakt av muskel med og uten mørke flekker. PTCA (fragment av eumelanin) ble lett kvantifisert i prøver av mørke flekker fra muskel, det vil si at alle prøver lå innenfor det lineære området til standardkurve. Mørke flekker fra laksemuskel ga høyere PTCA-nivåer per mg vev enn kontrollprøve tatt fra muskel uten mørke flekker (Figur 47). Resultatet viser at LC-MS metoden er en sensitiv metode for bestemmelse av lave nivåer av melanin derivater.



Figur 47 PTCA-nivåer ng/mg laksefiletprøver med og uten svarte flekker. Feilfelt representerer +/- SD av to tekniske replikater.

11.4.2 Forsøk 1 med isolerte makrofager fra laks føret to nivåer av DHA i føret

Figur 48 viser mengde PTCA dannet i makrofager dyrket i cellemedium tilsatt 0,01 mM tyrosin. PTCA nivået ble analysert per $2,5 \times 10^6$ celler dyrket. Figuren viser at de målte PTCA-nivåene lå mellom 50-150 ng PTCA per 10^6 celler. Det var relativt store individuelle forskjeller i nivåene av PTCA innen de to ulike diettgruppene, noe som igjen førte til at det ikke var signifikant forskjell i PTCA nivå mellom de to diettgruppene. Det var imidlertid en tendens til lavere PTCA-nivå i marin gruppe føret 2,8 % DHA i dietten sammenlignet med kontrollgruppe føret 1,4 % DHA i dietten ble observert; henholdsvis 60 ng PTCA/ 10^6 celler i marin gruppe sammenlignet med 130 ng PTCA/ 10^6 celler i kontroll gruppe.

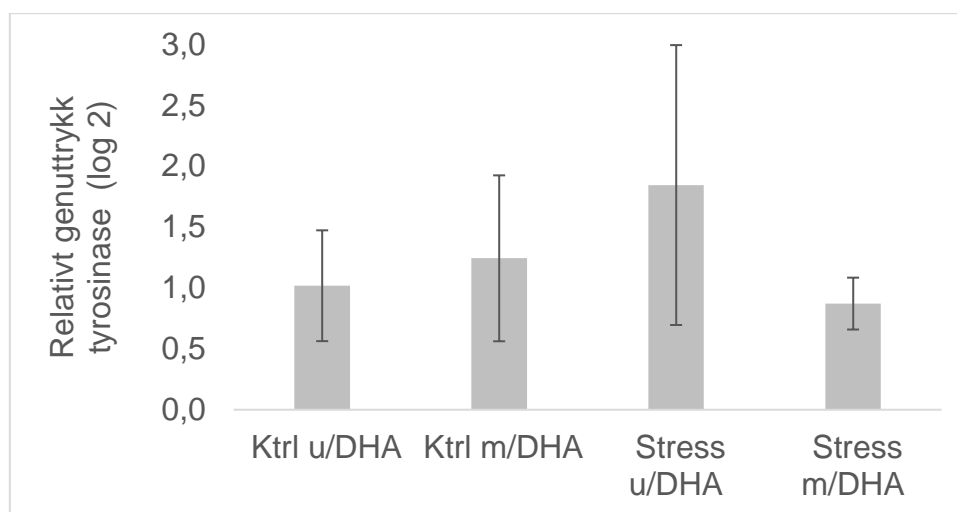


Figur 48 PTCA-nivåer målt med LC-MS (ng/ 10^6 celler) i makrofager isolert fra laks føret henholdsvis 1,4 % (kontroll) og 2,8 % (Marin) DHA i dietten. Feilfelt representerer +/-sem av 3 gjentak.

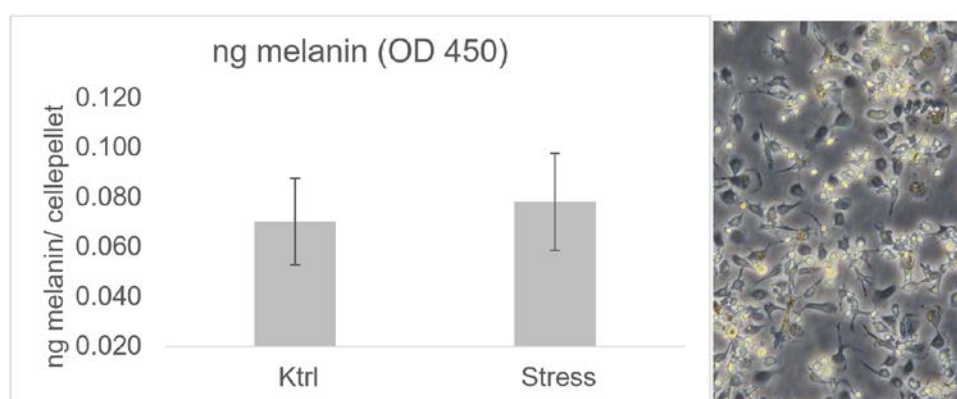
11.4.3 Forsøk 2 med isolerte makrofager fra laks og effekt av oksidativt stress og DHA

Figur 49 viser ingen signifikante effekter av DHA og oksidativt stress på relativt genuttrykk av tyrosinase i isolerte makrofager. Det var en tendens til at DHA førte til redusert uttrykk av tyrosinase under oksidativt stress. Det var ingen signifikant forskjell i nivåene av melanosin i makrofager tilsatt DHA med og uten oksidativt stress (Figur 50). Pga. få paralleller og at kun OD-måling ble benyttet til kvantifisering av

melanin kan vi ikke konkludere hvorvidt oksidativt stress påvirker melaninsyntesen i makrofager. OD-måling er en metode som viste seg å være lite sensitiv/nøyaktig.



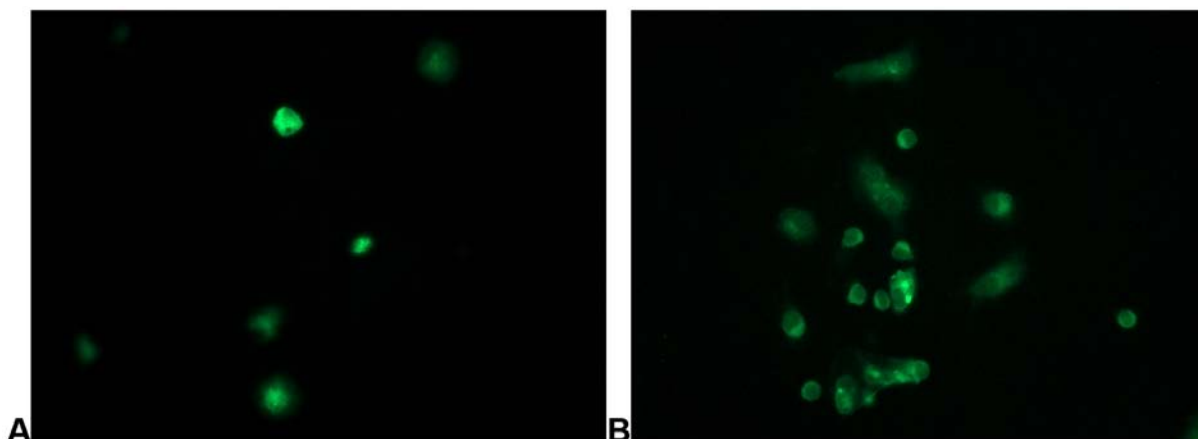
Figur 49 Relativt genuttrykk av tyrosinase i kontrollceller uten DHA og med DHA, og tilsvarende to grupper med og uten påført oksidativt stress (Menadion)



Figur 50 Nivå av melanin i kontrollceller uten og med DHA påført oksidativt stress (Menadion). Melanin ble målt med OD 450 nm (lite sensitiv metode) og fasekontrastmikroskopibilde av makrofager i kultur (20x forstørrelse).

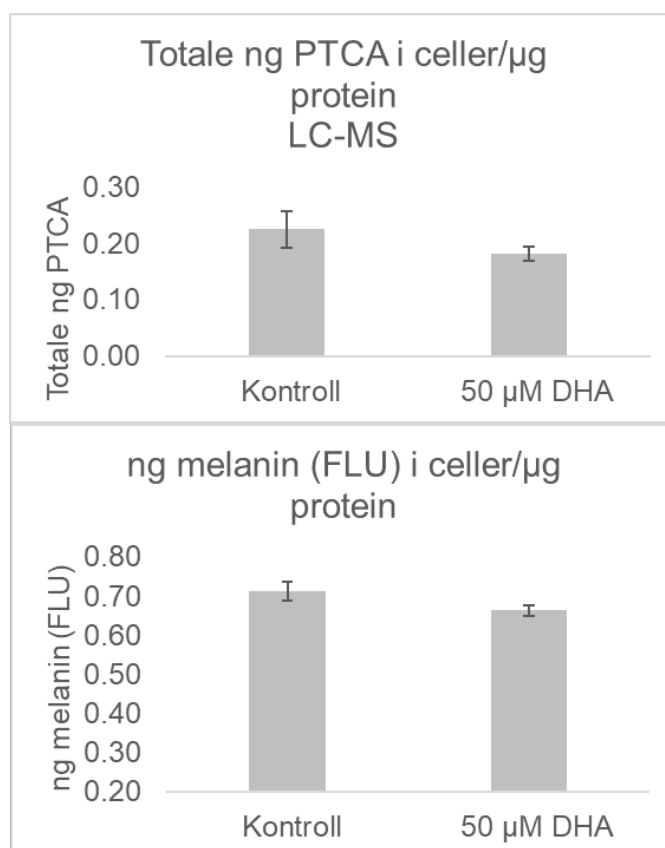
11.4.4 Forsøk 3, Påvise forekomst av melanin vha immunomerking, LC-MS og fluorescensspektroskopi

Figur 51 viser økende immunofarging av melanin med økende nivå av tyrosin (substrat for melaninsyntesen) tilsatt makrofager i kultur. Dette viser at et antistoff utviklet for melanin i mus også fungerer for påvisning av melanin i makrofager til laks.



Figur 51 Immunomerking av melanin (grønn farge) i makrofager gitt henholdsvis 0,01 mM tyrosin (A) og 0,02 mM tyrosin (B). (20x forstørrelse).

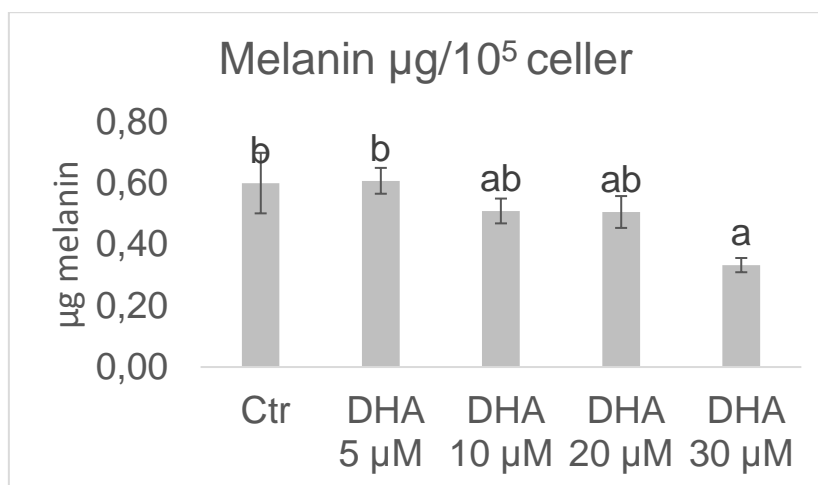
Figur 52 viser en sammenligning av de to kvantifiseringsmetoder, LC-MS og fluorescensspektroskopi, for bestemmelse av melanin-nivå og PTCA nivå i ng/mg celleprotein i makrofager dyrket i medium med og uten 50 µM DHA og 0,01 mM tyrosin. Resultatene fra begge analysemetoder er i overensstemmelse og viser en tendens til at DHA fører til redusert melaninsyntese i makrofager.



Figur 52 Sammenligning av to kvantifiseringsmetoder (LC-MS og fluorescensspektroskopi) for melanin-nivå i ng/mg celleprotein i makrofager dyrket i medium med og uten 50 µM DHA og 0,01 mM tyrosin

11.4.5 Forsøk 4: Doseringsforsøk med DHA og melaninbestemmelse ved fluorescensspektroskopi

Figur 53 viser signifikant reduksjon i melaninsyntesen i makrofager med økende DHA konsentrasjon.



Figur 53 Kvantifisering av melaninsyntesen (fluorescensspektroskop) i makrofager dyrket i medium tilsatt 0, 5, 10, 20 og 30 µM DHA og 0,01 mM tyrosin

Våre funn er i overensstemmelse med tidligere studier med celler fra mus (B16F10) hvor celler ble dyrket med ulike doser, fra 1 til 25 µM DHA, i tre dager (Balcos et al., 2014). Studien viste at DHA førte til doseavhengig reduksjon i både ekstracellulær melaninfrigivelse og tyrosinase-aktivitet, noe som er forenlig med redusert melanininnhold i DHA-behandlede celler.

12 Cellemodeller - 2

Deltakere: Øystein Evensen og Cheng Xu

High and low EPA/DHA – impact on expression levels of Dct and Tyr *in vitro*

Studies were carried out to explore the impact of high and low EPA/DHA levels in conditioning media for cell culture.

SHK1 cells (salmon head kidney cells, permanent cell line) were incubated with L-15 medium containing 2 % plasma from salmon fed two different diets, low and high amount of ω -3, EPA+DHA. The low ω -3 diet contained 13 mg/kg and the high group, 35 mg/kg of feed. The sum of EPA/DHA in serum from the low group was 24 mmol/l and from the high group, average of 32.7 (sum EPA/DHA).

The conditioning of the SHK1 cells was done by first incubating the cells for 7 days, the cells were then split into several wells (in 24-well plates) and incubated with 2 % salmon plasma for another 7- and 14-days using plasma from the 2 groups referred above.

For wells of cells from each group were sampled for RNA extraction and qPCR analysis. Control cells were grown without addition of salmon plasma. Expression of Tyr (tyrosinase) and Dct (dopachrome tautomerase) gene (mRNA) was measured by qRT-PCR. Expression levels were expressed relative to control cells after normalization to β -actin. The results are expressed as mean \pm SEM.

By 14 days (and 14 days post primary split), there was significant reduction in Dct expression but not for Tyr (Figure 54) in the high omega-3 group compared to controls and low omega-3. By 21 days, Dct is significantly lower than controls and low omega-3, and Tyr expression is also significantly lower than control.

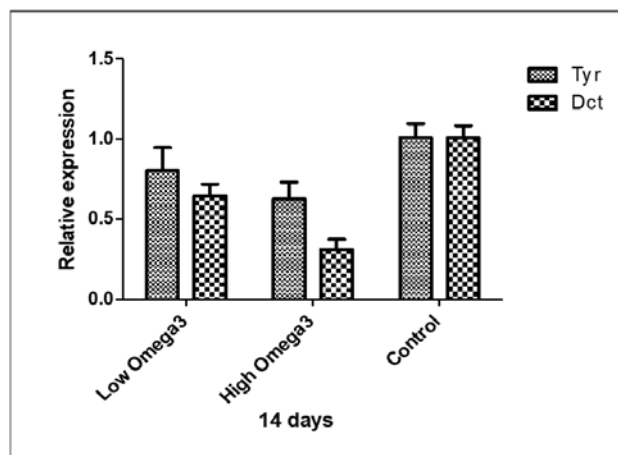


Figure 54 Relative expression (mRNA) of Dct and Tyr at 14 days showing that Dct has a significantly lower expression in the high omega-3 group

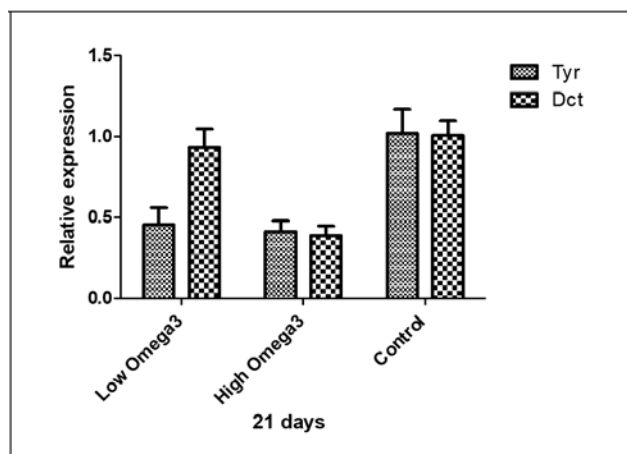


Figure 55 Relative expression (mRNA) of Dct and Tyr at 21 days showing that Dct has a significantly lower expression in the high omega-3 group. Tyr is also reduced relative to control at 21 days.

12.1.1 Impact of temperature on expression levels of Dct and Tyr *in vitro*

Part 1

SHK-1 cells were grown at 20 °C to confluence in T75 flask and split into multiple wells in 24-well plates. Two plates of cells were kept at 15 °C and 20 °C separately (Figure 56). 4 wells of cells were harvested after 7 and 17 days incubation at the two temperatures.

Expression of Tyr and Dct gene at each time point was measured by qRT-PCR and the expression levels were relative to the levels of 15 °C for 7 days after normalization to β -action.

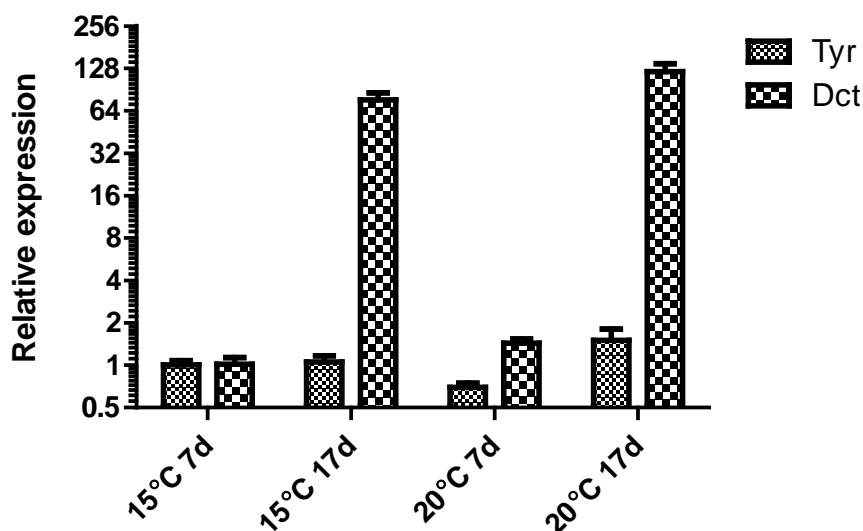


Figure 56 At 15 °C, there is no difference between Tyr and Dct expression levels at 7 days of incubation but by 17 days, Dct increased significantly compared to day 7, and was also significantly higher than Tyr. At 20 °C, there was no significant differences at 7 days of incubation but by 17 days, Dct had increased significantly. When comparing Tyr and Dct over the two temperatures used, there was no difference.

Part 2

The experiment was repeated, and different manipulations of temperature was used, both up- and down regulation and different combinations of bringing the temperature up (after a conditioning) and then down (after conditioning). The results are shown in Figure 57, and in essence, temperature manipulation for the two genes have no significant impact on expression levels but there are differences in response to increased (or lowered) temperature for Dct and Tyr, and while Tyr has in principle no response to temperature, temperature fluctuations will impact on Dct expression.

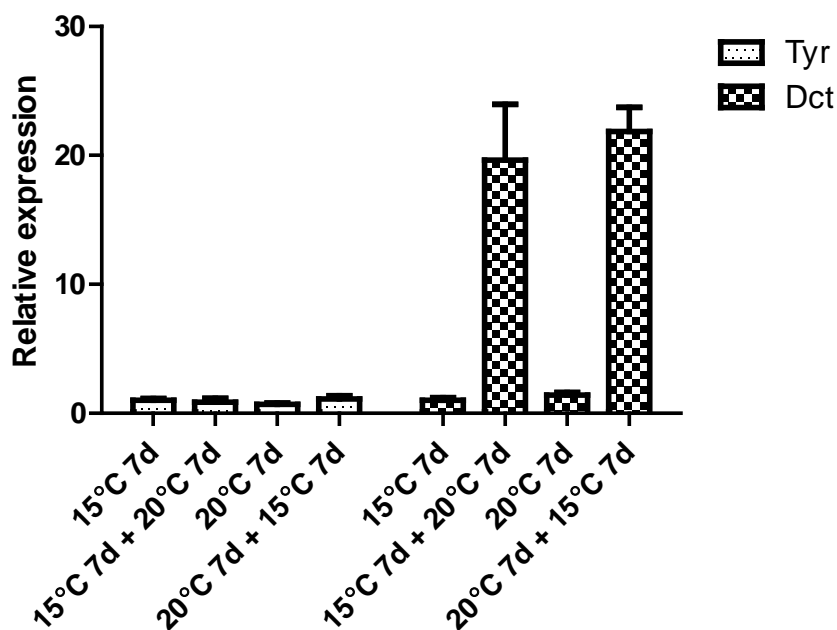


Figure 57 Relative expression of Tyr and Dct following different temperature manipulations. There is no significant effect over different temperatures ranges by manipulation of temperature has more effect on Dct than Tyr expression.

12.1.2 Delineating effect of DHA on Dct and Tyr expression

While conditioning SHK-1 cells in plasma containing different levels of EPA/DHA resulted in differences in expression levels; the next step was to explore the importance of DHA *per se*. DHA was selected since it is assumed this ω -3 will have more impact than EPA. Synthetic EPA was produced by NOFIMA (Dr. Bente Ruyter) and after some initial toxicity testing to SHK-1 cells, it was decided to include 1 and 5 μ m of DHA in the culture medium.

SHK-1 cells were incubated with these two concentrations over a period of 14 days (post splitting) giving a total incubation period of 14 and 21 days after primary split. 4 wells of cells from each group were sampled for RNA extraction and qPCR analysis. Control cells were grown without addition of DHA. Expression of Tyr and Dct gene were measured by qRT-PCR and the expression levels were relative to the levels of control cells after normalization to EF1AB. The results are expressed as mean \pm SEM (n=4).

The obtained results are shown in Figure 58, at 14 and 21 days post primary split (7 and 14 days of incubation with DHA).

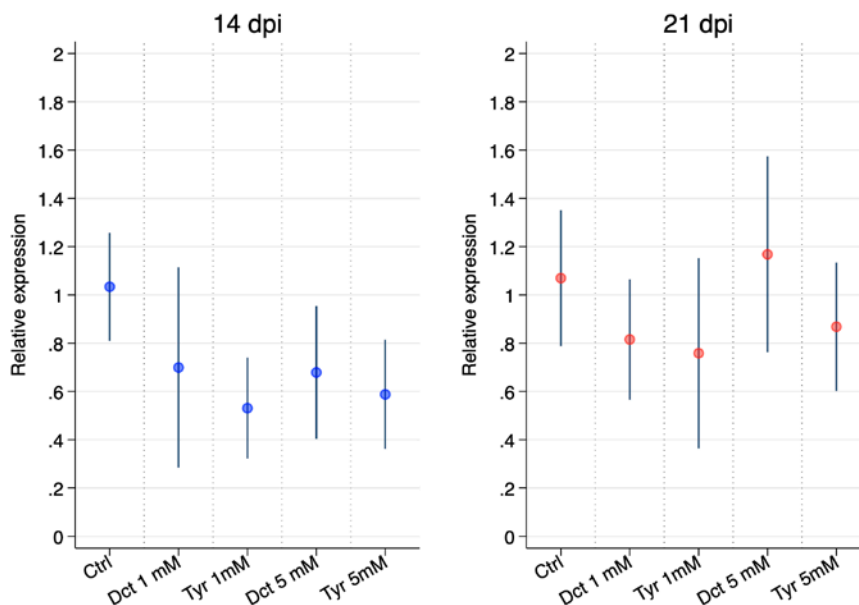


Figure 58 Expression levels of controls, and Dct and Tyr at 1 and 5 μM (note that the mM is not milli but micro)

Statistical analysis for differences between controls and 1 and 5 μM at 14 days (7 days of incubation) is shown in Table 8 and Table 9. As seen, there is significant down-regulation of Tyr expression but not for Dct.

Table 8 14 dpi for Tyr (7 days of incubation with DHA). 1 and 5 μM of DHA reduces the expression of Tyr but there are no differences between 1 and 5 μM (p=0.917).

Pairwise comparisons of means with equal variances

Over: **dha**

	Number of comparisons	
dha	3	

exp	Contrast	Std. err.	Tukey t	P> t	Tukey [95% conf. interval]	
dha						
1 vs 0	-.4821237	.1436393	-3.36	0.021	-.8831655	-.081082
5 vs 0	-.4247248	.1436393	-2.96	0.039	-.8257666	-.0236831
5 vs 1	.0573989	.1436393	0.40	0.917	-.3436429	.4584406

Table 9 14 dpi for Dct (7 days of incubation with DHA). There is no reduction in Dct at 1 and 5 μ M of DHA ($p>0.05$).

Pairwise comparisons of means with equal variances

Over: **dha**

	Number of comparisons
dha	3

exp	Contrast	Std. err.	Tukey		Tukey	
			t	P> t	[95% conf. interval]	
dha						
1 vs 0	-.3557108	.2628339	-1.35	0.403	-1.089544	.3781229
5 vs 0	-.3762542	.2628339	-1.43	0.366	-1.110088	.3575795
5 vs 1	-.0205434	.2628339	-0.08	0.997	-.754377	.7132902

By 21 days post splitting (14 days of incubation with DHA), there was no difference for either Dct or Tyr (details not shown).

12.1.3 RNA seq analysis of SHK-1 conditioned cells

Samples were collected from SHK-1 cells incubated with low omega-3 and high omega-3 groups, and sampling was done at 14 and 21 days post splitting (7 and 14 days of incubation).

There are 6 comparisons in the setup for RNAseq study, NC_14d-VS-Low Omega3_14d, NC_14d-VS-High Omega3_14d, Low Omega3_14d-VS-High Omega3_14d-VS, NC_21d-VS-Low Omega3_21d, NC_21d-VS-High Omega3_21d, Low Omega3_21d-VS-High Omega3_21d.

At an overall level there were marked gene expression levels obtained for the two groups (vs. control) at the different time points. This is summarized below (Figure 59).

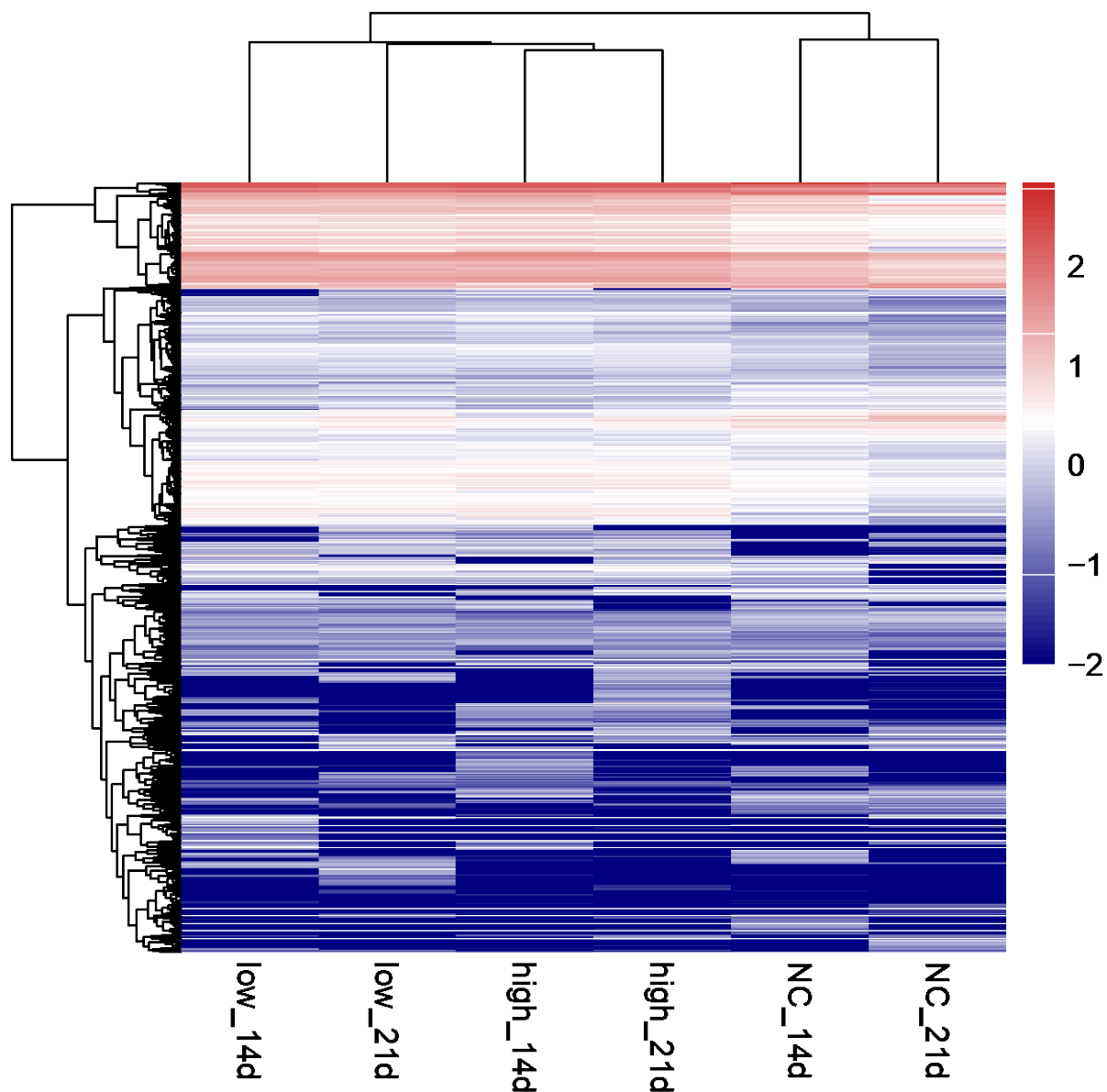


Figure 59 Obtained gene expression data NC (negative control, non-treated), and low and high at 14 and 21 d

Further to this, a pathway analysis was performed and the Tyrosine metabolism in the KEGG pathway is enriched in all the omega-3 treatment groups (Figure 60 and Figure 61).

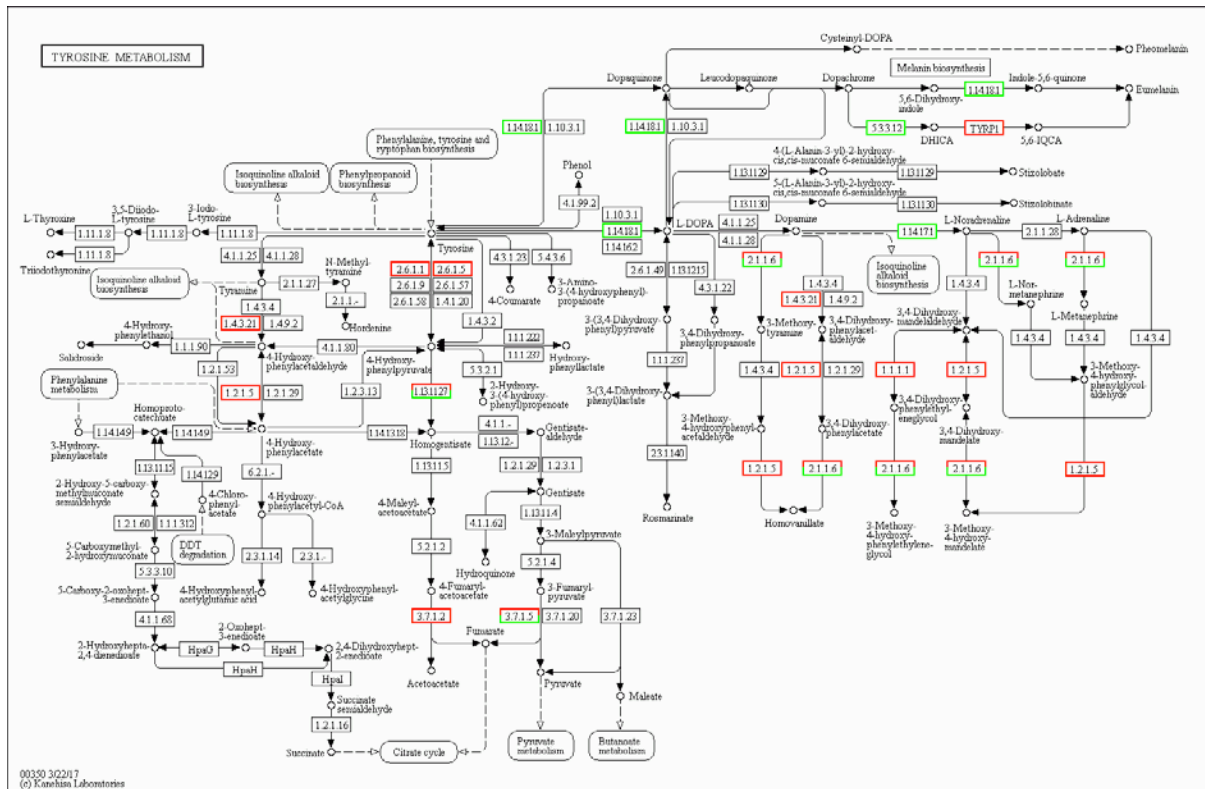


Figure 60 Tyrosine metabolism when contrasting NC_VS-High omega-3 – both at 14 days. Green colors indicate down-regulation, red is upregulation.

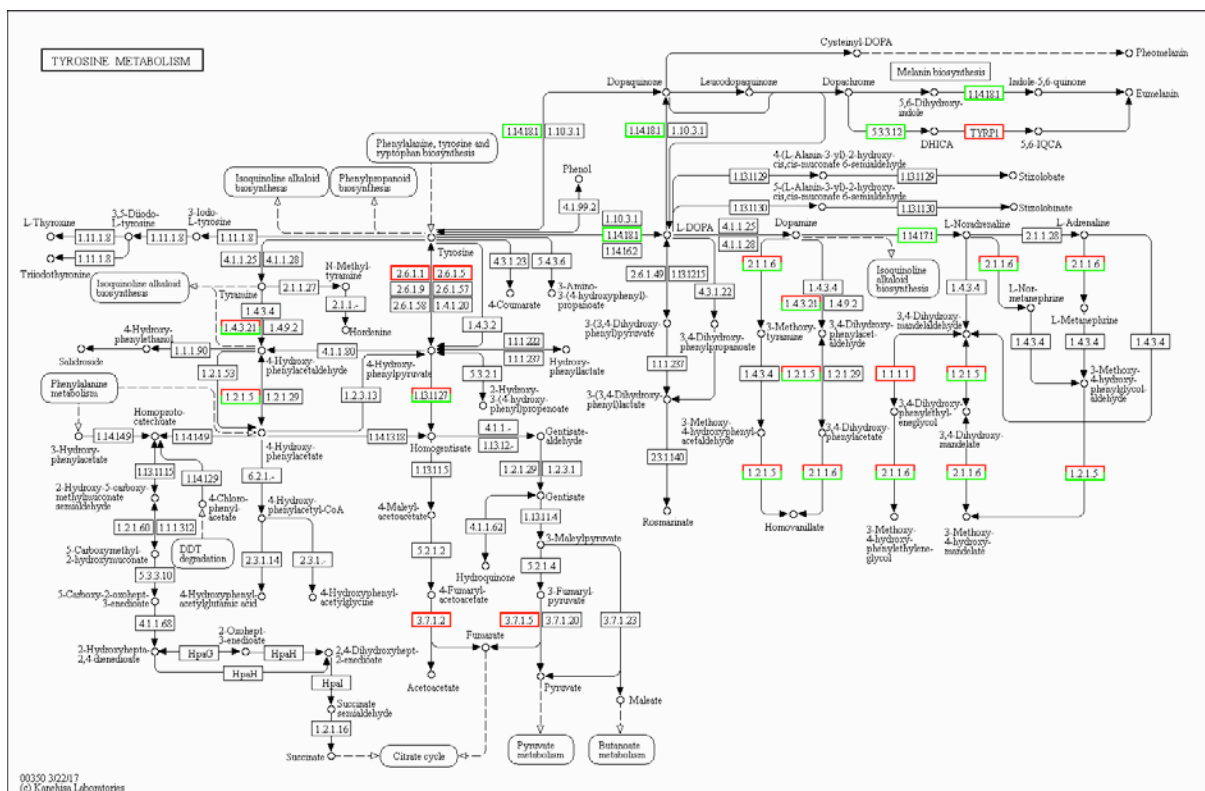


Figure 61 Tyrosine metabolism when contrasting NC_VS-High Omega3 – both at 21 days. Green color indicates down-regulation, red is upregulation.

The analyses at day 21 are almost copies of each other showing that both low and high levels of omega-3 enrich tyrosine pathways. Pathways towards eumelanin and pheomelanin have been downregulated.

This applies for indole 5-6 quinone, and pathways generating DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid). Further analysis would be required to understanding the implications of these findings, but in general they conform with the observation of down-regulated mRNA expression of Tyr and Dct under given conditions.

12.1.4 Konklusjon knyttet til celleforsøk

For å kunne studere hvordan ulike næringsstoffer og prosesser påvirker melanogensen, har vi etablert to ulike *in vitro* modeller for å studere melaninsyntesen. Ved å tilsette tyrosin som et substrat for melaninsyntesen til makrofager dyrket i kultur, kan vi nå ved hjelp av luminescense bestemme ned til nanogramnivåer av melanin syntetisert i cellene. Vi har også etablert en metode for å immunomerke med spesifikt antistoff og fluorencensemikroskopi tilstedeværelsen av melaninkompleks i celler. Melanin-dannelsen i celler er bekreftet også ved LC/MS analyser ved SINTEF. Ved bruk av denne metodikken har vi vist at tilsetting av DHA til cellene reduserer melaninsyntesen fra tyrosin i makrofager.

Vi har etablert in vitro modeller for å studere melaninsyntesen i laks og vist at omega-3 fettsyren DHA reduserer dannelsen av melanin

Resultatene viser at økt nivå av omega-3 fettsyrer (DHA/EPA) påvirker genreguleringen av enzymer knyttet til dannelse av melanin, og økt nivå av omega-3 vil gi en nedregulering dannelsen av melanin/melanin-varianter. Dette er vist i cellekultur og sammenfaller med feltstudier hvor ulike nivåer av omega-3 i fôret påvirker forekomsten av svarte flekker.

13 Leveranser

13.1 Poster, faktaark (5)

FAQ Dark Spots in salmon fillets. 2019. Vedlegg 3.

Jiménez-Guerrero, R., Bæverfjord, G., Mørkøre, T., 2022. Long term effects of early feeding on morphology and mechanical strength of Atlantic salmon skeleton. XX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING, 9. juni Sorrento, Italia.

Mørkøre, T. 2022. Marine omega-3 inhibits severe development of dark spots in salmon fillets – but how much? file:///C:/Users/turim/Downloads/2022_1115omega-3darkspots.pdf

Jimenez-Guerrero, R., Bæverfjord, G., Mørkøre, T., 2022. Fôret i ferskvannsfasen kan påvirke lakseskjelettet ved slakt.

Mørkøre, T., Ruyter, B., Rørvik, K-A., 2018. Nutritional effects on dark fillet spots of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Las Palmas June 3rd - 7th

13.2 Populærvitenskapelige artikler (4)

Mørkøre, T., 2022. Hvor mye omega-3 bør foret inneholde for å hemme utvikling av mørke flekker. Norsk Fiskeoppdrett 10, 50-51.

Ribbeinsbrudd årsak til melaninflekker. Næringsnytte Nofima 2023

Denne fettsyren fremmerfiletkvalitet. Næringsnytte Nofima 2021 side 16.

Mørkøre, T., Larsson, T., 2021. Klemskader kan gi økt forekomst av mørke filetflekker. Norsk Fiskeoppdrett 46, 42–43, 2021.

13.3 Vitenskapelige artikler (4)

Jiménez-Guerrero, R., Bæverfjord, G., Evensen, Ø., Hamre, K., Larsson, T., Dessen, J.E., Gannestad, K.H., Mørkøre, T., 2022. Rib abnormalities and their association with focal dark spots in Atlantic salmon fillets. *Aquaculture*, 561, 738697. 1-s2.0-S0044848622008146-main.pdf (14.23Mb)

Ruyter, B., Bou, M., Berge, G.M., Mørkøre, T., Sissener, N.H., Sanden, M., Lufti, E., Romarheim, O.H., Krasnov, A., Øsbye, T.K.K., 2022. A dose-response study with omega-3 rich canola oil as a novel source of docosahexaenoic acid (DHA) in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater; effects on performance, tissue fatty acid composition, and fillet quality. *Aquaculture* 561, 738733.

Lufti, E., Berge, G.M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Bou, M., Larsson, T., Mørkøre, T., Evensen, Ø., Sissener, N., Rosenlund, G., Sveen, L., Østbye, T.-K., Ruyter, B.S., 2022. Increasing dietary levels of the omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA, improves the growth, welfare, robustness, and fillet quality of Atlantic salmon in sea cages. *Br J Nutr* 1-19. <https://hdl.handle.net/11250/2990992>

Kousoulaki, K., Berge, G.M., Mørkøre, T., Krasnov, A., Bæverfjord, G., Ytrestøyl, T., Carlehög, M., Sweetman, J., Ruyter, B., 2020. Microalgal *Schizochytrium limacinum* biomass improves growth and file quality when used long-Term as a replacement for fish oil, in modern salmon diets. *Frontiers in Marine Science* 7, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00057>.

13.4 Presentasjoner (14)

Jiménez-Guerrero, R., Bæverfjord, G., Evensen, Ø., Hamre, K., Larsson, Dessen, J-E., Gannestad, K. H., Mørkøre, T., 2022. Dark spots in Atlantic salmon fillets is associated with damaging incidents

- in the rib cage. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB). Olhão, Algarve, Portugal. November 9-12.
- Mørkøre, T, Larsson, T. 2022. High content of plant proteins in fresh-water diets for Atlantic salmon increased mortality in seawater and deteriorated fillet quality at harvest. XX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING, 9. juni Sorrento, Italia.
- Lutfi, E., Berge, G.M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Mørkøre T., Bou M., Østbye, T-K., Ruyter, B. 2022. Re-evaluating the dietary requirement of EPA and DHA in Atlantic salmon and its complexity. XX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING, 9. juni Sorrento, Italia.
- Jiménez-Guerrero, R., Bæverfjord, G., Evensen, Ø., Hamre, K., Larsson, T., Dessen J-E., Gannestad, K. H., Mørkøre, T. 2022. Dark spots in Atlantic salmon fillets are associated with damaging incidents in the rib cage. XX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING, 9. juni Sorrento, Italia.
- Larsson, T & Mørkøre, T. 2021. Effekt av tidlig ernæring på tilvekst og filetkvalitet av oppdrettslaks. Det 15. norske fiskeernæringsseminar, 9-10. november 2021, arrangør: Nofima.
- Larsson, T. 2020. Tilvekst, velferd og kvalitet i slaktefisk; Effekt av smoltkvalitet og oppdrettsmiljø. HAVBRUK 2020, Digital konferanse, 9-10. juni.
- Ruyter, B., 2019. The oils of the millennium feed meet the salmon's need. Seminar: Where salmon biology meets new technology. AquaNor, Trondheim, 19-23rd of August
- Ruyter, B., 2019. The oils of the millennium feed meet the salmon's need. Mini-seminar: Nutritional requirements and new feed resources - salmon and cod. AquaNor, Trondheim, 19-23rd of August
- Mørkøre T, Meng Y, Larsson T, Rørvik K-A, Kousoulaki K, Berge GM, Ruyter B. 2018. Nutritional effects on dark fillet spots of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, June 3rd – 7th, 2018.
- Mørkøre, T., Larsson, T., Bæverfjord, G., Ruyter, B., Berge, G.M., Kousoulaki, K., Rørvik, K-A., Dessen, J-E., Ytrestøyl, T., 2018. Mørke flekker i laksefilet. Betydning av fôr og forhold i tidlige livsfaser. Havbruk 2018, Oslo.
- Mørkøre, T., 2018. Melanosis in Atlantic salmon/Factores asociados a la aparición de Melanosis en salmón de cultivo. Food Safety meeting. SalmonChileINTESAL V Jornadas de Inocuidad. La ciencia tras el salmón de Chile. 17 de Mayo, Hotel Enjoy, Puerto Varas.
- Mørkøre, T., 2018. Dietary effects on fish welfare and fillet quality. 3rd Aquaculture Conference 2018: Recent Advances in Aquaculture. Qingdao.
- Mørkøre, T., 2018. Melanosis in salmon fillets and associated factors. Workshop Melanosis (Taller de trabajo) Puerto Varas.
- Mørkøre, T., Ruyter, B., Rørvik, K-A., 2018. Nutritional effects on dark fillet spots of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Las Palmas June 3rd – 7th

13.5 Andre omtaler

- <https://thefishsite.com/articles/melanin-spots-linked-to-fractured-ribs-in-farmed-salmon>
- <https://www.aquafeed.com/newsroom/news/study-suggests-aquafeeds-may-not-be-the-cause-of-melanin-spots/>
- <https://nofima.com/results/rib-fractures-may-be-the-main-cause-of-melanin-spots>
- <https://partner.sciencenorway.no/aquaculture-fish-fish-farming/farmed-salmon-most-likely-get-dark-spots-from-rib-fractures/2110070>
- <https://ilaks.no/nofima-mener-a-ha-funnet-viktig-arsak-til-melaninflekker/>
- <https://nofima.no/resultater/ribbeinsbrudd-kan-vaere-viktigste-arsak-til-melaninflekker/>
- <https://matogmarked.no/forskning/2022/ribbeinsbrudd-kan-vaere-viktigste-arsak-til-melaninflekker-i-filet>

<https://www.kyst.no/melaninflekker-nofima-pressemedling-ribbeinsbrudd-kan-vaere-viktigste-arsak-til-melaninflekker/1453432>

<https://kommunikasjon.ntb.no/pressemedling/ribbeinsbrudd-kan-vaere-viktigste-arsak-til-melaninflekker?publisherId=9232871&releaselid=17946959>

<https://forskning.no/fisk-fiskehelse-mat/oppdrettslaks-far-trolig-morke-flekker-av-ribbeinsbrudd/2110156>

<https://www.salmonexpert.cl/costillas-deformidades-fracturas/investigadores-asocian-anomalias-sea-con-melanosis-en-salmon/1234733>

<https://www.mispecies.com/noticias/Manchas-oscuras-en-el-filete-del-salmon-pueden-ser-provocadas-por-lesiones-en-las-costillas/>

Ribbeinsbrudd årsak til melaninflekker. Nofima Næringsnytte 2023

DHA-fettsyren fremmer kvalitet på laksefilet. 2022. <https://kommunikasjon.ntb.no/pressemedling/dha-fettsyren-fremmer-kvalitet-pa-laksefilet?publisherId=9232871&releaselid=17924506>. Publisert 19.1.2022.

Har funnet at DHA-fettsyren fremmer filet-kvalitet. 2022. <https://nofima.no/resultater/har-funnet-at-dha-fettsyren-fremmer-filet-kvalitet/>. Sist oppdatert 21.09.2022. Publisert 19.01.2022.

<https://www.researchgate.net/project/EX-spot-Morke-flekker-i-laksefilet-Dark-spots-in-salmon-fillets-Melanosis-en-filetes-de-salmon>

Calidad del filete: Chile, Noruega y Tasmania se enfrentan al mismo desafío ("Fillet quality: Chile, Norway and Tasmania face the same challenge"). <https://www.salmonexpert.cl/article/calidad-del-filete-chile-noruega-y-tasmania-se-enfrentan-al-mismo-desafio/>. Publisert 04.06.2018.

<https://www.intrafish.no/fou/gir-millionstotte-til-forskning-pa-morke-flekker-i-laksefileten/2-1-326295>. Publisert 02.05.2018.

13.6 Mastergrader (8)

Græsdal, M., 2022. Effekt av håndtering før slakt og diett på velferd hos oppdrettslaks (*Salmo salar*). Master thesis, Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences. 60 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/3000013>

Karki, R., 2022. Effect of dietary protein and lipid sources on technical quality of pellets for Atlantic salmon Master thesis, Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences. 60 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2999851>

Trovaag, J. E., 2021. Dietary effects on growth, skin morphology and stress marker genes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Master thesis., Norwegian University of Life Sciences 30 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2986030?locale-attribute=no>

Xiaoxiao, C., 2020. Fillet quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary and environmental treatments. Master thesis, Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences. 30 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2720153>

Patterson A.A., 2019. Dietary effect on skeletal development of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Master thesis, Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences. 30 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2640867>

Gjelseth, I.J., 2019. Effekt av EPA og DHA på farge, tekstur og væsketap i fersk og røkt Atlantic laks (*Salmo salar* L.). Masteroppgave Nord Universitet 60 ECT.

Chidakwa, V. 2018. Non-invasive prediction of vertebral deformities and mineral deposition using Computed Tomography (CT) for the advancement in breeding of Atlantic salmon. Master thesis, Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences. 60 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2642651?locale-attribute=en>

Pandey, B., 2018. Pellet technical quality of feeds for Atlantic salmon. Master thesis, Norwegian University of Life Sciences, Faculty of Biosciences. 30 ECT. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2569989>

13.7 Bachelorgrader (1)

Trovaag, J. E., 2019. Betydningen av oppdrettsforhold for fiskevelferden hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Bachelor thesis, Norwegian University of Life Sciences

14 Referanser

- Ashla AA m.fl. 2010. Genetic analysis of expression profile involved in retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato Res.* 40:594-604.
- Bacle A. and Ferreira T. 2019. Strategies to counter saturated fatty acid (SFA)-mediated lipointoxication. In *The Molecular Nutrition of Fats* (ed. Patel V. B.), pp. 347-363. Academic Press.
- Bacle A, Kadri L, Khoury S, Ferru-Clément R, Faivre JF, Cognard C, Bescond J, Krzesiak A, Contzler H, Delpech N, Colas J, Vandebrouck C, Sébille S, Ferreira T. 2020. A comprehensive study of phospholipid fatty acid rearrangements in metabolic syndrome: correlations with organ dysfunction. *Dis Model Mech.* 2020 Jun 15;13(6):dmm043927. doi: 10.1242/dmm.043927. PMID: 32303571; PMCID: PMC7328154.
- Balcos MC m.fl. 2014. Docosahexaenoic acid inhibits melanin synthesis in murine melanoma cells in vitro through increasing tyrosinase degradation. *Acta Pharm.Sinica* 35: 489–495.
- BOO, Yong Chool. Up-or downregulation of melanin synthesis using amino acids, peptides, and their analogs. *Biomedicines*, 2020, 8.9: 322.
- Berntssen MHG, Julshamn K, Lundebye A-K (2010) Chemical contaminants in aquafeeds and Atlantic salmon (*Salmo salar*) following the use of traditional- versus alternative feed ingredients. *Chemosphere* 78, 637-646.
- Brandshaug OK, 2016. Påvisning av melaninflekker i filet hos slakteklar Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Masteroppg. Akvamed. UiT
- Eurofins (pesticidanalyser). Pesticider – metode: ASU L 00.00-34:2010-09. Utførende laboratorium/ Underleverandør: Eurofins Dr. Specht Laboratorien (Hamburg), Grossmoorbogen 25, 2.Eingang 2.OG, DE-21079, Hamburg DIN EN ISO/IEC 17025:2005 D-PL-14198-01-00.
- Färber F. 2017. Melanin spots in Atlantic salmon fillets - An investigation of the general problem, the frequency and the economic implication based on an online survey. Masteroppg. NMBU, IHA.
- Galvan I, Alonso-Alvarez C. 2008. An intracellular antioxidant determines the expression of a melanin-based signal in a bird. *PlosOne* 3: e3335.
- Gaspari AA, Tyrind SK. 2008. *Clinical and basic immunodermatology*. Springer Forlag, London.
- Gjøen, T., Kleveland, E. J., Moya-Falcón, C., Frøystad, M. K., Vegusdal, A., Hvattum, E., ... & Ruyter, B. (2007). Effects of dietary thia fatty acids on lipid composition, morphology and macrophage function of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(1), 103-111.
- Lerfall J m.fl. 2012. Effect of pancreas disease (PD) on quality attributes of raw and smoked fillets of Atlantic salmon. *Aquac* 324, 209-217.
- Folkestad A, Wold JP, Rørvik KA, Tschudi J, Haugholt KH, et al. (2008) Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 280: 129–135.
- Lutfi, E., Berge, G. M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Bou, M., Larsson, T., Mørkøre, T., Evensen, Ø., Sissener, N.H., Rosenlund, G., Sveen, L., Østbye, T-K., Ruyter, B. (2022). Increasing dietary levels of the n-3 long-chain PUFA, EPA and DHA, improves the growth, welfare, robustness and fillet quality of Atlantic salmon in sea cages. *British Journal of Nutrition*, 1-19.
- McGlinchey m.fl. 2009. The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis. *PNAS* 106: 13731-13736.
- Meyskens Jr m.fl. 2001 Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigm Cell Res* 14: 148–154.
- Moreno, H. M., Montero, M. P., Gómez-Guillén, M. C., Fernández-Martín, F., Mørkøre, T., & Borderías, J. (2012). Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture. *Food chemistry*, 134(2), 678-685.
- Moreno HM m.fl. 2016. Effect of selective breeding on collagen properties of Atlantic salmon. *Food Chem* 190: 856-863.

Mørkøre T Larsson T Kvellestad AS Koppang EO Åsli M Krasnov A Dessen J-E Moreno HM Valen E Gannestad KH Gjerde B Taksdal T Bæverfjord G Meng Y Heia K Wold JP Borderias AJ Moghadam H Romarheim OH Rørvik K-A (2015) Mørke flekker i laksefilet - Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget. Nofima report 34/2015.

Sissener m.fl. 2016. Reduced n-3 long chain fatty acid levels in feed for Atlantic salmon do not reduce growth, robustness or product quality through an entire full scale commercial production cycle in seawater. *Aquac* 464: 236-245.

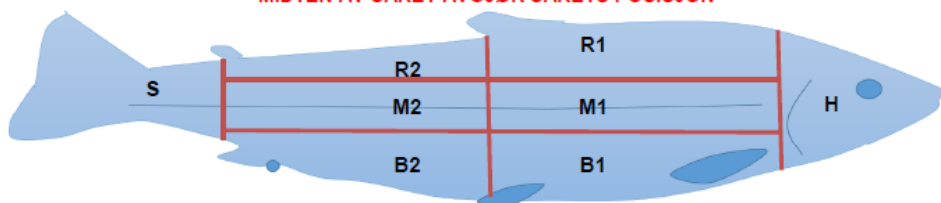
Yu W m.fl. 2017. A preliminary study on the pattern, the physiological bases and molecular mechanism of the adductor muscle scar pigmentation in Pacific Oyster. *Front. Phys* 8:699

Vedlegg 1

ARNAUDS SÅR SKALA

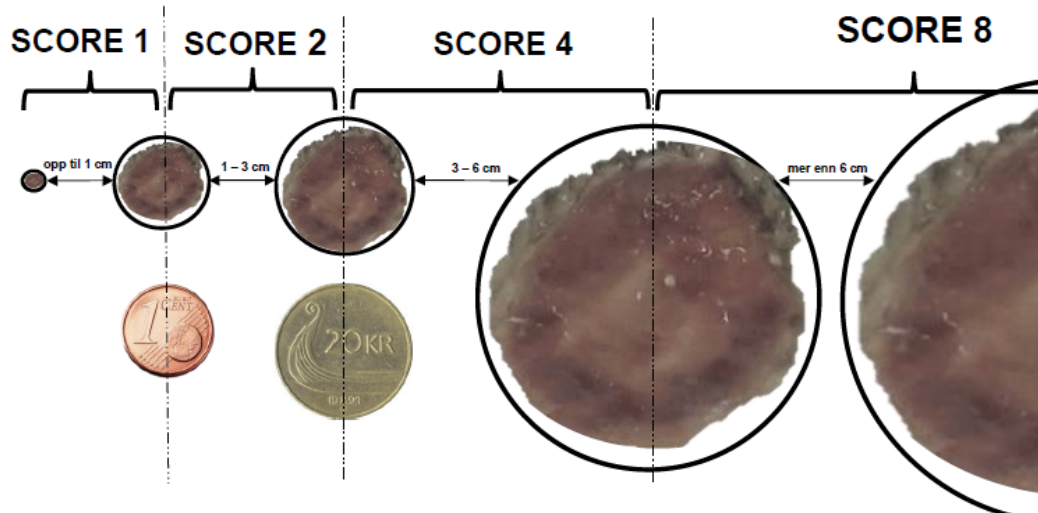
POSISJON

MIDTEN AV SÅRET AVGJØR SÅRETS POSISJON

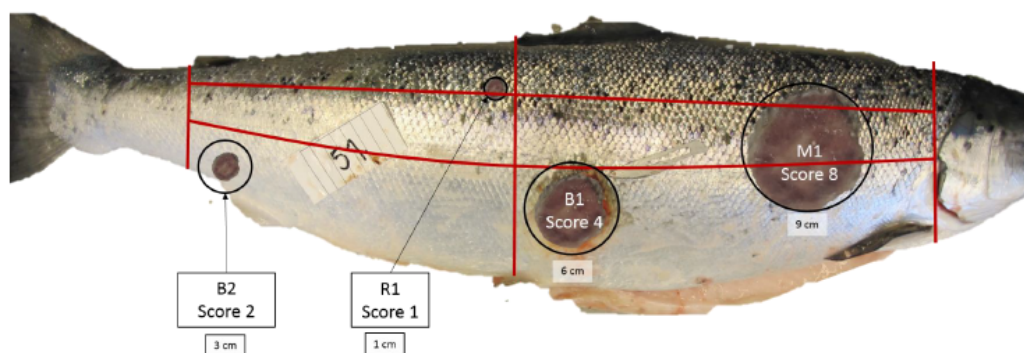


STØRRELSE

SÅRETS STØRRELSE BESTEMMES UT FRA DIAMETER



EKSEMPEL



Arnaud Lefrancois & Turid Mørkøre

VEDLEGG 2

18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding
Las Palmas de Gran Canaria, Spain June 3rd – 7th, 2018
Updated per 2021



Nutritional effects on dark fillet spots of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

Turid Mørkøre, Thomas Larsson, Jens-Erik Dessen, Katerina Kousoulaki, Gerd M. Berge, Bente Ruyter, Kjell-Arne Rørvik
Nofima, The Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture

Dark fillet spots represent the greatest and most costly quality deviation of farmed Atlantic salmon. The problem is present in the seawater phase in all significant salmon producing countries. On average every fifth salmon fillet has dark hyperpigmented myotomes. The focal spots are typically 3 cm wide, localized in the belly area of the fillets. Dietary composition affects prevalence, spot size and degree of hyperpigmentation.

Appearance

More than 90% of the spots are observed in the cranioventral fillet part. Most spots are grayish-black, but they can vary in appearance from red – black – grayish.

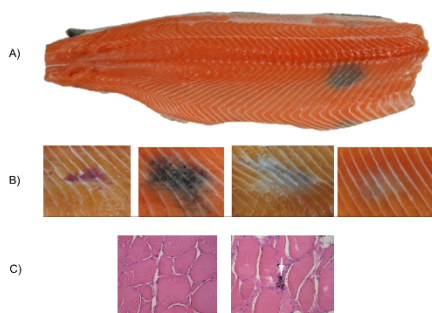


Figure 1. Images illustrating A) Fillet with a dark spot in the most frequently affected area B) Different appearance of fillet spots C) Micrographs of normal (left) and hyperpigmented myotomes (right): muscle tissue with some inflammation and pigmented cells indicated by arrow head

Aim

To give an overview of existing knowledge on nutritional effects on dark fillet spots of Atlantic salmon.

Experiments and results

Small scale

1. Feeding trials were carried out with farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in triplicate 125m³ net pens per dietary treatment. Crude protein and lipid content of the diets were 35 – 37% (Figure 2).

1a. The fish were fed a commercial diet or the same diet added dl- α -tocopherol acetate (vitamin E; 300 vs. 800 mg/kg) and organic selenium (Se; 0.4 vs. 0.6 mg/kg), copper (12 mg/kg CuSO₄) or ZnSO₄ (Zn; 100 vs 230 mg/kg) for ten weeks prior to harvest in August 2014 (weight increase 2.5 kg to 3.8 kg). Supplementation of Vit E + Se resulted in fewer (0.2 vs. 0.6; P = 0.03) and Cu in increased number of dark stained myotomes (0.9 vs. 0.6; P = 0.05). Zn had no significant effect on the number of dark stained myotomes (0.4 on average).

1b. The fish were fed a commercial feed or the same feed added dl- α -tocopherol acetate (vitamin E; 300 vs. 800 mg/kg)+organic selenium (Se; 0.4 vs. 0.6 mg/kg)+ ROVIMIX® STAY-C®35 (Vit C 50 vs. 400 mg/kg). The feeding period was the same as for Experiment I. The fish were harvested in March 2015 (weight increase from 3.6 - 4.2 kg). Salmon fed Vit E + Vit C + Se had significantly fewer dark stained myotomes compared with the control (0.6 vs. 0.9; P = 0.04).

1c. Life-long study with heterotrophic marine microalgae as fish oil replacement in salmon feeds; *Schizochytrium* sp. (Alltech) with 60% lipid and ~13% protein (DHA 25% of f.a.). All fish oil was replaced by Algalmeal; the amount of EPA+DHA (1.25%) and n3/n6 ratio were similar in the experimental diet and the control diet. The fish were harvested in January 2017 (body weight 3 kg). Salmon fed the diet supplemented with the marine microalgae had significantly fewer dark stained myotomes compared with the control (0.02 vs. 0.5; P = 0.04).

Prevalence

In Norway the prevalence of dark spots increased from 5% in 1995 to an average level of 19% since 2014. The prevalence varies within and between farming regions.

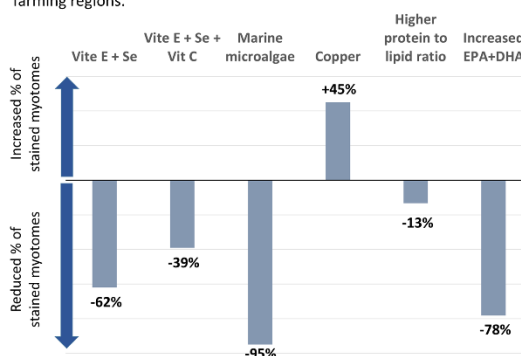


Figure 2. Dark stained myotomes relative to a Control diet of Atlantic salmon fed diets supplemented with Vitamin E + Se, Vitamin E + C and Se, heterotrophic marine microalgae (*Schizochytrium* sp.), copper, increased protein to lipid ratio or increased EPA+DHA.

Small scale

2. Feeding trials were carried out with farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L., from 0.3 kg until harvest size, in triplicate 125m³ net pens per dietary treatment. The fish were fed isoenergetic (26 MJ/kg) diets with EPA+DHA inclusion from 10 to 35 g/kg. The highest inclusion level, as compared with the lowest, had positive and significant effects on growth/size, fillet colour (24.9 vs 23.6 SalmoFan points), liquid loss during storage and prevalence of dark spots (9 vs 35%).

Large scale

- Reducing EPA + DHA from 8 to 5% of total fatty acids in salmon feed during the seawater phase resulted in increased prevalence of dark spots (28% vs. 21.5%) (Sissener et al. 2016).
- Increasing EPA + DHA from 1 to 3.5 % of the diet reduced number of muscle segments affected by dark hyperpigmentation by 78 % (Ruyter et al. 2021).
- Salmon fed diets supplemented with krill have generally lower prevalence of dark spots
- Organically produced salmon have generally lower prevalence
- Protein-rich diets can reduce losses during disease outbreaks (PD, HSMI), and reduce the prevalence and severity of hyperpigmentation (Dessen et al. 2018)

References: Mørkøre et al. 2015. Mørke flekker i laksefilet. Kunnskapstatus og tiltak for å begrense omfanget. (ISBN 978-82-8296-322-0) 79 s. Nofima rapportserie(2015). Sissener et al. 2016. Reduced n-3 long-chain fatty acid levels in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) do not reduce growth, robustness or product quality through an entire full scale commercial cycle in seawater. *Aquaculture* 464, 236-245. Koleng, A. 1992. Markedsundersøkelser. Norsk laks. Technical report. Fiskeritryggers Landsforening, Bergen, Norway. Mørkøre, T. et al. 2016. Mørkeflekker i laks infisert med både PVV og SIV. Nofima rapport 31/2016 (FHF-2016-16). Ruyter et al. 2021. Optimizing dietary fatty acids and lipids of Atlantic salmon to secure their health and welfare through varying environmental conditions and life stages. Nofima report 17/2021 (FHF-2021-25). Dessen et al. 2018. Increased dietary protein-to-lipid ratio improves survival during naturally occurring pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. of Fish Diseases* 42, 21-34. Kousoulaki et al. 2020. Microalga *Schizochytrium limacinum* Biomass Improves Growth and Fillet Quality When Used Long-Term as a Replacement for Fish Oil in Modern Salmon Diets. *Mar. Sci.*, 14 February 2020.

- Nutritional components found to decrease dark hyperpigmentation of salmon fillets: Antioxidants, EPA + DHA/marine fish oil
- Ingredients found to decrease dark hyperpigmentation of salmon fillets: marine microalgae, krill
- Higher dietary protein to lipid ratio can decrease dark hyperpigmentation of salmon fillets



VEDLEGG 3

Updated Jan. 2020

Frequently Asked Questions



DARK SPOTS in salmon fillets

The farming industry is paying great attention to and seeking to understand the underlying causes to quality deviation related to dark discoloration of salmon fillets. The discoloration can appear as distinct dark spots or as diffuse grayish discoloration. Occasionally discolored muscle is seen under the skin.

Occurrence of dark spots in salmon fillets

- Most spots are up to 3 cm wide and a few mm thick, located in the front part of the fillet
- Dark discoloration is observed in wild caught salmon

What is melanin?

- Melanin is a group of natural pigments found in most living organisms
- Melanin pigments act as natural antioxidants

Causes of dark spots in salmon fillets

- Melanin is the main pigment causing dark discoloration
- Melanin pigments are deposited as a response to tissue damages or local inflammation that develops over time
- Melanin deposition is a natural part of the fish's immune system
- The causality is complex. According to the state of knowledge, handling during slaughter, genetic background/breed or vaccine adverse reactions are not believed to be major causes to the problem

Is melanized tissue safe to eat

- No harmful compounds are detected in melanized tissues of salmon fillets
- Dark spots are considered a quality deviation and are normally cut out and discarded

Research on dark spots

- The Norwegian Seafood Research Fund (FHF), on behalf of the fish farming industry, is supporting research on dark spots to reveal causes and define measures to mitigate the problem. The research was intensified in 2012, and involves several industrial stakeholders and research communities. Additionally, private companies have their own ongoing research projects
- Research projects initiated by FHF have identified mitigating factors that have been implemented by the industry. In particular, the prevalence of large, problematic spots has decreased.

Project partners:



FAQ described by partners in the FHF project EX-Spot, Dark spots in salmon fillets. Causes and preventive measures
Please contact twrid.morkøre@nofima.no or kristian.pytz@fhf.no for further questions

ANALYTICAL METHODS Organic pollutants & metals: PCB 6 (UB), Diäxin-like PCB (UB), Diäxins (UB), Diäxins, di-PCB (UB), Sum PAH4, As, Cd, Hg, Pb, Fe, Cu (ref: Berntssen MHG, Jubhamn K, Lundebye A-K (2010) Chemosph 78, 637-646).
Pesticides: Organo-nitrogen pesticides (MS1 + MS2), organophosphorylated pesticides, pesticides; none detected (ref: ASU L00.00-34:2010-09 - Eurofins Dr. Specht Laboratorien (Hamburg) DIN EN ISO/IEC 17025:2005 D-PL-14198-01-00).
Minerals: Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Ba (ref: Mørkøre T, Larsson T, Kvellstad AS et al. (2015) FHF 900824 / Nofima report 34/2015)

VEDLEGG 4

XX INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING
TOWARDS PRECISION FISH NUTRITION AND FEEDING (ISFNF2022)
Sorrento (ITALY), 5th - 9th June 2022

Early feeding has long term effects on bone morphology and mechanical strength of Atlantic salmon

Normal skeletal development is important for fish welfare and mechanical stress resistance. The present study explores the effects of two contrasting freshwater diets on morphology and health of vertebrae and rib bones in Atlantic salmon at harvesting.

Jiménez-Guerrero Raúl^a, Baeverfjord Grete^b, Mørkøre Turid^{bc}
^a Department of Animal and Aquacultural Sciences, Norwegian University of Life Sciences, NO-1432 Ås, Norway
^b Nofima, NO-6600 Sunndalsøra, Norway
^c Nofima, NO-1432 Ås, Norway

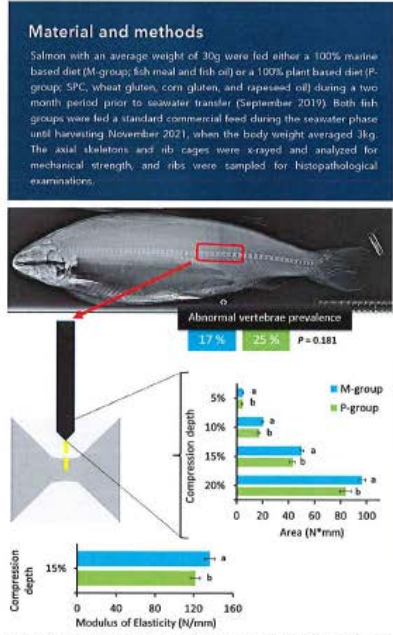


Figure 1. Morphology and mechanical properties of 3kg Atlantic salmon vertebrae fed either a marine diet (M-group) or a plant based diet (P-group) in freshwater. Mechanical analysis of vertebrae as resistance and elasticity were performed on vertebrae corresponding to the Norwegian quality cut (NQC). Vertebrae were compressed by a Warner-Brantler knife in the latero-lateral plane as the tubercular bones. Significant differences between groups are indicated by different letters over the bars ($P < 0.05$). Data are presented as non-transformed mean \pm SEM, $n = 20$ each group.

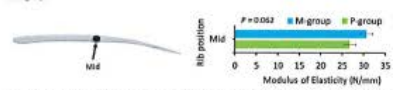


Figure 2. Mechanical properties of rib number 12-14 from 3kg Atlantic salmon fed either a marine diet (M-group) or a plant based diet (P-group) in freshwater. Ribs were tested by a Warner-Brantler knife in the cranio-caudal plane. Significant differences between groups are indicated by different letters over the bars ($P < 0.05$). Data are presented as non-transformed mean \pm SEM, $n = 25$ each group.

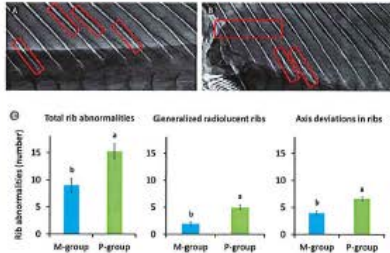


Figure 3. Rib morphology from the abdominal cavity ribs number 1 to 22 of 3kg Atlantic salmon fed either a marine diet (M-group) or a plant based diet (P-group) in freshwater. A) Example of generalized radiolucent ribs. B) Example of axis deviations in ribs. C) Total number of rib abnormalities per rib cage side, and number of generalized radiolucent ribs and axis deviations per rib cage side. Significant differences between groups are indicated by different letters over the bars ($P < 0.05$). Data are presented as non-transformed mean \pm SEM, $n = 12$ each group.

Results and discussion

The prevalence of fish with abnormal vertebrae (mainly fused and compressed) did not differ significantly between the P-group (25%) and M-group (17%), but the trabecular fraction of the P-group vertebrae was softer (lower compression strength, higher elasticity) (Figure 1). Mechanical analysis of ribs revealed a similar but non-significant tendency ($P = 0.062$) (Figure 2). The rib cage of the P-group had 1.7 times more rib morphological abnormalities ($P < 0.0001$), primary ribs with axis deviations, and generalized radiolucency (active remodeling of the compact bone) (Figure 3). Morphometric analysis of histological sections revealed thicker ribs of the M-group.

In conclusion, early feeding has a long-term effect on Atlantic salmon's rib and vertebrae morphology.

Nofima AS, Osloveien 1, 1430 Ås, Norway

Project funded by

Contact: raul.jimenez.guerrero@nmbu.no