

# Miljø og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk i merd

Faglig sluttrapport



Bilde: Ingrid Lein

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 Johnsensgate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger



#### Sundalsøra

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> 3/2022	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-705-1	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 28. februar 2022	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 47	<i>Prosjektnummer:</i> 12767
<i>Tittel:</i> <b>Miljø og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk i merd</b>		
<i>Title:</i> Environment and feeding for optimal health and survival of cleaner fish in sea cages		
<i>Forfatter(e):</i> Ingrid Lein, Johanna Kottmann, Lill-Heidi Johansen, Katerina Kousoulaki, Bjarne Gjerde, Elisabeth Ytteborg, Tone-Kari Østbye og Gerd Marit Berge		
<i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi, Ernæring og fôrteknologi, Fiskehelse, Avl og genetikk		
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> FHF #901563		
<i>Stikkord:</i> Rognkjeks, berggylt, fôr, sykdomsresistens, temperatur, kondisjonsfaktor og skinnhelse		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Se kapittel 1		
<i>English summary/recommendation:</i> Se kapittel 1		

## Forord

Prosjekt #901563 **Miljø og føring for optimal helse og overlevelse av rensefisk i merd** er et resultat av diskusjoner mellom forskere ved Nofima, SalMar AS og HMY i forbindelse med utlysning fra Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF) innen dette området. Prosjektet hadde tre arbeidspakker, men den første arbeidspakken som omfattet storskala forsøk i merd lot seg dessverre ikke fullføre både på grunn av kraftige høst- og vinterstormer, og senere reise- og besøksforbud i forbindelse med covid-19. Resterende midler fra denne arbeidspakken er i samråd med FHF benyttet til utvidede analyser i den siste arbeidspakken.

Prosjektet har hatt et totalbudsjett på 4 980 000 kr, alt finansiert av FHF.

## Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>8</b>
2.1	Faglig bakgrunn	8
2.2	Prosjektets omfang	8
2.3	Prosjektorganisering	8
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b>	<b>10</b>
3.1	Prosjektets effektmål	10
3.2	Prosjektets resultatmål	10
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b>	<b>11</b>
4.1	Kondisjonering av rognkjeks og berggylt før utsett i merd	11
4.1.1	Materiale og metoder	11
4.1.2	Resultat og vurdering	11
4.1.3	Konklusjoner	13
4.2	Effekt av fôrsammensetning på motstandsevne mot sykdom hos rognkjeks	13
4.2.1	Materiale og metoder	13
4.2.2	Resultat og vurdering	16
4.2.3	Konklusjon	17
4.3	Effekt av fôr og kondisjonsfaktor på toleranse for lave sjøtemperaturer hos berggylt	17
4.3.1	Materiale og metoder	18
4.3.2	Resultat og vurdering	24
4.3.3	Konklusjon	42
<b>5</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Hovedfunn</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Referanser</b>	<b>47</b>

## 1 Sammendrag

Prosjektet hadde som mål å komme næringen til nytte ved å bidra til økt overlevelse, helse og velferd hos rensefisk i merd gjennom å øke kunnskapen om betydningen av kondisjonering før utsett, fôr, kondisjonsfaktor og temperatur. Prosjektet er forankret i FHF sine prioriteringer om å avdekke miljømessige og biologiske faktorer som er avgjørende for overlevelse og prestasjon hos rensefisk i sjø.

Storskala forsøk med kondisjonering av berggyllt og rognkjeks til fôr og lys ble startet i juli 2019. Forsøket ble først avbrutt av storm, deretter av covid-19. Berggyllt ble fulgt ut oktober. Overlevelsen var høy (> 95 %) fram til stormen i november. Resultatene tyder på at blokkfôr ga mindre avmagring enn tørrfôr, og at tilvenning før utsett kan være viktig. Fordi vi er usikre på om fangstmetoden ga representative prøvefisk må resultatene brukes med forsiktighet.

Basert på funn i FHF-prosjektet CleanFeed testet vi tre fôr med proteinnivå 55 %, fettinnhold fra 6,7–18 %, og karbohydratnivå fra 8,1–18,5 % til rognkjeks (2–60 g). Etter en vekstperiode på 3 måneder ble fisken transportert fra Nofima Sunndalsøra til Havbruksstasjonen i Tromsø og testet for smitte med atypisk *A. salmonicida*. Vi fant ingen forskjell i vekst og overlevelse i vekstforsøket. Vi antar at fisk som fikk lite fett og mye karbohydrat kompenserte med å spise mer. Hvis målet er å bremse veksten hos rognkjeks bør derfor ulike fôringsstrategier undersøkes. Høyt fett ga høyt innhold av fett i lever og hel kropp. Vi fant ingen sikre forskjeller i overlevelse i smitteforsøket, og konkluderer derfor med at innhold av fett og karbohydrater i fôret har liten betydning for hvor motstandsdyktig rognkjeks er mot sykdom innenfor de områdene vi har testet.

Det siste forsøket med berggyllt besto av to faser. Først et fôringsforsøk hvor vi testet to fôr hvorav ett hadde ekstra tilskudd av omega-3. Ved overgangen til Fase 2 ble all fisk gjennomgått, og det ble tatt prøver for analyser og velferdsskår av fisk med høy eller lav kondisjonsfaktor (over eller under 2,7). I Fase 1 gikk fisken på 15 °C mens den i Fase 2 ble splittet: halvparten fortsatte på 15 °C mens resten fikk gradvis nedgang til 6 °C, og gikk deretter tre måneder på 6 °C. All fisk fikk kommersielt fôr (Otohome S2) i denne fasen. Fisken ble fordelt slik at alle kar hadde likt antall fisk fra begge dietter, og likt antall fisk med høy og lav kondisjonsfaktor. I Fase 1 var det ingen forskjell i vekst og overlevelse mellom fôrgruppene. Fettsyreprofilen i fôret påvirket profilen i fisk både ved slutten av Fase 1 og etter 4 måneder på kommersielt fôr. Overlevelsen var høy for alle grupper i Fase 2, men var påvirket av K-faktor ved slutten av Fase 1. Veksten var mest påvirket av temperatur, og fisk på lav temperatur tapte vekt. Mengde innvolls fett var dobbelt så høyt hos fisk på høy temperatur, og var også påvirket av kondisjonsfaktor.

Fisk med lav K-faktor når Fase 2 startet hadde ved avslutning av forsøket dårligere velferdsskår, spesielt for avmagring og skjelltap. Skjelltapet var tydelig størst hos fisk på 6 °C, og hos fisk med lav K-faktor. Det var stor forskjell i atferd mellom temperaturgruppene. Ved lav temperatur lå fisken i hovedsak på bunnen av karene.

Temperatur, men ikke K-faktor, påvirket skinnhelsen. Fisk på 15 °C hadde generelt best skinnhelse. Det var spesielt antall slimceller i epidermis, andel slimceller i ytre epidermis og tykkelsen på epidermis som ble påvirket.

For genuttrykk fant vi ingen forskjeller knyttet til diett eller kondisjonsfaktor i Fase 1. For Fase 2 var uttrykket av enkelte gener relatert til vekst og fettsyremetabolisme tydelig påvirket av temperatur.

Resultatene viser at K-faktor er viktig når berggyllt skal stå i sjøen ved lave temperaturer, både på grunn av overlevelse, mer innvolls fett (energireserve), og mindre avmagring. Resultatene aktualiserer spørsmålet om utfisking av berggyllt før den kaldeste årstiden.

*English summary:*

The aim of this project was to provide new and relevant knowledge about effects of environmental and nutritional factors that may contribute to increased health and survival of cleaner fish in sea cages. The report describes a field experiment meant to study effects of pre-adaptation of fish to selected factors. However, this study was interrupted due to extreme weather conditions and covid-19 restrictions. Further, the report describes a growth trial studying effects of different feed compositions on performance, welfare and disease resistance in lumpfish. Finally, the report describes a trial studying effect of diet, condition factor and temperature on performance and welfare of ballan wrasse.

## 2 Innledning

### 2.1 Faglig bakgrunn

Rensefisk er viktig som forebyggende tiltak mot lakselus. God overlevelse og velferd er viktig for at rensefisken skal fungere godt som lusespiser. Velferd hos rensefisk vektlegges sterkt både fra næringen og myndighetene. For å oppfylle kravene i regelverket som ble innskjerpet i 2018 må næringen legge ned en betydelig forsknings- og utviklingsinnsats. Bruk av rensefisk i fullskala merder er krevende fordi disse artene stiller andre krav enn laksefisk, og fordi det er utfordrende å ha god nok kontroll med hva som skjer i merdene.

Kunnskap om hvordan miljø og fôring påvirker overlevelse og velferd hos rensefisk er viktig for å kunne øke overlevelsen og bedre velferden hos rensefisken. Dette kan omfatte hvordan rensefisken kan forberedes på merdmiljøet. Det er også behov for å implementere objektive velferdsindikatorer for rensefisk utviklet i prosjektet "Velferd hos rensefisk – operative indikatorer (RENSVEL)" (FHF #901136).

I RENSVEL samarbeidet Nofima med NTNU Ålesund, Nord Universitet og Universitetet i Bergen om utvikling av gode operative velferdsindikatorer for rensefisk, og med optimalisering av miljø for berggyllt og rognkjeks i yngelfasen. I dette prosjektet skulle indikatorene som ble utviklet i Rensvel implementeres og testes i fullskala produksjon.

### 2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet startet i mai 2019 og hadde i utgangspunktet to års varighet. Blant annet på grunn av covid-19 ble deler av prosjektet forsinket, og ny sluttdato er 28. februar 2022.

Prosjektet omfattet tre arbeidspakker:

- AP 1 Kondisjonering av rognkjeks og berggyllt før utsett i sjø.
- AP 2 Fôringsforsøk med rognkjeks, vekst og smittetest.
- AP 3 Fôringsforsøk med berggyllt, kondisjonsfaktor og lav versus høy temperatur.

I AP 1 var det planlagt et feltforsøk for å studere hvordan kondisjonering/tilvenning til ulike faktorer før utsett i merd påvirker velferden hos rensefisk. Forsøket ble startet, og en del data innhentet, men det lot seg dessverre ikke gjøre å fullføre forsøket på grunn av kraftige høst- og vinterstormer, og senere covid-19 med reise- og besøksrestriksjoner. Foreløpige data fra denne arbeidspakken blir likevel presentert i rapporten. Ubrukte midler i denne arbeidspakken ble etter avtale med FHF omdisponert og benyttet til utvidede analyser i fôringsforsøket med berggyllt (AP3).

### 2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet er et resultat av diskusjoner mellom forskere ved Nofima, SalMar AS og Havlandet Marin Yngel (HMY), og bygger på kunnskapsbehov som er definert både av næringsaktørene selv og av forskningsmiljøene.



Prosjektgruppen har bestått av forskere fra Nofima, som har hatt ulike roller og varierende grad av involvering i gjennomføringen av prosjektet:

<b>Prosjektgruppe:</b>	<b>Referansegruppe:</b>	<b>Observatør:</b>
Ingrid Lein (Prosjektleder)	Espen Lie Dahl, SalMar ASA	Susanna Lybæk,
Gerd Marit Berge	Henriette Glosvik, Mowi ASA	Dyrevernalliansen (gikk ut
Lill-Heidi Johansen	Halvard Hovland, Havlandet Marin Yngel	av gruppen høsten 2021
Johanna Kottmann		pga. svangerskaps-
Bjarne Gjerde		permisjon).
Elisabeth Ytteborg		
Tone-Kari Østbye		
Katerina Kousoulaki		

## 3 Problemstilling og formål

### 3.1 Prosjektets effektmål

Prosjektet skal komme næringen til nytte ved å bidra til økt overlevelse, helse og velferd hos rensefisk i merd gjennom økt kunnskap om:

- Betydning av tilvenning til merdmiljø (kondisjonering).
- Betydning av førsammensetning på motstandsevne mot sykdom hos rognkjeks.
- Betydning av omega-3-nivå i fôr for kondisjonsutvikling hos berggylt.
- Betydning av kondisjonsfaktor hos berggylt ved lave sjøtemperaturer.
- Interaksjon mellom laks og rensefisk i merd.
- Hvordan behovet for rensefisk kan reduseres gjennom økt overlevelse i merd.
- Det er i dag stor dødelighet hos rensefisk i merd. Denne dødeligheten er først og fremst et dyrevelferdsmessig problem, men gir også økonomisk tap for næringen. Derfor er kunnskap om faktorer som kan bidra til å øke overlevelsen og bedre velferden hos rensefisk i merd er svært viktig, og at ressursbruken i prosjektet derfor er forsvarlig i forhold til framtidig nytte av resultatene.

### 3.2 Prosjektets resultatmål

#### *Hovedmål*

Hovedmålet er å øke overlevelse og velferd hos rensefisk i laksemerder gjennom å tilvenne (kondisjonere) rensefisken til faktorer som kjennetegner merdmiljøet. Det er også et mål å klarlegge om fôr og temperatur påvirker velferd og robusthet hos rensefisken som skal settes ut i merder.

#### *Delmål*

- Øke overlevelse og velferd hos berggylt og rognkjeks gjennom tilvenning til faktorer som kjennetegner merdmiljø.
- Dokumentere om sammensetning av fôr påvirker motstandsevne mot sykdom hos rognkjeks.
- Dokumentere om nivå av omega-3-fettsyrer i fôr påvirker kondisjon hos berggylt, og om ulik kondisjon påvirker overlevelse, aktivitet og vekst ved lav temperatur.
- Teste og implementere operative velferdsindikatorer (OVI) og helseindikator-verktøykassen fra prosjektet "Program rensefisk: Velferd hos rensefisk – operative indikatorer (RENSVEL,FHF-901136) i merd.

## 4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble som nevnt planlagt med tre arbeidspakker. Første arbeidspakke omfattet et feltforsøk som skulle gjennomføres hos de samarbeidende næringsaktørene, Havlandet Marin Yngel (HMY), SalMar Langstein og SalMar Sjø, mens de to andre arbeidspakkene omfattet fôringsforsøk som ble gjennomført på Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra og ved Havbruksstasjonen i Tromsø.

### 4.1 Kondisjonering av rognkjeks og berggylt før utsett i merd

I feltforsøket var det planlagt å undersøke om kondisjonering (tilvenning) til faktorer som skjul, fôr og fôringsignal påvirker atferd etter utsett, og velferd og overlevelse hos rensefisken. I praksis viste det seg vanskelig å bruke skjul i produksjonskarene fordi disse ikke var tilpasset bruk av skjul med hensyn til vannmiljø. For berggylt ble det derfor valgt å kondisjonere en gruppe til blokk-fôr, og sammenligne dette med direkte overgang fra tørrfôr til blokkfôr i merd eller standard fôring med pellet. Rognkjeks var først planlagt tilvent til lys i merd, men da blått lys i merd var standard, ble planen endret til å akklimatisere fisken til aktuell daglengde og fôringsregime ved utsett.

#### 4.1.1 Materiale og metoder

Kondisjonering av berggylt til fôrblokk ble gjort hos HMY, mens kondisjonering av rognkjeks til aktuell daglengde og fôringsregime ble gjort hos SalMar Langstein. Berggylt ble satt ut i 6 merder hos SalMar Roan; 2 kontrollmerder med standard fôring med pellet, 2 merder med blokkfôr uten tilvenning, og 2 merder med blokkfôr med tilvenning. Laksen ble satt i merd medio juli, berggylt medio august, og rognkjeks var planlagt satt ut i siste halvdel november. Forsøket ble avbrutt før rognkjeks ble satt ut, derfor er det bare enkelte resultater fra berggylt som er rapportert.

I slutten av oktober ble det tatt velferdsskår av totalt 87 berggylt, noe varierende antall fra hver merd avhengig av hvor mange det var mulig å fange inn på prøvetidspunktet. Det ble brukt skåringssystem for velferdsindikatorer utviklet i prosjektet "Velferd hos rensefisk – operative indikatorer (RENSVEL)" (FHF #901136). De ulike parameterne for velferdsskåring ble gradert på en skala fra 0–3. Det ble beregnet en gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle prøvefisk fra hver merd, og deretter bli disse gjennomsnittsverdiene summert til en sumindeks for hver merd.

Dødelighet ble kontinuerlig overvåket fra utsett, og prosent kumulativ dødelighet beregnet.

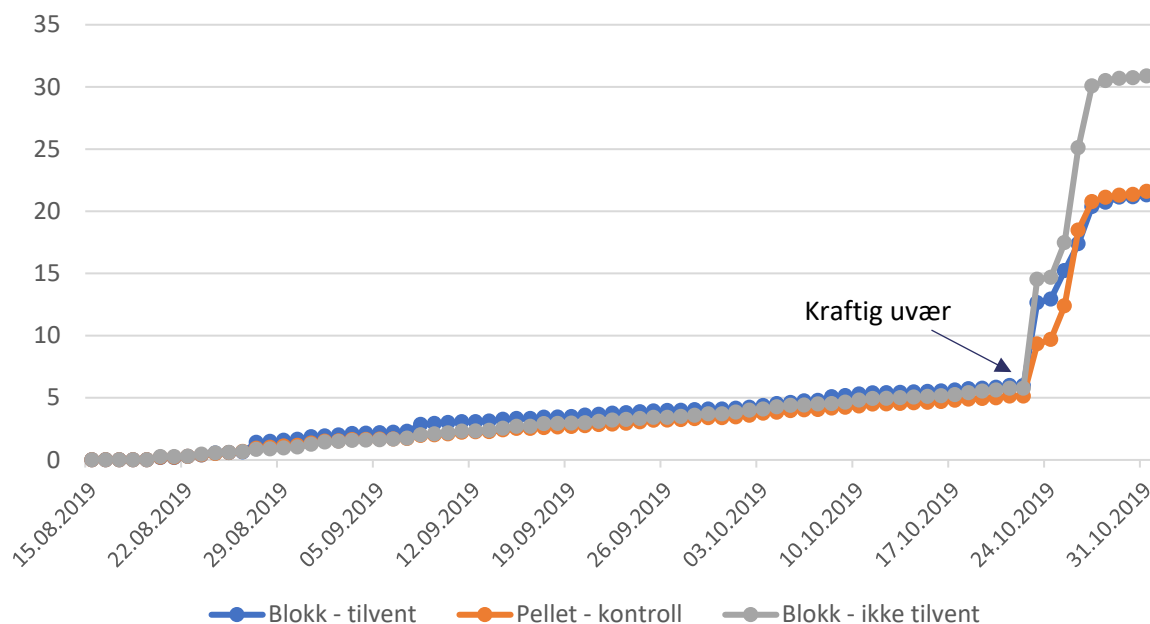
Undervannsdrone var planlagt benyttet til å studere atferd etter utsett i merd. Berggylt oppholdt seg i hovedsak ikke dypere enn kanten på luseskjørtene (6,5 m).

For å se om det var statistisk sikker effekt av behandling ble det gjort en-veis variansanalyse på dataene fra hver behandling, 2 merder per behandling.

Feltforsøket ble avsluttet etter at flere stormer førte til uakseptabelt høy dødelighet. Planen var å starte på nytt våren 2020, men dette lot seg dessverre ikke gjennomføre på grunn av reise- og besøksrestriksjoner i forbindelse med covid-19.

#### 4.1.2 Resultat og vurdering

Den kumulative dødeligheten var lav de første ukene, og begynte først å stige etter 8–9 uker i forbindelse med uvær (Figur 1). Dødelighet (%) ble beregnet ved utgangen av september og utgangen av oktober (Tabell 1), og det var ingen statistisk sikker forskjell i dødelighet mellom behandlingsgruppene. Det var stor variasjon i dødelighet mellom merder innen behandling, og spesielt høy (40,4 %) i en av de to merdene der berggylt ble satt direkte på blokkfôr uten tilvenning.



Figur 1 Kumulativ dødelighet (%) av berggyllt i merd over en periode på 10 uker. Etter cirka 10 uker økte dødeligheten brått som følge av kraftig uvær.

Tabell 1 Dødelighet (%) av berggyllt i merd

	Pellet standard	Blokk med tilvenning	Blokk uten tilvenning	ANOVA
Døde (%) pr 30.09	3,4 ± 0,1	4,1 ± 0,8	3,7 ± 0,5	p = 0,67
Døde (%) pr 31.10	21,6 ± 5,3	21,3 ± 0,7	30,8 ± 9,5	p = 0,54

I slutten av oktober ble det tatt ut en del prøvefisk for beregning av K-faktor og leverindeks (Tabell 2) og evaluering av velferdsskår (Tabell 3). Det var ingen statistisk sikre forskjeller mellom behandlingsgruppene for noen av de undersøkte egenskapene. For velferdsskår viser tallene en tendens til høyere skår for avmagring i gruppen som fikk standard pellet, men variasjonen innen gruppen var høy. Ellers var det i hovedsak sår eller slitasje på finner som ble observert under velferdsskåring. Sumindeks for velferdsskår så ut til å være høyest i gruppen som fikk standard pellet, men det var ingen signifikant forskjell. Det er usikkert om uttak av prøvefisk ga representative prøver, eller om det var svake eller dårlige fisk som var lettest å fange. Dette gjør resultatene totalt sett vanskeligere å tolke. Gode fangstmetoder er viktig for å kunne studere funksjon, helse og velferd hos rensefisk i merd.

Tabell 2 Vekt, kondisjons-faktor og leverindeks i prøvefisk undersøkt 29.10.2019

	Pellet standard	Blokk med tilvenning	Blokk uten tilvenning	ANOVA p-verdi
Vekt	26,9 ± 1,5	27,9 ± 1,1	28,3 ± 1,9	0,27
K-faktor	1,32 ± 0,03	1,32 ± 0,02	1,34 ± 0,04	0,87
Leverindeks	1,06 ± 0,08	1,15 ± 0,09	1,04 ± 0,08	0,40

Tabell 3 Velferdsskår av prøvefisk undersøkt 29.10.2019

	Pellet standard	Blokk med tilvenning	Blokk uten tilvenning	ANOVA p-verdi
Avmagring	0,70 ± 0,14	0,39 ± 0,12	0,37 ± 0,24	0,42
Ryggfinne	1,04 ± 0,21	1,11 ± 0,17	1,20 ± 0,20	0,85
Halefinne	1,74 ± 0,02	1,65 ± 0,09	1,68 ± 0,08	0,66
Brystfinner	1,97 ± 0,03	1,91 ± 0,10	1,89 ± 0,01	0,63
Analfinne	1,30 ± 0,08	1,17 ± 0,11	1,02 ± 0,12	0,28
Bukfinner	1,41 ± 0,16	1,16 ± 0,16	1,40 ± 0,21	0,58
SUM skår	9,52 ± 0,15	9,02 ± 0,04	8,75 ± 0,56	0,37

#### 4.1.3 Konklusjoner

Selv om forsøket ikke ble fullført, er det mulig å dra lærdom fra en del av arbeidet:

- Skåring for avmagring kan peke i retning av at blokkfôr ga bedre ernæringsstatus enn pellet, men variasjonen innen behandling var stor.
- Ikke alle oppdrettslokaliteter er nødvendigvis egnet til å ha berggytt i merder. Hvis lokaliteten er sterkt utsatt for strøm, vind, høye bølger og sjø, kan dette føre til uakseptabelt høy dødelighet.
- Gode vurderinger av tilstand hos rensefisk og innsamling av representative prøver er helt avhengig av et godt system for fangst av prøvefisk.

## 4.2 Effekt av førsammensetning på motstandsevne mot sykdom hos rognkjeks

I denne arbeidspakken var målet å undersøke om ulike førsammensetninger i fôr til rognkjeks kan påvirke motstandsevnen mot sykdom. Rognkjeks ble gitt tre ulike fôr basert på resultater fra prosjektet CleanFeed (FHF #901331). Der fant vi at et middels proteinnivå på ca. 55 % av fôret var best fordi både høye og lave proteinnivå ga suboptimal immunrespons. I forsøket som beskrives her brukte vi et middels proteinnivå (55 %), og byttet fett mot karbohydrater for å få en gradering av energitetthet i de tre forsøksfôrene. For å undersøke om førsammensetningen påvirket motstandsevnen mot sykdom ble fisken etter en tre måneders periode på vekstfôr satt inn i en smittetest med atypisk *A. salmonicida*.

### 4.2.1 Materiale og metoder

#### Forsøksfôr

Tre forsøksfôr ble produsert ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Fôrene var planlagt med likt proteinnivå og ulike nivå av fett og karbohydrat. Det ble produsert flere pelletstørrelser tilpasset økende fiskestørrelse. Sammensetningen av forsøksfôrene er vist i Tabell 4. Under smittetesten fikk fisken et kommersielt fôr fra Biomar.

#### Fisk og fasiliteter

Rognkjeks med gjennomsnittlig startvekt på 1,72 g ble fordelt med 110 fisk i hvert av 9 kar. Hvert av de tre forsøksfôrene ble gitt til fisk i 3 kar. Forsøkskarene var sirkulære med konisk bunn, grå vegger, og volum 150 liter. Karene var dekket med transparent lokk med åpning for fôring. Hvert kar var utstyrt med fôringsautomat, og et eget lyspunkt plassert på lokket (konstant lys 24 t). Forsøkskarene ble tilført sjøvann med gjennomsnittstemperatur  $10,4 \pm 0,4$  °C, og salinitet 35 ppt. Vanngjennomstrømmingen var 4 liter/minutt ved start, og oksygenmetning ble holdt mellom 85 og 100 %. Vekstforsøket varte i 90 dager. Oksygenmetning ble målt 2–3 ganger per uke, temperatur daglig, og antall døde ble registrert daglig.

Tabell 4 Fôrsammensetning

	Høyt lipid HF-LC	Medium lipid M	Lavt lipid LF-HC
<i>Ingredienser (g per kg):</i>			
Fiskemel	387,6	362,9	366,2
Hvetegluten	193,8	181,5	183,1
Hvetemel	40,0	125,0	188,0
Fiskeolje	120,9	73,0	5,0
Torskemuskel-mel	100,0	100,0	100,0
Krillhydrolysat	20,0	20,0	20,0
Krillmel	40,0	40,0	40,0
Biomos	4,0	4,0	4,0
Stay-C	2,2	2,2	2,2
Kolesterol	5,0	5,0	5,0
Kolin klorid	5,0	5,0	5,0
Krillolje	10,0	10,0	10,0
Vitamin-mix	30,0	30,0	30,0
Yttrium oksid	0,1	0,1	0,1
Mineral-mix, organisk	8,4	8,4	8,4
Lysin	6,0	6,0	6,0
Carphyll pink (10% AX)	1,0	1,0	1,0
Taurin	2,0	2,0	2,0
Mono natrium fosfat	24,0	24,0	24,0
<i>Kjemisk sammensetning (%):</i>			
Tørrstoff	91,4	92,0	90,5
Protein	53,3	52,7	54,1
Lipid	18,0	13,7	6,7
Karbohydrat	8,1	14,2	18,5
Aske	11,8	11,4	11,2

#### *Dataregistrering og prøvetaking*

Ved oppstart av forsøket ble alle fisk individveid. I tillegg ble 30 fisk fra samme populasjon veid, og velferdsskår ble registrert før fisken ble frosset for å brukes til analyser av helkropp. Fisk i alle kar ble bulkveid etter 4 og 8 uker, og ved avslutning av forsøket.

Ved avslutning av forsøket ble vekt og lengde registrert for all fisk. Seks tilfeldige fisk fra hvert kar ble benyttet som prøvefisk. Vekt og lengde ble målt, og blodprøve ble tatt av prøvefiskene før velferdsskår ble vurdert. Deretter ble fiskene åpnet for å registrere vekt av lever og eventuell gonade. Mage og tarm ble dissekert ut før det ble tatt vevsprøver fra ulike deler av tarmen. Resterende tarmvev ble lagt tilbake sammen med fisken. Samleprøver av lever og restfisk fra hvert kar ble frosset ned for senere analyser. Prøver fra de samme fiskene blir også brukt av en PhD-student tilknyttet NMBU.

#### *Analyser*

Fôrrprøver ble analysert for tørrstoff (105 °C, til konstant vekt), aske (550 °C til konstant vekt), lipid (Soxhlet) og nitrogen (AOAC 2001.11; Kjeltec 8400 Analyser Unit, Tecator, Höganäs, Sweden), innhold av karbohydrater ble beregnet som differanse. Prøver av sløyd fisk og lever ble analysert for tørrstoff,

aske, lipid, og nitrogen etter samme metoder som fôr, og i tillegg analysert for energi (Parr 63000 Bomb calorimeter).

#### *Beregninger og statistiske metoder*

Spesifikk vekstrate (% BW d<sup>-1</sup>);  $SGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1) \cdot 100$

Temperaturavhengig vekstfaktor;  $TGC = (W_2^{1/3} - W_1^{1/3}) / ((t_2 - t_1) \times T)^{-1} \cdot 1000$

$W_1$  og  $W_2$  er kroppsvekt (g) ved start  $t_1$  og slutt  $t_2$ , og  $T$  er gjennomsnittlig vanntemperatur gjennom forsøksperioden.

Dødelighet per kar (%): (totalt antall døde fisk/antall fisk ved start) \* 100;

Hepatosomatisk indeks eller leverindeks (HSI): (levervekt/kroppsvekt) \* 100

For å bestemme effekt av fôrtype ble parametere som var registrert på karnivå (gjennomsnitt per kar) analysert statistisk med en enveis variansanalyse. Duncan's multiple range test ble brukt for å rangere behandlingene. For parametere der vi hadde individdata (vekt og lengde) fra sluttuttaket, ble det brukt en «Mixed model»-analyse, med fôr som fast, og kar som tilfeldig effekt.

#### *Smitteforsøk med atypisk *Aeromonas salmonicida**

Rognkjeks fôret med 3 ulike dietter på Sunndalsøra ble transportert med tankbil til Havbrukstasjonen i Tromsø for smitte med atypisk *A. salmonicida*. Forsøket var godkjent av Mattilsynet (FOTS ID 22076).

Før transport ble fiskene individmerket med PIT-tags, Unique 125 kHz (Sokymat merker, RFID solution), og ble sortert og delt i to identiske grupper. Antallet per gruppe var 340, og snittvekten 57 gram. Hver gruppe besto av like mange fisk fra alle tre diettgrupper, det vil si 113–114 fisk per diett hentet fra hvert av 3 parallelle kar. Ved ankomst Tromsø ble de to gruppene plassert i hvert sitt 1800 l kar ved cirka 8 °C (likt temperaturen i transportbilen ved ankomst) og 24 timer lys. Akklimatisering til 14 °C ble så gjennomført over en periode på 7 dager. Fisken startet raskt å ta fôr. Kun én fisk døde i dagene etter ankomst. Fisken ble fôret med samme fôrtype gjennom forsøket på vedlikeholdsnivå (BioMar, Lumpfish grower 2 mm). Fôringen ble stoppet i 24 timer før smitteforsøket startet.

Smittemateriale: Atypisk *A. salmonicida*, nylig passert og re-isolert fra rognkjeks, ble dyrket opp til bruk i badsmitte. Isolatet stammer fra et diagnostisert sykdomsutbrudd hos rognkjeks i felt, og ble opprinnelig mottatt fra Veterinærinstituttet i Harstad (2013-70-F-524.2/A-lagstype VI). Nedfrosset bakteriekultur i glycerol ble tint og overført til blodagar (Blood agar base, Oxoid, tilsatt 5 % humant blodkonsentrat og 2 % NaCl). Platene ble inkubert ved 18 °C i 4 dager til tydelig oppvekst. Enkeltkolonier ble inokulert i 20 ml flytende medium Brain Heart Infusion (BHI) medium (Oxoid) som forkultur og dyrket ved risting i 24 timer (t) ved 18 °C. OD<sub>520nm</sub> ble målt og 10 ml fra forkultur per kolbe ble brukt til inokulering av hovedkulturer. Etter 24 t dyrking ble OD<sub>520 nm</sub> målt og bakteriekulturene høstet. Titer (cfu/ml) ble bestemt ved ti-folds utplating på blodagar. Agarplatene ble inkubert ved 18 °C før kolonitelling.

Smitteprosedyre: Smitteforsøket ble gjennomført ved 14 °C, og fisken ble smittet ved badesmitte. Vannstanden i karene ble senket til volumet var cirka 300 liter, og vanngjennomstrømningen ble stoppet. Tettheten i karene under smitten var cirka 57 kg/m<sup>3</sup>. Smittedosen var 10<sup>7</sup> cfu/ml. Under smitten som varte 2 timer ble vannet oksygenert og overvåket med hensyn til temperatur og oksygen. Etter smitte ble vanngjennomstrømningen startet igjen. Dødelighet ble registrert daglig over en periode på 49 dager. Ved avslutning ble all gjenværende fisk avlivet med en overdose metacain (0,6 ml/l). Forsøket ble avsluttet når ingen svimere eller døde hadde vært registrert på tre dager. Det ble tatt utstryk på blodagar fra hodenyren til de første svimerne i hvert kar for verifisering av atypisk *A. salmonicida* som dødsårsak. Dette ble utført på totalt 24 fisk fra begge kar. Platene ble inkubert ved 18 °C til kolonier hadde vokst frem. Blodprøver ble tatt fra totalt 24 svimere underveis i forsøket, og fra 9 overleverer per diettgruppe ved avslutning av forsøket. Prøvene ble sentrifugert før plasma ble høstet og frosset ned på -80 °C før videre analyser.

#### 4.2.2 Resultat og vurdering

##### Vekstforsøk

Vekter, tilvekst og dødelighet i vekstforsøket er vist i Tabell 5. Fisken vokste fra et gjennomsnitt på 1,72 gram ved oppstart til cirka 60 gram ved avslutning av vekstperioden etter 90 dager. Det var ingen signifikante forskjeller i vekt eller lengde ved slutten av perioden. Totallengden, det vil si inkludert halefinne, viste en tendens til å være redusert ( $p = 0,10$ ) hos fisk som hadde fått fôr med lavt fett- og høyt karbohydratinnhold, noe som kanskje indikerer mer halebiting i denne gruppen. Spesifikk vekstrate (SGR) lå i området 3,91–3,94, og TGC i området 2,80–2,85. Det ble ikke funnet statistisk sikre forskjeller i tilvekst. Det var stor variasjon i dødelighet innen hver fôrgruppe, og derfor ingen statistisk sikre forskjeller.

Det ble funnet signifikante forskjeller i kjemisk sammensetning av både lever (Tabell 6) og restkropp (Tabell 7). Analysen av restkropp viste en statistisk sikker økning i innhold av tørrstoff, lipid, råprotein og energi med økende innhold av lipid i fôr. Analyser av lever viste at tørrstoff, lipid og energi økte med økende innhold av lipid i fôr mens innhold av råprotein i lever avtok med økende lipidinnhold i fôret.

Tabell 5 Gjennomsnittlig vekt og lengde ved oppstart av vekstforsøket, og ved avslutning etter 90 dager. Tabellen viser også vekst i SGR og TGC samt dødelighet i forsøksperioden på 90 dager.

	Høyt lipid	Medium lipid	Lavt lipid	p-verdi
Vekt dag 0	1,71 ± 0,01	1,73 ± 0,02	1,73 ± 0,01	0,57
Vekt dag 90	58,8 ± 2,6	61,8 ± 0,9	61,1 ± 4,2	0,76
Lengde1 dag 90	90,3 ± 1,5	91,8 ± 0,4	89,6 ± 1,3	0,45
Lengde2 dag 90	101,3 ± 2,2	103,9 ± 0,9	98,2 ± 1,3	0,10
SGR	3,91 ± 0,07	3,94 ± 0,01	3,93 ± 0,09	0,94
TGC	2,80 ± 0,07	2,85 ± 0,02	2,84 ± 0,10	0,87
Dødelighet	26,1 ± 2,0	22,4 ± 4,5	19,7 ± 2,2	0,4

Lengde1= kroppslengde uten halefinne

Lengde2=kroppslengde med halefinne inkludert

Tabell 6 Kjemisk innhold i lever (% av tørrstoff)

	Høyt lipid 1	Medium lipid	Lavt lipid	p-verdi
Tørrstoff, %	49,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	46,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	44,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	<,0001
Aske, %	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,03	2,2 ± 0,2	0,85
Lipid, %	36,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	32,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	29,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	<,0001
Råprotein, %	9,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	9,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,01
Energi, MJ kg <sup>-1</sup>	17,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	15,7 ± 0,04 <sup>b</sup>	14,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	<,0001

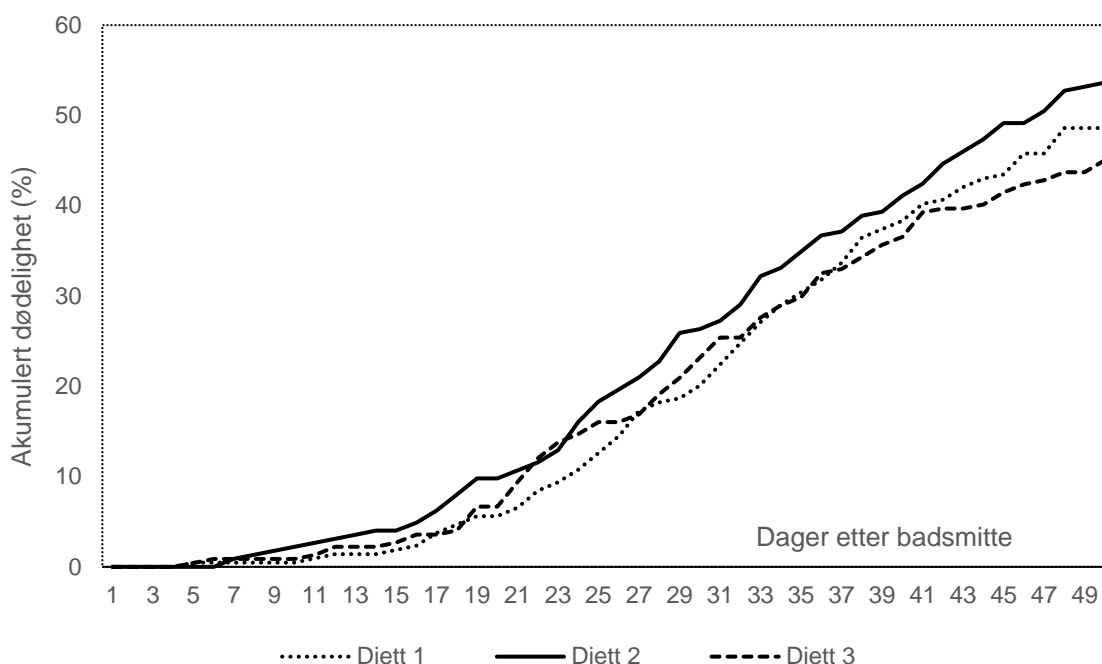
Tabell 7 Kjemisk innhold i helkropp uten lever (% av tørrstoff)

	Høyt lipid	Medium lipid	Lavt lipid	p-verdi
Tørrstoff, %	12,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	11,3 ± 0,03 <sup>c</sup>	<,0001
Aske, %	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,03	0,42
Lipid, %	3,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,0 <sup>c</sup>	<,0001
Råprotein, %	8,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	7,8 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,04
Energi, MJ kg <sup>-1</sup>	3,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,006



### Smitteforsøk

Ved avslutning 49 dager etter badesmitte ble det registrert få ytre lyter på overlevende fisk, men det ble observert sår og erosjon rundt piggene langs siden på enkelte fisk. Det var ingen synlige patologiske forandringer på indre organer. Total dødelighet ved avslutning var ikke signifikant forskjellig for de tre diettgruppene (Chi<sup>2</sup>-test,  $p > 0,05$ ) og dataene ble slått sammen. Det var likevel en tendens til at den magreste dietten gav lavest dødelighet. Den totale dødeligheten var 48,6 % med høyt lipidinnhold i fôr, 53,6 % med medium lipidinnhold, og 45 % med lavt lipidinnhold (Figur 2).



Figur 2 Akumulert dødelighet (%) etter badesmitte med atypisk *A. salmonicida*. Dataene er gjennomsnitt fra to parallelle smittekar.

#### 4.2.3 Konklusjon

- Forskjellig nivå av fett versus karbohydrat i fôr ga ingen forskjell i tilvekst.
- Redusert nivå av fett, og økt nivå av karbohydrat ga mindre fett i lever og kropp.
- De ulike fôrene ga ingen sikker forskjell i dødelighet i smittetest.
- Hvis det er ønskelig å bremse veksthastigheten bør man undersøke effekten av ulike fôringsstrategier.

### 4.3 Effekt av fôr og kondisjonsfaktor på toleranse for lave sjøtemperaturer hos berggyllt

I den siste arbeidspakken undersøkte vi først (Fase 1) om økt innhold av fettsyrene omega-3 i fôret påvirker fisken med hensyn til vekst, kondisjonsfaktor, kjemisk sammensetning og genuttrykk. I Fase 2 undersøkte vi om forskjeller i pre-diettene som fisken fikk i Fase 1 og kondisjonsfaktor påvirker overlevelse, kroppssammensetning, skinnkvalitet, genuttrykk og velferd hos berggyllt ved to ulike temperaturer, det vil si ved tilnærmet optimal temperatur (15 °C), eller en gradvis overgang til vinter-temperatur (6 °C).

### 4.3.1 Materiale og metoder

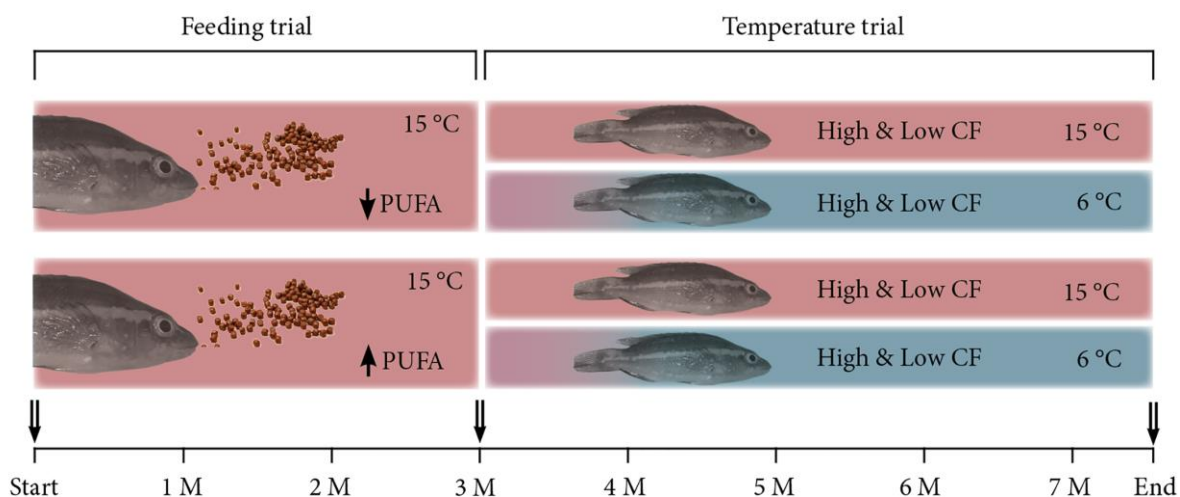
#### Forsøksoppsett

##### Forsøket besto av to faser:

Fase 1: Fôringsforsøk med to fôr med ulikt nivå av omega-3-fettsyrer, 3 kar per fôr, totalt 6 kar.

Fase 2: Temperaturforsøk hvor fisk med ulik kondisjonsfaktor fra begge fôringsregimene i Fase 1 ble individmerket og satt på to ulike temperaturregimer (15 °C og 6 °C). 3 kar per temperaturregime, totalt 6 kar. Forsøksoppsettet er illustrert i Figur 3.

Fisken ble individuelt merket med PIT-tags ved oppstart av Fase 2. Forsøkene var på forhånd godkjent av Mattilsynet (FOTS ID 25965).



Figur 3 Forsøksoppsett for fôringsforsøket og temperaturforsøket. Tidslinjen viser varighet av forsøket i måneder (M). Pilene viser tidspunktene for prøvetaking.

#### Fiskemateriale og forsøksbetingelser

Forsøksfisken var produsert hos Havlandet Marin Yngel, og ble i desember 2020 transportert med bil fra SalMar sitt påvekstanlegg på Tjeldbergodden til Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra. Ved ankomst ble fisken fordelt i seks kar, og deretter akklimatisert til det nye miljøet i seks uker før forsøket startet. I denne perioden fikk fisken en kommersiell diett (OTOHIME S2). Ved oppstart av fôringsforsøket var gjennomsnittlig vekt og lengde henholdsvis  $28,4 \pm 11,5$  g og  $12,1 \pm 1,6$  cm. Ved forsøksstart ble fisken tilfeldig fordelt i 6 x 400 L kar med flat bunn og sorte vegger. Karene var utstyrt med skjul for å gi fisken mulighet til hvile. Vannet var filtrert til 10 µm og UV-behandlet. Temperaturen gjennom Fase 1 var på 15 °C. Hvert kar var utstyrt med et led-lys som var dimmet til 9 %, og fisken fikk lys hele døgnet. Fôret ble tildelt med belteautomater.

#### Fôr og fôrformulering

Forsøksfôrene som ble benyttet i fôringsforsøket (Fase 1) var produsert ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Sammensetning av forsøksfôrene er vist i Tabell 8. Nivåene av omega-3-fettsyrer i Fôr 1 tilsvarer nivåene i tilgjengelige kommersielle dietter. I Fôr 2 ble nivået økt ved å erstatte fiskeolje med et omega-3-konsentrat (EPAX 6015 TG/N). Fettsyreprofilene i fôrene er vist i Tabell 9.

#### Fôringsforsøk (Fase 1)

280 fisk ble satt ut i hvert kar, og karene var randomiserte med hensyn til behandling. Temperaturen under foringsforsøket var 15 °C. Temperatur (snitt  $15,1 \pm 0,2$  °C) og salinitet ( $32,5 \pm 0,3$  ppt) ble målt daglig, mens oksygen ( $91,0 \pm 3,3$  %) ble målt to ganger per uke. På grunn av god tilvekst måtte

biomassen reduseres kort tid før avslutning av fôringsforsøket for å sikre stabilt god vannkvalitet. Antall fisk ble redusert fra 280 til 200 fisk per kar. Fôringsforsøket (Fase 1) ble avsluttet etter tre måneder (Figur 1). Fisk som ikke ble benyttet til analyser ble merket individuelt (PIT-tag) samtidig som vekt og lengde ble registrert. Kondisjonsfaktor ble beregnet for hver fisk. Kondisjonsfaktor  $\leq 2,69$  ble vurdert som lav mens kondisjonsfaktor  $\geq 2,70$  ble vurdert som høy. Denne grensen var basert på registreringer som ble tatt på 90 tilfeldige fisk like før oppstart av temperaturforsøket, og disse registreringene ble benyttet til å beregne gjennomsnittlig kondisjonsfaktor for hele fiskegruppen. Prøver av fisk som ble tatt ut ved avslutning av fôringsforsøket var sortert etter størrelsen på kondisjonsfaktor slik at vi fikk et prøvemateriale med likt antall fisk med høy og lav kondisjonsfaktor fra hvert forsøkskar.

#### *Temperaturforsøk (Fase 2)*

Ved avslutning av Fase 1 ble fisk fra begge fôrgruppene i fôringsforsøket fordelt i seks nye kar. Fordelingen ble gjort slik at hvert nytt kar fikk like mange fisk med høy og lav kondisjonsfaktor fra hvert av karene fra Fase 1. Det ble brukt samme kartype og vannsystem som beskrevet for Fase 1. Antall fisk per kar ved oppstart av temperaturforsøket var 140, det vil si 70 fisk med lav, og 70 fisk med høy kondisjonsfaktor. Snittvekten var høyere for fisk med høy K-faktor ( $69,1 \pm 2,8$  g) enn for fisk med lav K-faktor ( $51,4 \pm 3,1$  g), uavhengig av diett i Fase 1. Tre kar fortsatte på  $15$  °C mens de tre øvrige karene fikk en gradvis reduksjon til  $6$  °C i løpet av 5 uker med en ukentlig reduksjon på  $2$  °C. Etter at temperaturen var redusert til  $6$  °C i 3 kar var gjennomsnittstemperaturen for de to behandlingene  $15,1 \pm 0,3$  °C og  $5,8 \pm 0,3$  °C. Gjennomsnittlig salinitet i forsøksperioden var  $32,6 \pm 0,5$  og oksygenmetningen  $95,7 \pm 4,5$  %. I temperaturforsøket fikk all fisk samme kommersielle fôr (OTOHIME S2).

Tabell 8 Sammensetning av forsøksfôr

	Fase 1		Fase 2
	Normal Omega-3 Diett 1	Høy Omega-3 Diett 2	Otohime S2
<i>Ingredienser (%)</i>			
Torskemuskel	32,0	32,0	
Krill hydrolysat	7,6	7,6	
Reke-pulver	28,0	28,0	
Hvetegluten	11,4	11,4	
Tapioka	5,0	5,0	
Fiskeolje	5,0	-	
Krillolje	2,0	2,0	
EPAX, konsentrat	-	5,0	
Lecithin	2,0	2,0	
Bimos	0,5	0,5	
Stay-C	0,2	0,2	
Kolesterol	0,2	0,2	
Koline klorid	1,0	1,0	
Vitamin mix	0,5	0,5	
Agrotin	2,0	2,0	
Mineral mix	0,7	0,7	
Lysin	0,5	0,5	
Carophyll Pink	0,05	0,05	
Taurine	0,02	0,02	
MSP	1,3	1,3	
Yttrium oksid	0,01	0,01	
<i>Kjemisk innhold, analysert (% i ferdig fôr)</i>			
Tørrstoff	92,3	87,9	94
Protein	58,9	56,1	56,9
Lipid	16,7	16,6	17,7
Aske	9,9	9,4	12,7
Karbohydrater	6,8	5,9	6,8
Energi (MJ/kg)	21,0	20,1	20,8

Tabell 9 Fettsyrer i fôr, oppgitt som % av alle fettsyrer

	Fase 1		Fase 2
	Normal Omega-3 Diett 1	Høy Omega-3 Diett 2	Otohime S2
C 14:0	5,3	2,3	6,7
C 16:0	15,1	10,5	18,7
C 18:0	1,8	1,5	3,9
SFA <sup>1</sup>	22,4	14,3	29,5
C 16:1 n-7	5,2	3,6	5,7
C 18:1	18,5	16,3	19,4
C 20:1	7,3	2,2	4,0
C 22:1	9,7	1,2	3,1
C 24:1 n-9	0,6	0,3	0,3
MUFA	41,1	23,6	32,5
C 18:2 n-6	5,9	5,8	4,3
C 20:2 n-6	0,3	0,3	0,1
C 20:3 n-6	0,1	0,3	0,1
C 20:4 n-6	0,7	2,3	0,5
n-6 PUFA <sup>2</sup>	7,1	9,0	5,3
C 18:3 n-3	1,1	1,2	0,9
C 18:4 n-3	1,8	1,6	1,8
C 20:4 n-3	0,4	1,2	0,5
C 20:5 n-3	9,4	30,5	11,7
C 21:5 n-3	0,3	0,7	0,4
C 22:5 n-3	0,7	1,2	1,5
C 22:6 n-3	10,1	12,0	9,4
EPA + DHA	19,4	42,4	21,2
n-3 PUFA <sup>3</sup>	23,8	48,4	26,3
n6/n3-ratio	0,3	0,2	0,2
PUFA <sup>4</sup>	31,3	57,7	32,6

<sup>1</sup> SFA omfatter også C20:0 og C22:0, <sup>2</sup> n-6 PUFA omfatter også C18:3n-6 og C22:4n-4,

<sup>3</sup> n-3 PUFA omfatter også C20:3n-3, <sup>4</sup> Totale PUFA omfatter også C16:2n-4 og C16:3n-4

### Analyser og beregninger

Fôrprøver ble analysert for tørrstoff (105 °C, til konstant vekt), aske (550 °C til konstant vekt), lipid (Bligh & Dyer, 1959), fettsyrer (AOCS Ce 1b-89 FA) og nitrogen (AOAC 2001.11; Kjeltec 8400 Analyser Unit, Tecator, Höganäs, Sweden) og råprotein beregnet som N \* 6,25. Innhold av karbohydrater ble beregnet som differanse. Samleprøver av hel fisk ble analysert for tørrstoff, aske, lipid, og nitrogen etter samme metoder som fôr, og i tillegg analysert for energi (Parr 63000 Bomb calorimeter).

### Beregninger:

K-faktor = vekt (lengde<sup>3</sup>) \* 100

Slakteutbytte (DP) = sløyd fisk/rundvekt \* 100

Leverindeks (HSI) = levervekt/rundevekt \* 100

Tarmindeks (ISI) = mage- og tarmvekt/rundevekt \* 100

Andel innvolls fett (IFI) = vekt innvolls fett/rundevekt \* 100

Spesifikk vekstrate (%BW d<sup>-1</sup>); SGR = (lnW<sub>2</sub>-lnW<sub>1</sub>)(t<sub>2</sub>-t<sub>1</sub>)<sup>-1</sup>\*100

Temperaturavhengig vekstfaktor; TGC = (W<sub>2</sub><sup>1/3</sup> - W<sub>1</sub><sup>1/3</sup>)/((t<sub>2</sub>-t<sub>1</sub>) x T)<sup>-1</sup> \* 1000

W<sub>1</sub> og W<sub>2</sub> er kroppsvekt (g) ved start t<sub>1</sub> og slutt t<sub>2</sub>, og T er gjennomsnittlig vanntemperatur gjennom forsøksperioden.

### *Velferdsskåring*

Ved start og ved avslutning av Fase 1 og Fase 2 ble det gjort velferdsskåring. Totalt 90 fisk ved oppstart, 30 fra hvert kar etter Fase 1, og 10 fra hver gruppe (pre-diett og kondisjonsfaktor) fra hvert kar etter Fase 2. Skåring ble gjort etter metoden utviklet i RENSVEL. Ved avslutning av Fase 1 ble fisken sortert i høy og lav kondisjonsfaktor, og velferdsskår ble vurdert innen gruppe for hvert kar.

### *Genuttrykk og kvantitativ PCR*

Totalt RNA ble isolert i henhold til produsentens protokoll (Invitrogen). Genomisk DNA ble eliminert ved behandling av RNA med PureLink DNase1 (ThermoFisher, MA, USA). RNA-konsentrasjonen ble målt med et NanoDrop® ND-1000 spektrofotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Integriteten av RNA ble evaluert ved hjelp av Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### *Kvantitativ PCR*

cDNA ble syntetisert fra RNA ved bruk av et TaqMan® Reverse Transcription Reagents kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i henhold til produsentens protokoll. Kvantitativ PCR ble utført i et QuantStudio5-instrument (ThermoFisher, MA, USA). Undersøkte gener var: *hsp70* (stressrespons), *il-6* (immunrespons), *igf1*, *igf2*, *mstn* og *ghra* (vekst), *fasn*, *cpt1*, *acox1* og *elovl5* (fettmetabolisme).

### *Statistisk analyse*

Data fra forsøket ble analyser statistisk i SAS [SAS/STAT, 2002-2012].

Fase 1 – fôringsforsøk: For individdata ble følgende modell brukt:

$$y_{ijk} = M + D_i + t_{ij} + e_{ijk}$$

der  $y_{ijk}$  egenskapen; M er totalt gjennomsnitt,  $D_i$  er fast effekt av diett,  $t_{ij}$  er tilfeldig effekt av kar og  $e_{ijk}$  er tilfeldig feil. Der data var gjennomsnittsverdier per kar ble det brukt en modell uten kareffekt.

Fase 2 – temperaturforsøk: For individdata ble følgende modell brukt:

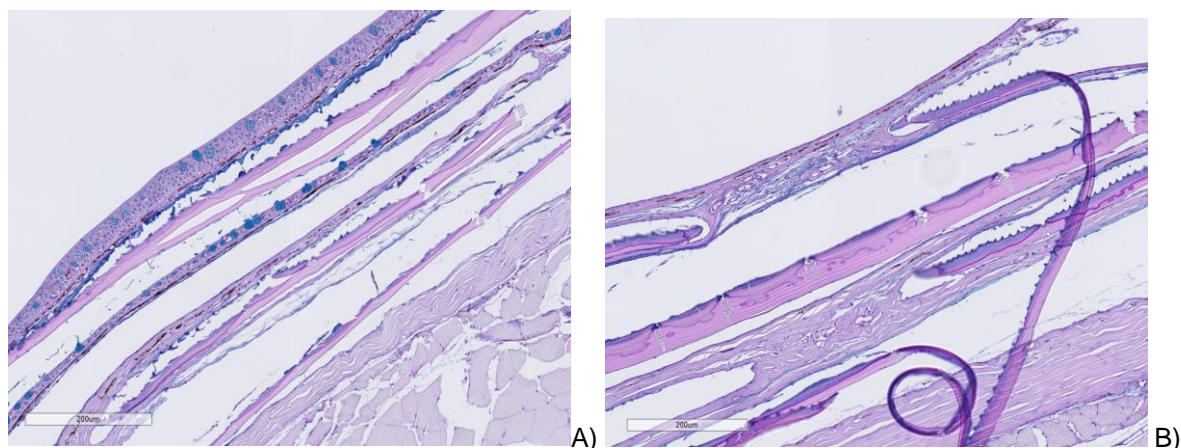
$$y_{ijklm} = M + T_i + D_j + C_k + TD_{ij} + TC_{ik} + DC_{jk} + t_{il} + e_{ijklm}$$

der  $y_{ijkl}$  er egenskapen,  $T_i$  er fast effekt av temperatur;  $D_j$  er fast effekt av diett i Fase 1;  $C_k$  er fast effekt av kondisjonsfaktor ved avslutning av Fase 1;  $TD_{ij}$ ,  $TC_{ik}$  og  $DC_{jk}$  er samspill mellom faste effekter;  $t_{il}$  er tilfeldig effekt av kar; og  $e_{ijklm}$  er tilfeldig feil. Der data var gjennomsnittsverdier per kar ble det brukt en modell uten kareffekt.

Relativ betydning av de ulike faktorene ble gitt som prosent av total variasjon forklart av hver enkelt faktor.

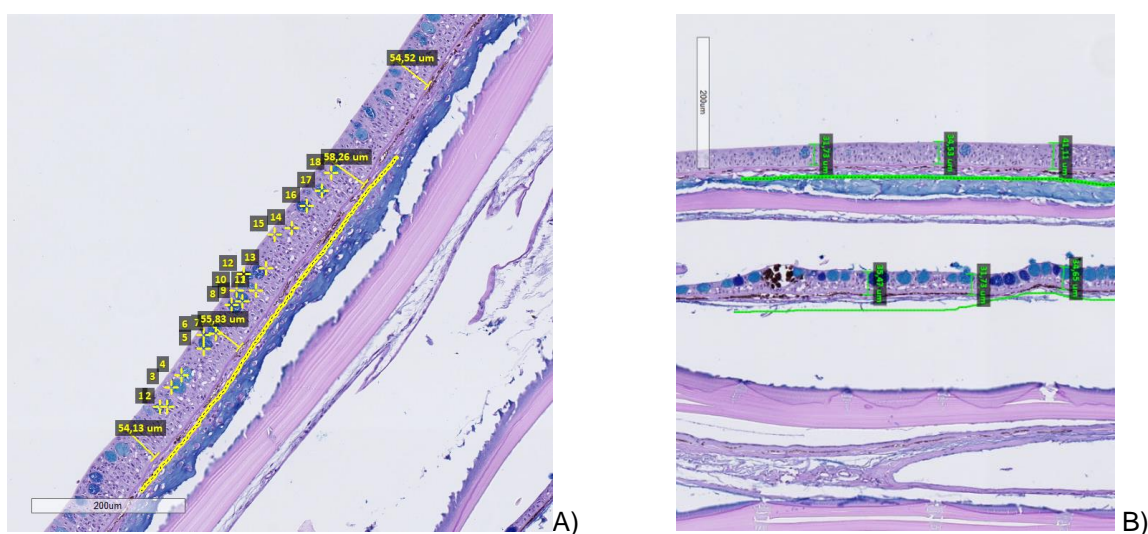
### Histologisk undersøkelse av skinn

Prøver av skinn ble fiksert i formalin, støpt inn i parafin, snittet og farget med AB/PAS, og scannet før histologisk evaluering ved hjelp av Aperio ImageScope (Leica). Noen prøver hadde dårlig kvalitet, ytre epidermis manglet slik at de ikke var egnet for histologisk evaluering. Disse ble tatt ut av materialet, og resultatene er basert på resterende prøver (n=27 fra høy temperatur og n=14 fra lav temperatur). Det er en interessant observasjon at så mange prøver fra lav temperatur (6 °C) var skadet, sammenlignet med høy temperatur (15°C). Skadene så ut til å være relatert til artefakter fra selve prøvetakingen, men siden gruppen fra lav temperatur hadde flest prøver med skade, kan dette tyde på svakere skinn i denne gruppen. Figur 4 viser eksempel på prøve som har intakt både ytre og indre epidermis (4A), og prøve som mangler epidermis (4B) og dermed ble tatt ut av materialet.



Figur 4 Eksempel på prøve med intakt ytre og indre epidermis (A), og prøve som mangler epidermis B), og som ble ekskludert fra videre analyser.

Skinn fra berggyllt har i hovedsak de samme karakteristika som skinn fra andre fisk. Dette inkluderer epidermis med slimceller og dermis med skjell. I denne analysen har vi målt tykkelse av epidermis og antall slimceller, og antall slimceller med ulike farger (rosa, mørkeblå og lyseblå) ble registrert både i ytre og indre skjell. Plassering av slimceller ytterst i epidermis eller inni epidermis ble også registrert. Figur 5 Tabell 5 viser eksempel på disse målingene.



Figur 5 Eksempel på måling av A) epidermis og registrering av slimceller, B) ytre og indre epidermis.

### 4.3.2 Resultat og vurdering

#### Vekst og slakteparametere

I løpet av Fase 1 i forsøket vokste fisken like godt med begge fôrtypene (Tabell 10). Dette var som forventet, siden innhold av fett, protein og energi var tilnærmet likt i de to forsøksfôrene, og nivå av omega-3-fettsyrer i normaldietten var ikke så lavt at det påvirket veksten. Det var heller ingen signifikante forskjeller i overlevelse, vekst eller andre registrerte parametere (Tabell 10).

Tabell 10 Vekst og slakteparametere ved avslutning av Fase 1.

	Normal Omega-3		Høy Omega-3		Diett p-verdi
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	
Overlevelse	93,9	2,8	95,7	2,0	ns
Vekt	60,7	21,2	61,3	20,7	ns
Lengde*	12,9	1,3	12,9	1,4	ns
SGR	0,49	0,01	0,50	0,04	ns
K-faktor	2,73	0,28	2,74	0,28	ns
DP	88,9	1,82	89,1	1,39	ns
HSI	1,33	0,53	1,23	0,41	ns
ISI	1,54	0,28	1,61	0,3	ns
IFI	0,95	0,69	0,91	0,63	ns

\*Oppgitt lengde er uten halefinne, siden ulik slitasje av halefinne kunne gi feilaktig og ikke sammenlignbare lengder. DP: slakteutbytte, HSI: leverindeks, ISI: tarmindeks, IFI: andel innvolls fett.

I Fase 2 var det som forventet markert forskjell i vekst mellom høy og lav temperatur (Tabell 11 og Figur 6). Fisk på normaltemperatur vokste godt mens fisk på simulert vintertemperatur tapte vekt. Kondisjonsfaktor ved overgang til Fase 2 hadde ingen effekt på SGR, men en tydelig effekt på sluttvekt. Dette var forventet, siden snittvekten var høyere for fisk med høy K-faktor ( $69,1 \pm 2,8$  g) enn for fisk med lav K-faktor ( $51,4 \pm 3,1$  g), uavhengig av diett i Fase 1. Ved avslutning av Fase 1 var det også en markert forskjell i andel innvolls fett (%) mellom fisk med høy ( $1,2 \pm 0,6$  %) og lav ( $0,61 \pm 0,5$  %) K-faktor. K-faktor hadde en liten, men signifikant effekt på TGC i Fase 2. I praksis forklarer temperatur likevel det aller meste av variasjonen i vekst, Mengde innvolls fett var mest påvirket av temperatur, men det var også en effekt av K-faktor. Fisk med lav K-faktor hadde sannsynligvis mindre energireserver i form av innvolls fett enn fisk med høy K-faktor ved starten av temperaturforsøket.

Kondisjonsfaktor ved starten av Fase 2 hadde betydning for overlevelsen. Modellen hadde en lav forklaringsgrad for overlevelse ( $R^2$ ), men årsaken til dette var spesielt høy dødelighet i ett kar, og dermed en stor kareffekt. Til tross for dette var effekten av K-faktor signifikant, med høyere overlevelse i fisk som hadde høy K-faktor ved oppstart av temperaturforsøket (Fase 2).

Underveis i temperaturforsøket observerte vi markerte forskjeller i adferd. Fisk på lav temperatur lå mye på bunnen og var inaktive, mens de var mer aktive på høy temperatur.



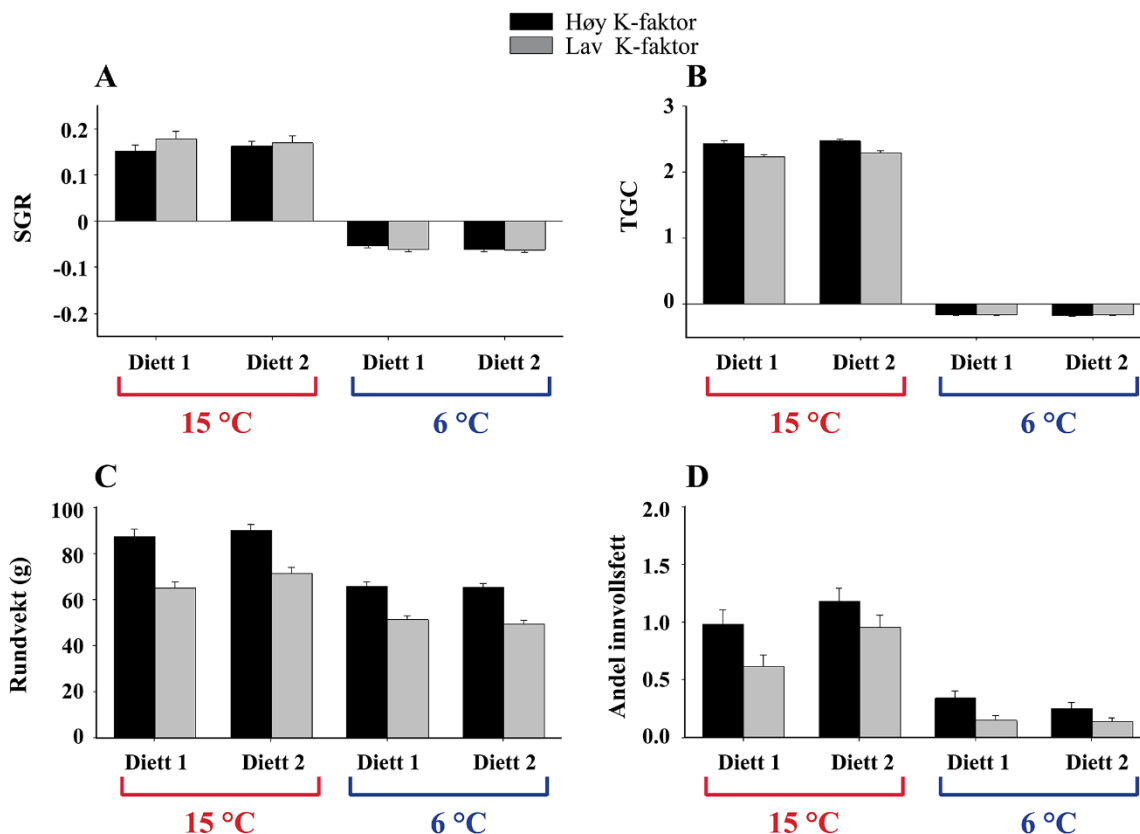
Tabell 11 Vekst og slakteparametere ved avslutning av Fase 2 i Kaldt vann A) og Varmt vann B), og C) tilhørende statistikk. Asterisk (\*) viser signifikansnivå.

A)	Kaldt vann (6 °C)							
	Normal Omega-3				Høy Omega-3			
	Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
Overlevelse	92,5	4,2	87,8	9,6	93,3	5,9	85,5	11,9
Sluttvekt	65,6	19,3	51,2	15,9	65,2	18,1	49,2	15,7
SGR	-0,05	0,05	-0,06	0,07	-0,06	0,05	-0,06	0,05
TGC	-0,16	0,09	-0,16	0,11	-0,18	0,09	-0,16	0,09
DP	91,4	2,1	90,9	2,5	91,7	1,8	90,9	1,5
HSI	1,86	0,47	1,48	0,51	1,5	0,37	1,5	0,46
ISI	1,85	0,51	1,9	0,65	1,71	0,48	1,83	0,49
IFI	0,34	0,32	0,15	0,21	0,25	0,29	0,14	0,18

B)	Varmt vann (15 °C)							
	Normal Omega-3				Høy Omega-3			
	Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
Overlevelse	97,1	2,9	88,3	3,4	98,1	3,2	93,8	6,5
Sluttvekt	87,2	32,1	65,1	23,8	89,9	28,6	71,4	25,0
SGR	0,15	0,15	0,18	0,16	0,16	0,11	0,17	0,16
TGC	2,44	0,39	2,23	0,35	2,48	0,32	2,29	0,67
DP	91,2	2,3	91,3	2,8	91,2	1,1	91,2	2,5
HSI	1,49	0,47	1,51	0,51	1,37	0,38	1,43	0,51
ISI	2,16	0,63	1,95	0,63	1,93	0,51	1,93	0,58
IFI	0,98	0,69	0,62	0,51	1,18	0,62	0,96	0,56

DP=slakteutbytte, HSI=leverindeks, ISI=tarmindeks, IFI=indeks innvollsfett

C)	Andel (%) av variasjon forklart av:			Modell R <sup>2</sup>
	Temp	Diett	KF	
Overlevelse	0,6	0	1,6***	0,04
Sluttvekt	14,3***	0,1	10,6***	0,26
SGR	51,2***	0,0	0,1	0,52
TGC	93,4***	0,0	0,1***	0,96
DP	0,0	0,0	0,6	0,02
HSI	2,0	2,14*	0,7	0,08
ISI	2,3	1,1	0,0	0,05
IFI	35,9***	0,8	3,5***	0,42



Figur 6 Vekstrate (SGR og TGC), rundvekt, og andel innvolls fett i forsøksgruppene ved avslutning av Fase 2.

### Kroppssammensetning

Innhold av fett, protein, aske og energi i samleprøver av helfisk var likt i alle fiskegrupper ved overgang til temperaturforsøket (Figur 12).

Tabell 12 Kjemisk innhold i prøvefisk (samleprøve) ved avslutning av fôringsforsøket (Fase 1).

	Normal Omega-3		Høy Omega-3		Diety
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	
Tørrstoff	28,5	0,8	27,8	1,8	ns
Aske	4,4	0,6	4,8	1,2	ns
Fett	6,7	1,1	5,9	2,2	ns
Råprotein	17,3	0,4	17,2	0,7	ns
Energi (MJ/kg)	6,6	0,4	6,3	1	ns

I temperaturforsøket (Fase 2) forklarte temperatur absolutt mest av variasjonen i kjemisk innhold i fisk (Figur 13). Dette gjaldt både fett, protein og energi. Når det gjelder askeinnhold hadde temperatur og K-faktor like stor betydning. Både lav temperatur og lav K-faktor ga høyere innhold av aske. Pre-diety i Fase 1 hadde lite å si for kroppssammensetning til slutt.

Tabell 13 A) og B) Kjemisk innhold av prøvefisk (samleprøver) ved avslutning av temperaturforsøket (Fase 2), og C) tilhørende statistikk. Asterisk (\*) viser signifikansnivå.

A)	Kaldt vann - 6 °C							
	Normal Omega-3				Høy Omega-3			
	Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
Tørrstoff	25,9	1,0	24,4	0,4	25,9	0,5	23,9	0,6
Aske	4,8	0,1	5,0	0,1	4,9	0,1	5,4	0,3
Fett	4,5	0,8	3,3	0,3	4,9	0,4	2,8	0,7
Råprotein	16,9	0,2	15,8	0,4	16,1	0,3	15,9	0,3
Energi (MJ/kg)	5,39	0,52	4,55	0,09	5,4	0,14	4,28	0,38

B)	Varmt vann - 15 °C							
	Normal Omega-3				Høy Omega-3			
	Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
Tørrstoff	30,2	0,8	28,6	1,0	29,6	0,2	28,0	1,1
Aske	4,6	0,3	4,8	0,1	4,5	0,1	4,9	0,2
Fett	7,9	0,7	6,5	1,1	7,3	0,5	6,0	1,2
Råprotein	17,7	0,1	17,2	0,3	18,5	0,3	17,3	0,3
Energi (MJ/kg)	7,19	0,38	6,62	0,35	7,02	0,22	6,32	0,52

C)	Andel (%) av variasjon forklart av:			Modell R <sup>2</sup>
	Temp	Diett	KF	
Tørrstoff	78,8***	0,9	13,0***	0,94
Aske	31,0**	5,4	30,7***	0,8
Fett	69,4***	0,8	16,6***	0,88
Råprotein	71,6***	2,2	11,7**	0,89
Energi (MJ/kg)	76,8***	0,7	14,1***	0,92

Ulike nivå av omega-3 i fôr påvirket fettsyreprofil i helkropp ved overgang til Fase 2. Analysene ved overgangen mellom Fase 1 og Fase 2 ble gjort på samleprøver fra fisk med høy og lav K-faktor innen hvert kar, 5 fisk per samleprøve, slik at vi kunne undersøke effekt av både diett og K-faktor. Det var bare diett som hadde effekt på fettsyreprofil (Tabell 14). Forskjellen gjenspeiler forskjell i fettsyresammensetning i fôr.

Tabell 14 Fettsyreprofil i prøvefisk ved avslutning av Fase 1

	Normal Omega-3		Høy Omega-3		Diett
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	p-verdi
C 14:0	5,2	0,1	4,0	0,3	<.0001
C 16:0	15,8	0,4	13,6	0,8	0,0002
C 18:0	3,6	0,2	3,9	0,2	0,01
SFA	24,7	0,5	21,6	0,9	<.0001
C 16:1 n-7	6,0	0,1	4,8	0,3	<.0001
C 18:1	23,5	0,5	21,9	0,6	0,0003
C 20:1	5,7	0,2	3,3	0,2	<.0001
C 22:1	4,4	0,3	1,5	0,1	<.0001
MUFA	40,1	0,7	32,0	1,0	<.0001
C 18:2 n-6	5,0	0,2	5,0	0,1	ns
C 20:4 n-6 (ARA)	0,8	0,1	1,7	0,2	<.0001
n-6 PUFA	6,6	0,2	7,5	0,1	<.0001
C 20:5 n-3 (EPA)	8,6	0,2	17,7	1,1	<.0001
C 22:5 n-3	1,4	0,1	2,1	0,2	<.0001
C 22:6 n-3 (DHA)	10,5	0,4	10,9	0,7	ns
n-3 PUFA	23,5	0,6	34,2	1,6	<.0001
EPA & DHA	19,1	0,5	28,7	1,4	<.0001

Fettsyreprofil i hel fisk ved avslutning av Fase 2 er vist i Tabell 15. Effekten av pre-dietten i Fase 1 var tydelig for alle fettsyrer bortsett fra C18:2 n-6 og DHA. Temperaturen var viktig for innholdet av mettet fett, spesielt C14:0. Innholdet av disse fettsyrene var høyere i grupper på høy enn på lav temperatur. Temperaturen var også viktig for innholdet av n-6 PUFA og DHA. Innholdet av DHA var høyest i fisk som hadde gått på kaldt vann. Kondisjonsfaktor ved starten av Fase 2 hadde minimal effekt på fettsyreprofil i fisken.

Tabell 15 A) Fettsyreprofil i hel fisk etter Fase 2

A)	Kaldt vann - 6 °C								Varmt vann - 15 °C							
	Normal Omega-3				Høy Omega-3				Normal Omega-3				Høy Omega-3			
	Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
C 14:0	5,0	0,2	5,3	0,2	4,1	0,1	4,2	0,2	6,0	0,2	6,2	0,2	5,2	0,1	5,7	0,2
C 16:0	15,7	0,3	15,9	0,2	13,6	0,2	14,8	0,7	16,2	0,1	16,5	0,5	15,0	0,1	15,6	0,3
C 18:0	3,8	0,3	3,8	0,1	4,3	0,3	4,5	0,4	3,8	0,1	3,8	0,3	4,0	0,1	4,1	0,2
SFA	24,6	0,3	25,1	0,3	22,1	0,1	23,5	0,9	26,1	0,2	26,1	0,7	24,3	0,0	25,5	0,7
C 16:1 n-7	6,3	0,3	6,3	0,1	5,3	0,2	5,1	0,3	6,2	0,1	6,2	0,1	5,6	0,1	5,9	0,2
C 18:1	24,3	0,2	23,9	0,2	23,1	0,8	23,1	0,6	24,2	0,2	23,9	0,3	23,2	0,2	23,4	0,7
C 20:1	5,5	0,3	5,2	0,2	3,7	0,2	3,7	0,2	5,4	0,2	5,1	0,1	4,0	0,1	4,3	0,2
C 22:1	3,9	0,4	3,3	0,3	1,6	0,1	1,7	0,0	3,5	0,2	3,1	0,2	1,8	0,1	1,9	0,1
MUFA	40,4	0,7	39,2	0,3	34,1	1,2	34,0	0,8	39,7	0,6	38,7	0,3	35,0	0,2	35,9	1,2
C 18:2 n-6	4,9	0,1	4,8	0,1	4,8	0,1	4,7	0,1	4,4	0,1	4,4	0,2	4,4	0,2	4,3	0,1
C 20:4 n-6 (ARA)	0,9	0,1	1,0	0,1	1,5	0,1	1,7	0,2	0,7	0,0	0,7	0,1	1,2	0,1	1,0	0,1
n-6 PUFA	6,5	0,1	6,4	0,1	7,2	0,2	7,1	0,1	5,7	0,1	5,8	0,3	6,4	0,1	6,0	0,1
C 20:5 n-3 (EPA)	8,6	0,2	9,3	0,4	15,9	0,6	14,6	0,8	9,0	0,2	9,5	0,3	14,3	0,2	12,6	0,6
C 22:5 n-3	1,5	0,1	1,5	0,1	2,1	0,1	2,1	0,1	1,5	0,0	1,5	0,1	2,0	0,1	1,8	0,2
C 22:6 n-3 (DHA)	10,7	0,7	11,1	0,2	10,9	0,2	12,0	0,4	9,5	0,2	9,9	0,3	10,0	0,1	10,0	1,4
n-3 PUFA	23,5	0,9	24,5	0,3	32,0	0,8	31,4	1,5	23,2	0,4	24,3	0,4	29,6	0,2	27,8	2,0
EPA & DHA	19,3	0,9	20,4	0,5	26,7	0,8	26,6	1,2	18,5	0,4	19,4	0,5	24,3	0,3	22,6	1,9

Tabell 15 B) tilhørende statistikk, asterisk (\*) viser signifikansnivå.

B)	Andel (%) av variasjon forklart av:			Modell R <sup>2</sup>
	Temp	Diett	KF	
C 14:0	60,2***	31,3***	2,6**	0,96
C 16:0	16,2*	52,3***	6,6**	0,92
C 18:0	7	43,9***	3,4	0,59
SFA	38,7**	37,2***	8,3**	0,93
C 16:1 n-7	6,9*	68,3***	0,2	0,91
C 18:1	0,5	52,5***	1,0	0,63
C 20:1	0,7	88,8***	0,4	0,96
C 22:1	0	90,7***	1,2*	0,97
MUFA	0,5	86,8***	0,5	0,95
C 18:2 n-6	80,6***	1,1	1,9	0,85
C 20:4 n-6 (ARA)	30,8***	55,3***	0,4	0,95
n-6 PUFA	60,4***	29,6***	1,6*	0,96
C 20:5 n-3 (EPA)	1,8*	88,4***	0,7*	0,99
C 22:5 n-3	2,8	79,9***	1,1	0,94
C 22:6 n-3 (DHA)	53,3**	5,6	7	0,75
n-3 PUFA	5,3*	82,6***	0	0,96
EPA & DHA	10,2**	77,7***	0	0,95

#### Velferdsskår

Ved oppstart av fôringsforsøket (Fase 1) ble det gjort velferdsskåring av 90 fisk fra utgangspopulasjonen, og det ble gjort tilsvarende registreringer av 30 fisk per kar ved avslutning av Fase 1. Figur 7 og Figur 16 viser data fra avslutning Fase 1, og i Figur 16 er også data fra utgangspopulasjonen inkludert. Gjennomsnittsverdier for hver egenskap per gruppe er oppgitt. I tillegg er det oppgitt en sumindeks som er den gjennomsnittlige summen av de ulike egenskapene det ble skåret for. Sumindeks gir et bilde på totalinntrykket av fisken ved at en høy poengsum indikerer mange bemerkninger på sår/skader/feil på fisken. Lav K-faktor ved starten av temperaturforsøket (Fase 2) ga en tendens til mer avmagring og høyere sumindeks, altså noe redusert velferd i gruppene som hadde lav K-faktor ved oppstart av Fase 2. Skjelltap var tydelig påvirket av diett, med høyere grad av skjelltap i normaldietten sammenlignet med dietten med høy omega-3. Dette kan ha sammenheng at omega-3-fettsyrer i fôr påvirker skinnkvalitet slik vi har sett hos laks (Berge et al., 2019).

Data fra velferdsskåringen etter Fase 2 er vist i Tabell 17 og Figur 8. På dette tidspunktet var avmagring og skjelltap påvirket av både temperatur og K-faktor ved start av Fase 2. Det var større grad av avmagring og skjelltap ved lav temperatur, og hos fisk som hadde lav K-faktor ved starten av Fase 2.

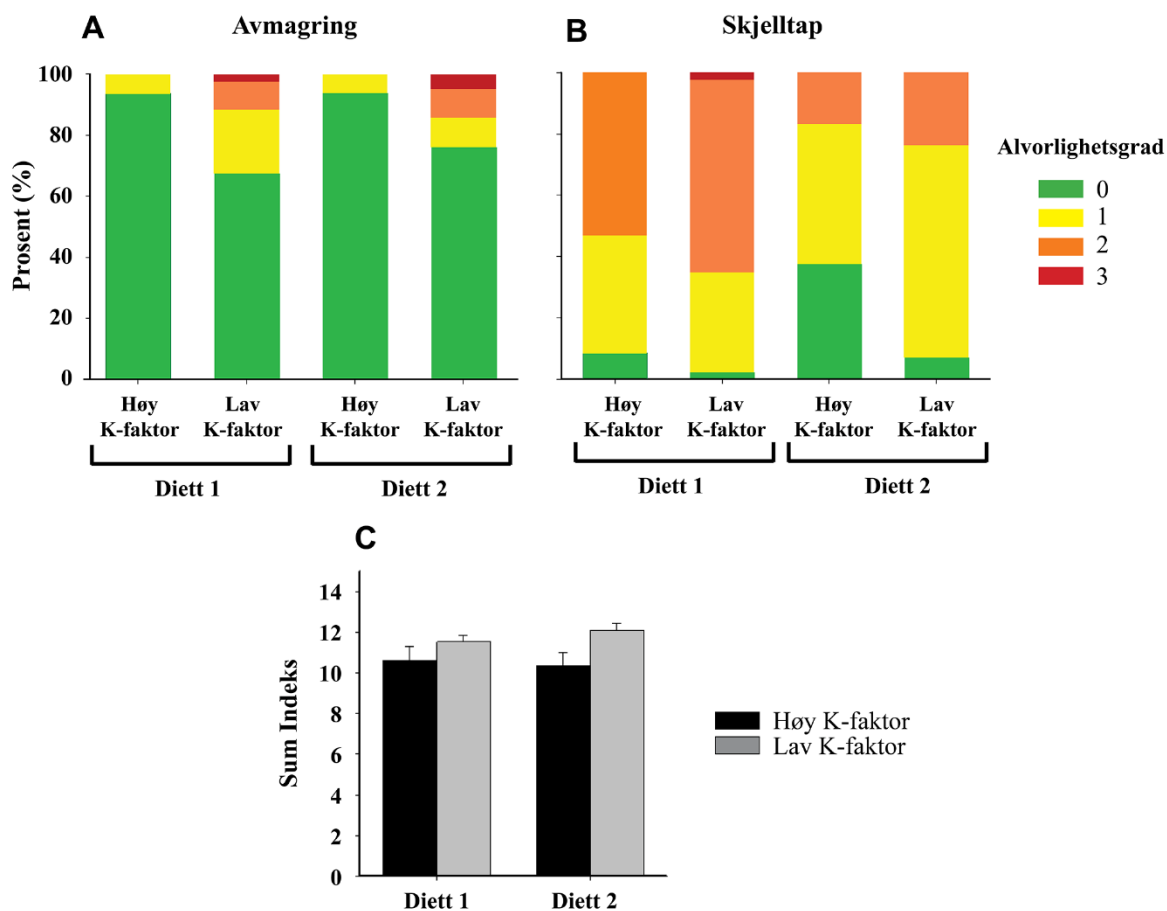
Tabell 16 A) Velferdsskår for startpopulasjon (n=90) og ved avslutning av Fase 1 hvor 30 fisk per kar ble evaluert totalt, 15 fra Høy og Lav kondisjonsfaktor, som definert for sortering til oppstart av Fase 2. Gjennomsnittsverdier ble brukt i analyse av data (n=3). Sumindeks er gjennomsnittlig sum av alle registreringer.

A)	Startpopulasjon		Normal Omega-3				Høy Omega-3			
			Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
Gjellelokk	0,48	0,81	0,41	0,11	0,49	0,05	0,23	0,09	0,50	0,50
Snute	1,42	1,01	1,17	0,16	1,14	0,07	1,24	0,21	1,49	0,30
Overkjeve	0,86	0,87	0,79	0,18	0,74	0,12	0,93	0,17	0,86	0,17
Underkjeve	1,20	0,86	1,11	0,16	1,30	0,10	1,08	0,16	1,21	0,13
Avmagring	0,18	0,41	0,07	0,07	0,47	0,04	0,07	0,07	0,41	0,41
Skjelltap	2,04	0,42	1,44	0,32	1,66	0,17	0,78	0,28	1,17	0,11
Ryggfinne	1,04	0,79	0,92	0,04	1,01	0,36	1,08	0,03	1,04	0,14
Halefinne	1,36	0,61	1,32	0,23	1,38	0,16	1,51	0,22	1,57	0,19
Brystfinner	1,76	0,77	1,64	0,23	1,67	0,17	1,55	0,40	1,79	0,33
Gattfinne	0,92	0,81	0,98	0,15	1,05	0,11	1,12	0,10	1,24	0,33
Bukfinner	0,96	0,65	0,70	0,22	0,65	0,10	0,79	0,16	0,83	0,18
SumIndeks	12,23	4,00	10,63	1,21	11,55	0,55	10,37	1,14	12,12	0,56

Tabell 16 B) Tilhørende statistikk. Startregistreringene er ikke inkludert i den statistiske behandlingen. Asterisk (\*) viser signifikansnivå.

B)	Modell p-verdi	Andel (%) av variasjon forklart av:			Modell R <sup>2</sup>
		Diett	K-fakt	Diet*K-fakt	
Gjellelokk	0,57	2,9	13,8	4,2	0,21
Snute	0,22	23,9	6,4	10,5	0,41
Overkjeve	0,52	19,2	4,2	0,1	0,24
Underkjeve	0,24	4,2	33,7	1,0	0,39
Avmagring	0,08	0,3	53,8*	0,3	0,54
Skjelltap	0,009	57,8**	15,6	1,3	0,75
Ryggfinne	0,77	8,2	0,5	3,9	0,13
Halefinne	0,44	25,3	2,2	0,0	0,27
Brystfinner	0,79	0,1	6,9	4,5	0,11
Gattfinne	0,46	20,2	5,6	0,4	0,26
Bukfinner	0,59	18,2	0,0	2,2	0,20
SumIndeks	0,15	0,6	42,1*	4,0	0,47





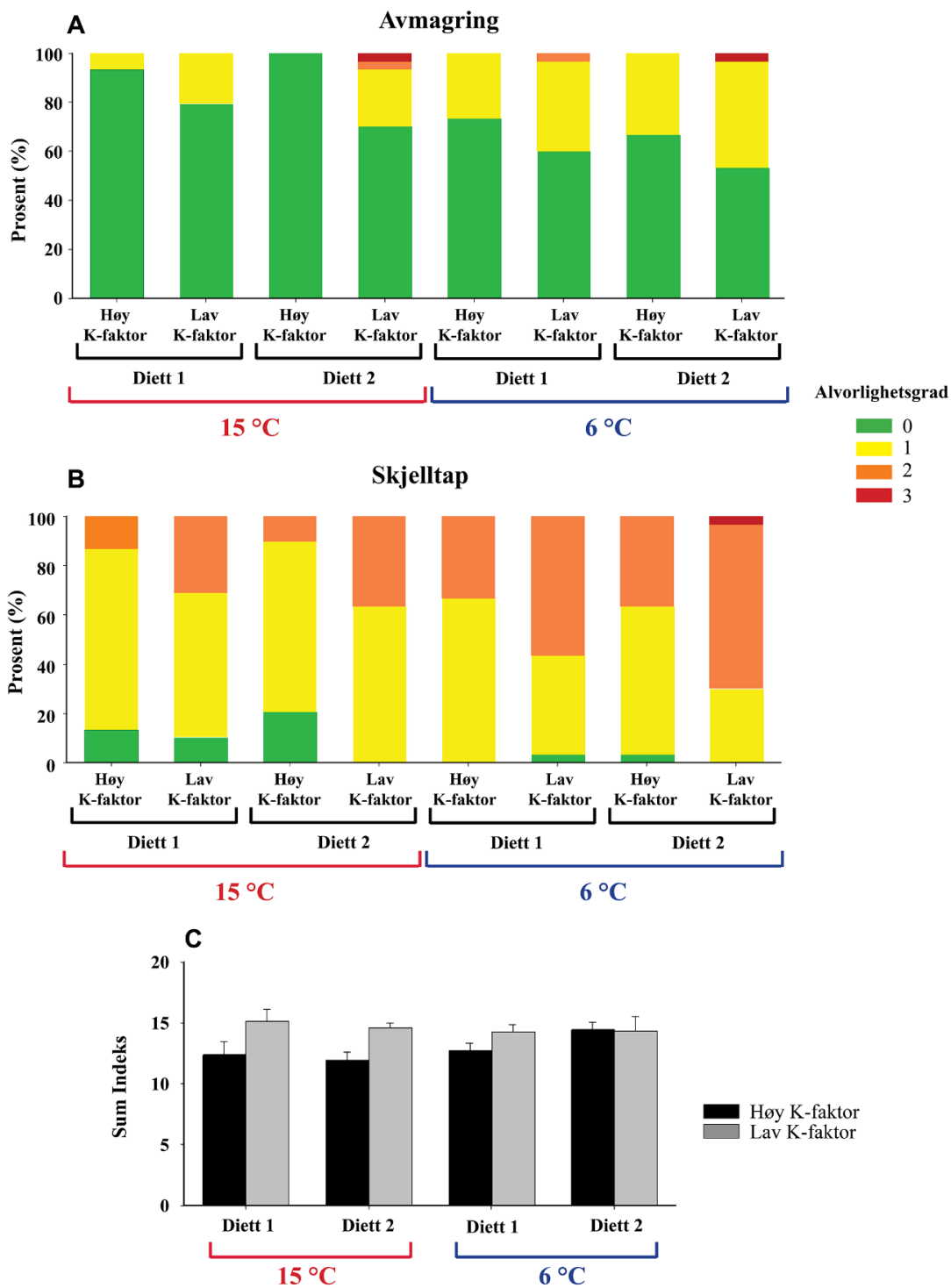
Figur 7 Velferdsskår ved avslutning av Fase 1. Figur A viser skår for avmagring og skjelltap. Ulike farger indikerer ulik alvorlighetsgrad. Figur C viser sumindeks for fisk med høy og lav k-faktor som har fått to ulike dietter i første fase. Diett 2 har ekstra tilskudd av omega-3.

Tabell 17 A) Velferdsskåringer ved avslutning av fase 2

A)	Kaldt vann - 6 °C								Varmt vann - 15 °C							
	Normal Omega-3				Høy Omega-3				Normal Omega-3				Høy Omega-3			
	Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor		Høy K-faktor		Lav K-faktor	
	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev	Gj.snitt	Std Dev
Gjellelokk	0,33	0,21	0,40	0,10	0,50	0,10	0,27	0,06	0,50	0,44	0,65	0,19	0,42	0,24	0,83	0,06
Snute	1,10	0,36	1,27	0,15	1,17	0,15	1,10	0,40	0,93	0,15	1,70	0,30	1,17	0,25	1,47	0,21
Overkjeve	0,63	0,31	0,80	0,00	0,93	0,25	0,97	0,55	1,00	0,36	1,07	0,25	0,77	0,21	1,13	0,12
Underkjeve	1,37	0,29	1,23	0,25	1,37	0,35	1,47	0,25	1,40	0,35	1,79	0,20	1,28	0,14	1,73	0,12
Avmagring	0,27	0,15	0,43	0,12	0,33	0,15	0,53	0,21	0,07	0,06	0,20	0,17	0,00	0,00	0,40	0,10
Ryggdef.	0,83	0,15	0,80	0,17	1,03	0,06	0,60	0,00	0,83	0,06	0,87	0,15	0,80	0,20	0,80	0,17
Skjelltap	1,33	0,06	1,53	0,12	1,33	0,12	1,73	0,21	1,00	0,20	1,21	0,22	0,91	0,28	1,37	0,12
Ryggfinne	1,27	0,12	1,20	0,26	1,37	0,06	1,20	0,20	0,93	0,25	1,10	0,30	1,03	0,32	1,00	0,10
Halefinne	1,57	0,12	1,87	0,15	1,83	0,21	1,90	0,00	1,73	0,15	1,79	0,10	1,85	0,36	1,73	0,15
Brystfinner	2,00	0,17	2,27	0,12	2,20	0,20	2,10	0,00	2,13	0,25	2,14	0,12	2,04	0,12	2,10	0,10
Gattfinne	1,10	0,17	1,43	0,38	1,40	0,26	1,57	0,21	1,10	0,10	1,73	0,11	1,00	0,20	1,27	0,29
Bukfinner	0,97	0,15	1,07	0,40	1,00	0,20	0,93	0,29	0,77	0,42	0,87	0,41	0,69	0,02	0,77	0,15
SumIndeks	12,77	1,02	14,30	1,01	14,47	1,06	14,37	2,06	12,40	1,83	15,13	1,78	11,96	1,09	14,60	0,75

Tabell 17 B) Tilhørende statistikk. Asterisk (\*) viser signifikansnivå.

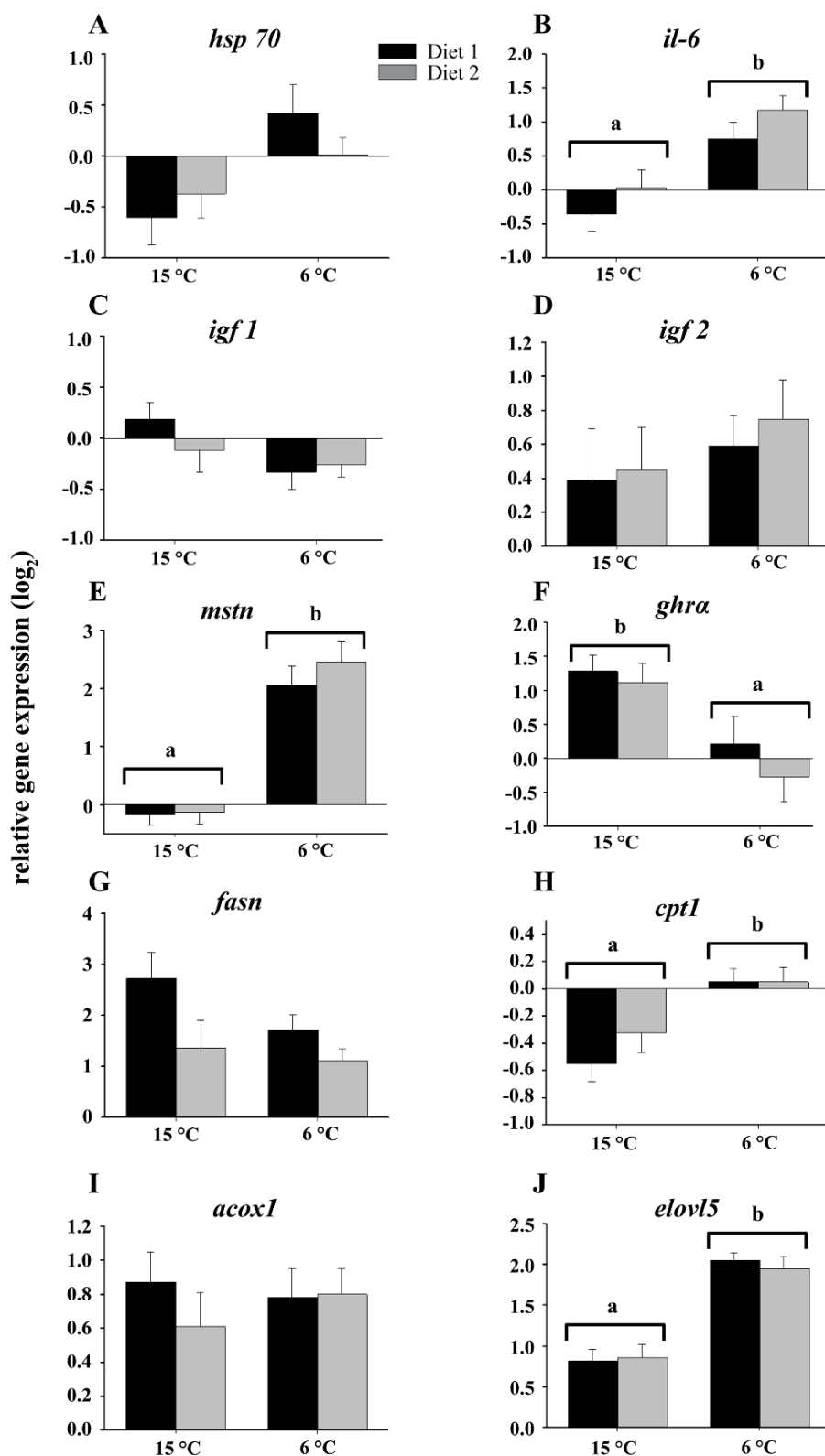
B)	Modell	Andel (%) av variasjon forklart av:						Modell
		p-verdi	Temp	Diett	KF	Temp*Diett	temp*KF	
Gjellelokk	0,13	22	0,6	4,1	0,2	14,1	0	0,41
Snute	0,04	6,6	0,1	21,6*	0,2	14,8*	8	0,51
Overkjeve	0,46	7,6	1,6	7,6	7,6	1	0,5	0,26
Underkjeve	0,08	11,7	0,1	12,9	3,3	15,1	1,7	0,45
Avmagring	0,001	30,3***	3,3	30,7***	0,1	1,1	3,3	0,69
Skjelltap	0,13	0,1	0,6	11,7	0,6	15,6*	11,7	0,4
Ryggfinne	0,0002	39,1***	1,3	30,3***	0,4	0,1	3,7	0,75
Halefinne	0,21	28,2*	0,3	0,3	0,3	4,2	2,7	0,36
Brystfinner	0,32	0,2	5,1	4,8	3	8,7	8,1	0,31
Gattfinne	0,77	1,8	0,8	4	2,1	0,7	6,9	0,16
Bukfinner	0,008	2,8	0,3	33,0**	16,8*	2,6	4,7	0,6
SumIndeks	0,62	16,7	1,7	1	0,1	0,5	0,8	0,21
Gjellelokk	0,06	2	0,4	28,5**	4,6	9,6	1,8	0,47



Figur 8 Velferdsskåring i Fase 2 hos fiskegrupper med forskjellig pre-diett og K-faktor ved to temperaturer.

### Genuttrykk

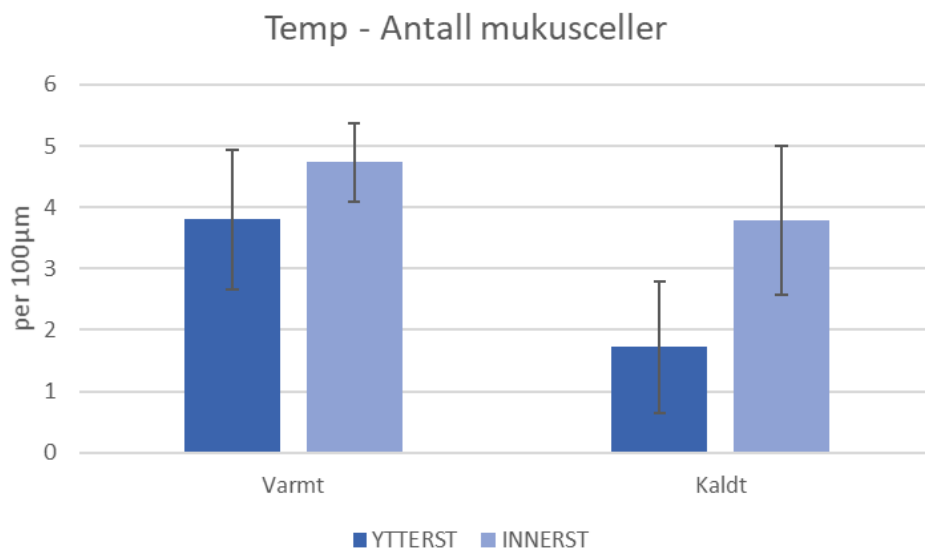
Prøver av lever fra fisk fra alle grupper ble analysert for uttrykk av et antall relevante gener som ble utvalgt på forhånd. Ved slutten av Fase 1 var det ingen forskjeller knyttet til verken diett eller K-faktor. Etter Fase 2 var det heller ingen forskjeller på grunn av K-faktor. Pre-diett hadde signifikant effekt bare for *fasn* som er relatert til fettsyresyntese der Diett 1 førte til høyere genuttrykk. Videre hadde temperatur signifikant effekt på uttrykk av enkelte gener relatert til vekst og fettsyremetabolisme, som vist i Figur 9. Genuttrykk av *mstn*, som er en negativ regulator av muskelvekst, og *ghra*, knyttet til vekst, tyder på positiv effekt av høyere temperatur på vekstmarkører med oppregulering av *ghra* og nedregulering av *mstn*. Markørene for betennelse, *il6*, og stress, *hsp70*, viste oppregulering eller tendens til oppregulering ved 6 °C sammenliknet med 15 °C, noe som tyder på bedre betingelser for fisken ved den høye temperaturen sammenliknet med den lave temperatur. Både *cpt1* og *elovl5* knyttet til hhv fettforbrenning og fettsyresyntese var oppregulert ved lav temperatur.



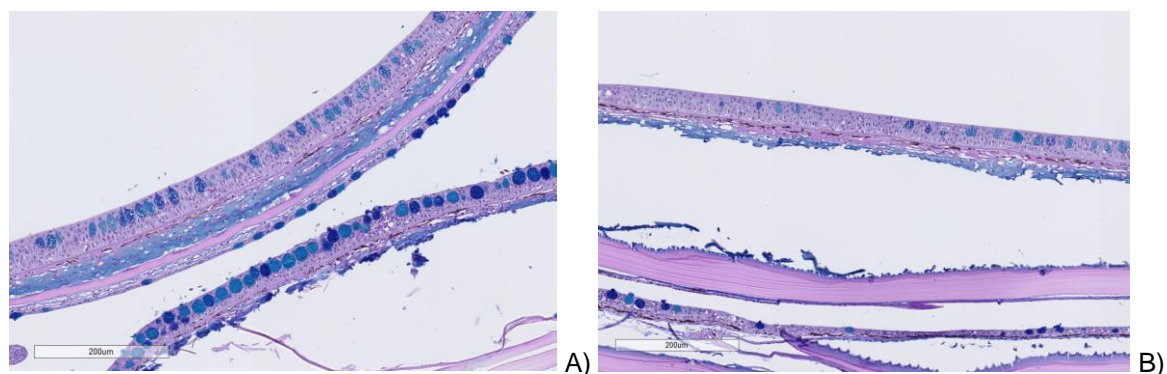
Figur 9 Genuttrykk i lever etter Fase 2 (*hsp70*, heat shock protein 70; *igf1*, Insulin Like Growth Factor 1; *igf2*, Insulin Like Growth Factor 2; *ghra*, Growth hormone receptor  $\alpha$ ; *mstn*, Myostatin; *IL6*, Interleukin 6; *fasn*, Fatty acid synthase; *cpt1*, Carnitine palmitoyltransferase I; *acox1*, acyl-CoA oxidase 1; *elovl5*, fatty acid elongase 5)

### Histologisk evaluering

Bortsett fra for tykkelsen på epidermis viste alle resultater forskjell mellom høy og lav temperatur. Antall slimceller varierte signifikant mellom fisk temperatur. Skinnprøver fra fisk på høy temperatur hadde flere slimceller per  $\mu\text{m}$  både i ytre og indre lag av epidermis enn frisk på lav temperatur (Figur 10), eksempelbilder vist i Figur 11.

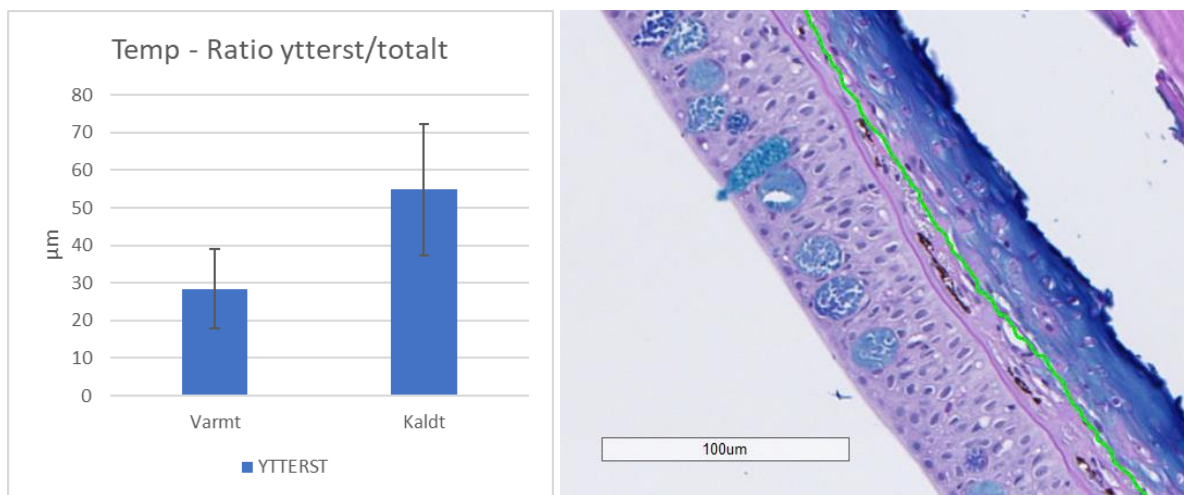


Figur 10 Antall slimceller i ytre og indre epidermis i skinnprøver fra fisk i Høy og Lav gruppe



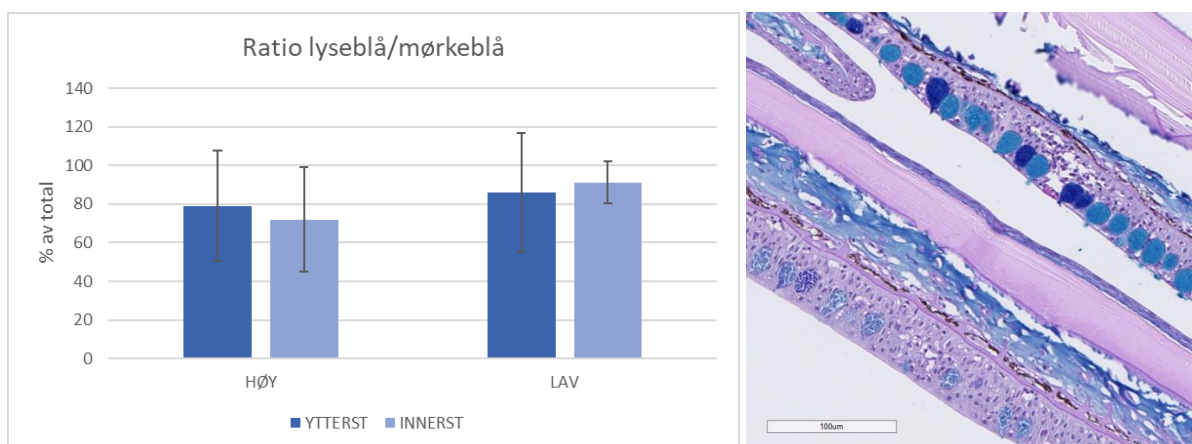
Figur 11 Eksempel på bilder av mukusceller fra høy temperatur (A) og lav temperatur (B)

Forholdet mellom antall slimceller ytterst i epidermis og totalt antall slimceller ble beregnet. I fisk fra lav temperatur var denne ratioen signifikant høyere enn i fisk fra høy temperatur (Figur 12). Hos laks, torsk og rognkjeks er en slik organisering av slimcellene knyttet til økt stress.



Figur 12 Ratio mellom antall slimceller i det ytterste laget og totalt antall slimceller. Slimceller som strekker seg ut av epidermis og som dermed skiller ut mukus til mukuslaget telles som «ytterst».

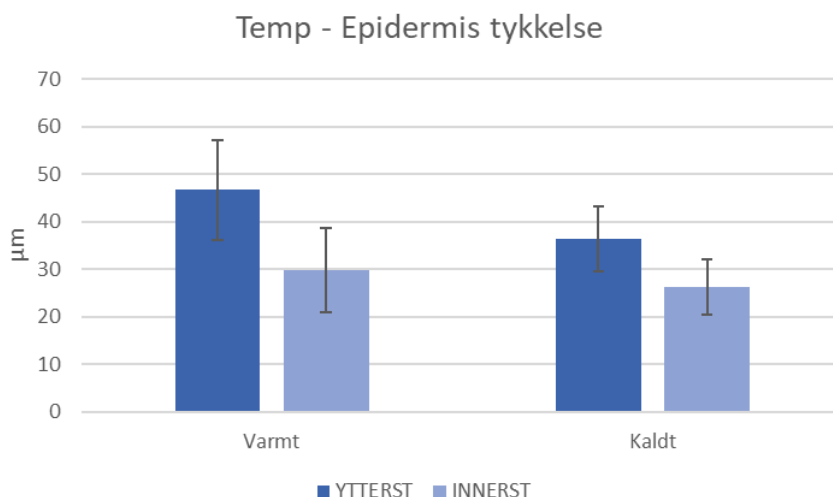
Det var ingen forskjell i ratio mellom lyseblå og mørkeblå slimceller, og det ble funnet få rosa celler. Forskjellige farger i slimcellene skyldes ulik pH i slimet, som igjen kommer an på glykosylering av muciner. Funksjonen er ikke kjent, men vi har observert at rosa slimceller kan knyttes til stress. Forskjellene mellom lyseblå og blå er ikke kjent. Ratio mellom lyseblå og mørkeblå slimceller er vist i Figur 13.



Figur 13 Ratio mellom lyseblå og mørkeblå slimceller i epidermis hos fisk på Høy og Lav temperatur

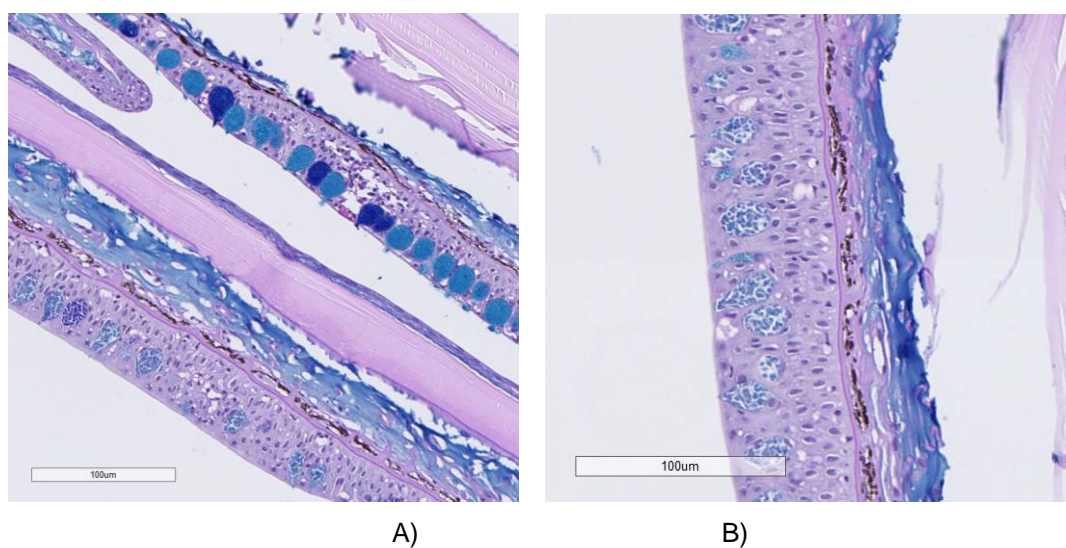
Epidermis var signifikant tykkere i fisk fra høy temperatur (Figur 14). Dette kan være knyttet til sterkere skinn med bedre barrierefunksjon, men i dette tilfellet er det også sannsynlig at det er knyttet til fiskestørrelse. Fisk fra høy temperatur var større enn fisk fra lav temperatur, og epidermistykkelse og fiskestørrelse henger ofte sammen.





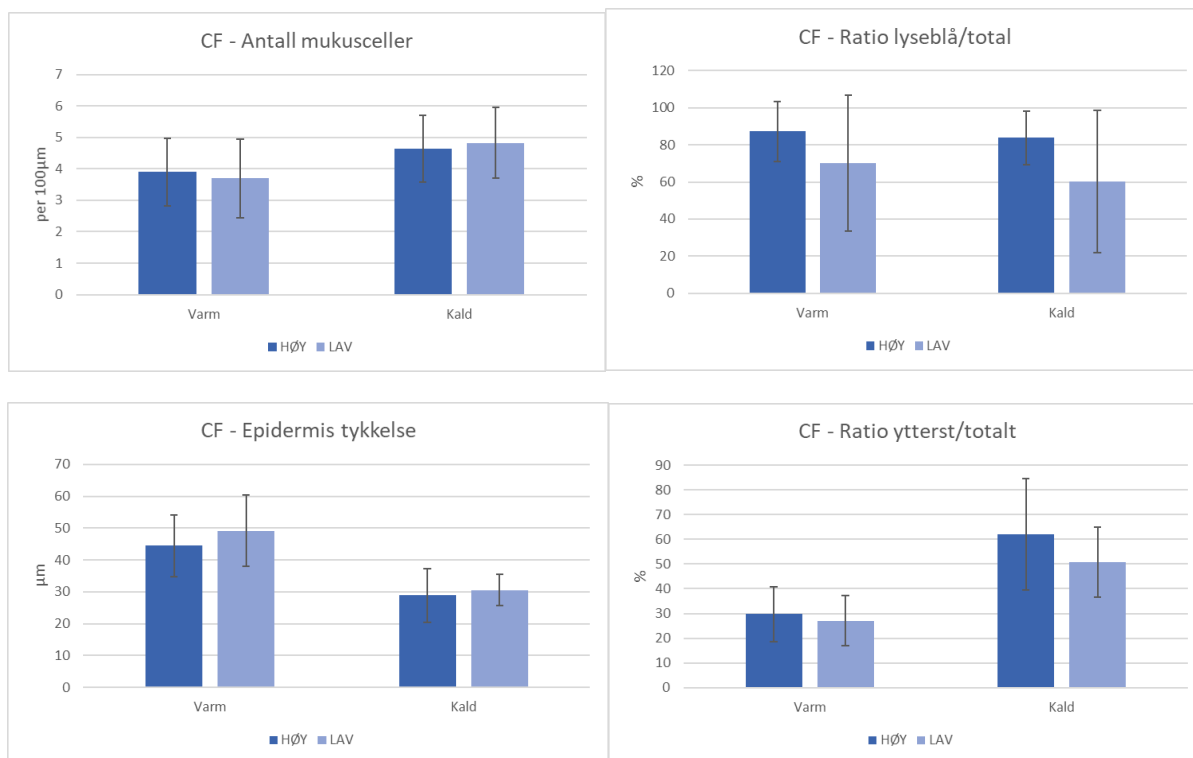
Figur 14 Epidermistykkelse hos fisk på Høy og Lav temperatur

Andre forskjeller verdt å nevne er strukturen av slimceller i ytre epidermislag. Slim i det ytre laget var granulert sammenlignet med slim i indre lag (Figur 15). Det ytre laget er mer eksponert for miljøfaktorer, og er den delen av skinnen der vi oftest ser forandringer. Denne granuleringen var mer uttalt i fisk fra høy temperatur. Det hadde vært interessant å samle slimprøver for å studere nærmere biologisk betydning av denne forskjellen, men slike prøver ble ikke tatt i dette forsøket.



Figur 15 A) Indre og ytre epidermis, der granulert innhold i slimcellene kan observeres. B) Høyere forstørrelse av granulerte slimceller.

Basert på resultatene ser det ut til at fisk fra høy temperatur har bedre skinnkvalitet enn fisk fra lav temperatur. Det er likevel slik at denne antagelsen bygger på erfaring fra laks, torsk og rognkjeks. Det trengs flere studier på skinn fra berggyllt for å se om responsene er sammenlignbare med andre arter. Vi fant ingen forskjeller knyttet til kondisjonsfaktor på fisken i de to temperaturgruppene (Figur 16).



Figur 16 Effekter av ulike kondisjonsfaktorer på målinger i skinn fra fisk ved høy og lav temperatur.

### 4.3.3 Konklusjon

Tilskudd av omega-3 fettsyrer ga mindre skjelltap og påvirket fettsyreprofilen i fisken. Det var ingen effekt av tilskudd av omega-3 fettsyrer på andre parametere.

Prøvefisk med høy og lav K-faktor etter Fase 1 var ulike med hensyn til viktige egenskaper. Fisk med lav K-faktor hadde lavere vekt, mindre energireserver i form av innvolls fett og høyere grad av avmagring og sumindeks velferd (dårligere velferd) enn fisk med høy K-faktor.

I Fase 2 vokste fisken best på høy temperatur, mens fisk på lav temperatur tapte vekt. Fisk som gikk inn i Fase 2 med lav K-faktor hadde tydelig lavere TGC enn fisk med høy K-faktor.

Innhold av fett, protein og energi ved avslutning av Fase 2 var påvirket av temperatur, men også K-faktor ved overgangen fra Fase 1 til 2. Innholdet av fett, protein og energi var høyest ved høy temperatur og høy K-faktor. Lav temperatur og lav K-faktor økt innhold av aske.

Histologisk undersøkelse av skinn tyder på at fisk fra høy temperatur har bedre skinnkvalitet enn fisk fra lav temperatur, basert på kriterier brukt for andre arter (laks, torsk, rognkjeks).

## 5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

### *Kondisjonering av rensefisk før utsett i merd*

Den første arbeidspakken som skulle undersøke om det er viktig å tilvenne rensefisken til faktorer som fôr, lys og temperatur før utsett i merd ble avbrutt på grunn av uvær, og etter hvert covid-19. Det er derfor begrenset hvor mye resultater som kom ut av dette.

Overlevelsen av berggylten var høy i alle tre behandlingene (~95 %) fra midten av juli til slutten av oktober da en kraftig storm førte til en brå økning i dødeligheten. For berggylt kan det se ut som om det er hendelser av denne art, og ikke sykdom som forårsaker stor dødelighet.

Skår for avmagring indikerte at blokkfôring ga bedre ernæringsstatus enn pellet, men variasjonen innen hver behandling var stor. Tilvenning til blokkfôr før berggylten settes i merd kan være viktig. Prøvefisken ble fanget langs notveggen, noe som trolig ikke ga representative prøvefisk. Resultatene må derfor tolkes med forsiktighet.

### *Fôrsammensetning og immunforsvar hos rognkjeks*

Basert på resultater fra CleanFeed (FHF #901331) brukte vi cirka 55 % protein i alle tre forsøksfôrene, og varierte fett- og karbohydratinholdet. Til tross for stort spenn i næringsinnhold i fôrene (6,7–18,0 % fett og 8,1–18,5 % karbohydrat) fant vi ingen klare forskjeller i vekst og overlevelse. Dette tyder på at mindre fett og mer karbohydrat ikke er nok til å redusere tilveksten hos rognkjeks. Fra CleanFeed vet vi at rognkjeks fordøyer høye nivåer av karbohydrater dårlig (50–60 % fordøyelighet). Vi antar derfor at fisk som fikk mindre fett og mer karbohydrat i fôret kompenserte med å spise mer, og dermed vokste like mye som fisk som fikk mest fett og minst karbohydrat. Hvis målet er å bremse tilveksten hos rognkjeks er det aktuelt å undersøke om ulike fôringsstrategier påvirker tilveksten, det vil si hvor ofte og hvor mye det bør fôres. For rognkjeks er det viktig å finne en strategi som ikke fører til økt aggressivitet.

Fôret med mest fett og minst karbohydrat ga økt mengde fett i lever og kropp i forhold til de to andre forsøksfôrene. Vi vet foreløpig ikke betydningen av økte fettnivåer i lever hos rognkjeks, det vil si når de går fra å være energilager til eventuelt å gi negative effekt på leverfunksjon og helse.

Forsammensetning hadde ingen klar effekt på motstandsevnen mot atypisk *A. salmonicida*. Numerisk verdi for dødelighet i smittetestet var lavest med den magreste dietten, men dette var ikke signifikante forskjeller. Vi konkluderer derfor med at mengde fett og karbohydrater i fôret betyr lite for motstandsevnen mot sykdom hos rognkjeks innenfor de områdene vi testet.

### *Effekt av fôr og kondisjonsfaktor på toleranse for lave sjøtemperaturer hos berggylt*

I første fase av dette forsøket som varte tre måneder fikk den ene gruppen ekstra tilskudd av omega-3 i fôret. Fisken vokste godt i begge gruppene, men verken vekst eller overlevelse var påvirket av ekstra omega-3. Fettsyreprofilen i de to fôrene ble som forventet gjenspeilet i hel fisk ved avslutning av denne fasen. I Fase 2 (temperaturforsøk) gikk all fisken på samme fôr (Otohime S2) over en periode på 4,5 måneder. Pre-dietten som var brukt i Fase 1 påvirket likevel fettsyreprofilen i hel fisk ved avslutning av temperaturforsøket.

Ved overgangen til Fase 2 ble fisken sortert og merket slik at alle kar hadde likt antall fisk fra begge dietter, og likt antall fisk med høy og lav kondisjonsfaktor. Deretter ble fisken satt på to ulike temperaturer, 15 °C og 6 °C. Overlevelsen var høy i alle gruppene, men var positivt påvirket av høy kondisjonsfaktor. Det var som forventet temperatur som hadde klart størst effekt på tilveksten. Fisken vokste godt ved 15 °C, men tapte vekt ved 6 °C. Innvolls fett er et energilager for fisken, og mengden innvolls fett var dobbelt så stor hos fisk som gikk på 15 °C sammenlignet med 6 °C.

Temperatur hadde også størst innvirkning på kjemiske innhold i fisken ved avslutning av Fase 2. Fisk som hadde gått på 15 °C inneholdt mer protein, fett og energi enn fisk på 6 °C. Askeinnholdet var høyest ved lav temperatur og lav kondisjonsfaktor.

Det var en tendens at fisk med lav kondisjonsfaktor når Fase 2 startet var mer avmagret ved avslutningen av forsøket. Denne fisken hadde også høyere sumindeks ved velferdsskåring, det vil si at de hadde noe dårligere velferd. På samme tidspunkt så vi også at skjelltapet var noe mindre blant fisken som fikk ekstra tilskudd av omega-3 i pre-dietten (Fase 1). Fra laks vet vi at omega-3-fettsyrer kan påvirke skinnkvalitet. Omfanget av skjelltap var helt klart påvirket av temperaturen i Fase 2. Skjelltapet var størst hos fisk som hadde gått på 6 °C, og tenderte også til å være større hos fisk med lav kondisjonsfaktor enn hos fisk med høy kondisjonsfaktor.

Histologiske undersøkelser viste at temperatur påvirket antall slimceller i ytre og indre epidermis. Fisk som hadde gått på 6 °C hadde en høy andel slimceller i ytre epidermis, noe som hos torsk og rognkjeks forbindes med stress. Epidermis var dessuten signifikant tykkere i fisk som hadde gått på høy temperatur. Dette kan bety sterkere skinn med bedre barrierefunksjon, men kan også forklares med fiskestørrelse fordi fisk på 15 °C var større enn fisk på 6 °C. Kondisjonsfaktor påvirket ikke skinnhelsen. Vurderingene av skinnhistologi bygger på erfaring fra laks, torsk og rognkjeks, det er derfor behov for flere studier for å klarlegge om responsene er lik det vi ser i enkelte andre arter.

Det ble observert store forskjeller i atferd mellom de to temperaturgruppene. Ved 15 °C sto fisken i vannsøylen, oftest i skjulene, mens fisken i 6 °C-gruppen lå mest på bunnen etter at temperaturen nådde 6 °C. Denne atferden kan ha bidratt til økt skjelltap ved lav temperatur. I merder kan dette være et større problem fordi berggylten kan bli liggende og skubbe mot bunnen av nota ved lave temperaturer.

Når det gjelder genuttrykk fant vi ingen forskjeller knyttet til diett eller kondisjonsfaktor ved avslutning av fôringsforsøket (Fase 1). Ved avslutning av temperaturforsøket (Fase 2) fant vi heller ingen effekt av kondisjonsfaktor, men fant at uttrykket av flere gener var tydelig påvirket av temperatur. Markører for vekst, stress og inflammasjon indikerer bedre betingelser ved 15 °C enn ved 6 °C.

Resultatene viser at kondisjonsfaktor er viktig når berggylt skal stå i sjøen ved lave temperaturer. Både overlevelse, energireserve i form av innvolls fett og avmagring var positivt påvirket når fisken hadde høy kondisjonsfaktor før temperaturnedgangen startet. Mer avmagring og dårligere skinnhelse ved lav temperatur kombinert med at fisken i hovedsak lå på bunnen av karet aktualiserer etter vår mening spørsmålet om utfisking av berggylt før den kaldeste vinterperioden.

## 6 Hovedfunn

- Varierende innhold av fett (6,7–18 %) og karbohydratnivå (8,1–18,5 %) i fôr til rognkjeks ved konstant proteininnhold (55 %) ga ingen forskjell i tilvekst, men forskjell i deponering av fett i lever og kropp. Hvis det er ønskelig å bremse veksthastigheten bør man undersøke effekten av ulike fôringsstrategier.
- Varierende innhold av fett og karbohydrater ved konstant proteinnivå i fôr til rognkjeks ga ingen forskjell i motstandsevne mot atypisk *A. salmonicida*.
- God kondisjon er viktig for berggyllt som skal stå i sjø ved lave temperaturer.
- Skinnhelse hos berggyllt ser ut til påvirkes negativt av lav temperatur.

## 7 Leveranser

Tabell 18 Tabellen viser leveranser i løpet av prosjektperioden.

Dato	Leveranse	Kommentar
18.10.2019	Oppstartsmøte med referat	
02.12.2019	Statusrapport til FHF	
24.04.2020	Møte med referansegruppen	
14.12.2020	Statusrapport til FHF	
01.03.2021	Faktaark AP2	
10.06.2021	Statusrapport til FHF	
24.06.2021	Avviksrapport til FHF	
07.12.2021	Avviksrapport til FHF	
28.02.2022	2 manuskripter under bearbeiding, AP2 og AP3	
28.02.2022	Sluttrapporter til FHF	
<b>Ikke levert:</b>		
Januar 2020	Presentasjon på Lusekonferansen 2020	Avlyst pga. covid-19
Januar 2020	Faktaark	Utsatt pga. covid-19
Juni 2020	FHF dialogmøte - presentasjon av resultater	Avlyst pga. covid-19
September 2020	Populærvitenskapelig presentasjon	Utsatt
September 2020	Presentasjon på EAS konferansen 2020	Avlyst pga. covid-19

## 8 Referanser

- Berge G.M., Ytteborg E., Østbye T.K., Sund H., Rud I., Sveen L., Bæverfjord G., Karlsen C., Krasnov A., Øgaard J., Sundell K., Pedersen M., Halvorsen H. & Ruyter B. (2019), Ernærings betydning for skinn-, tarm. og gjellehelse hos laks. Rapport 17/2019, Nofima, Ås. (FHF-prosjekt 901265)
- Bligh, E.C. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8), 911-917.
- SAS/STAT Software. Version 13.2 of the SAS System for Windows. Copyright © 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.