



OPTIMAL ERNÆRING FOR LAKS I FERSKVANN FOR Å ØKE FISKENS ROBUSTHET, OVERLEVELSE OG VEKST ETTER OVERFØRING TIL SJØ

Sluttrapport til FHF

Interne forfattere: Nini Sissener, Marit Espe, Kaja Skjærven, Sofie Remø, Elisabeth Holen, Antony Prabhu, Kristin Hamre, Per Gunnar Fjelldal
Eksterne forfattere: Erik Høglund, Christina Sørensen, Vibeke Vikeså, S. Subramanian

Tittel (norsk og engelsk):

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

Optimal nutrition for salmon in freshwater to increase the robustness, survival and growth of the fish after transfer to seawater

Rapportserie:
FHF sluttrapport

Nr.-År:
x-2020

Dato:
05.10.2020

Distribusjon: Åpen (etter
05.04.2020)

Interne forfattere:

Nini Sissener, Marit Espe, Kaja Skjærven, Sofie Remø, Elisabeth Holen, Antony Prabhu, Kristin Hamre, Per Gunnar Fjelldal

Prosjektnr.:
15177

Oppdragsgiver(e):
FHF

Eksterne forfattere:

Erik Høglund, Christina Sørensen, Vibeke Vikeså, S. Subramanian

Oppdragsgivers referanse:
901431

Redaktør:

Nini H. Sissener

Program:
Program for Fiskeernæring

Kontaktperson:

Nini H. Sissener

Forskningsgruppe:
Behov og Velferd

Godkjent av:

Rune Waagbø

Antall sider totalt:
51

Sammendrag (norsk):

Hovedmålet med prosjektet var å gi ny kunnskap om hva som er optimal ernæring for laks i ferskvannsfasen for å få en robust smolt, og dermed potensielt bidra til å redusere tapet i tidlig sjøvannsfase. En slik reduksjon vil kunne gi stor gevinst både i forhold til dyrevelferd, omdømme og økonomi for oppdrettsnæringen. Norsk lakseoppdrett har et tap i sjøvannsfasen på 16-17%, der en stor andel av dette tapet skjer rett etter overføring til sjøvann. Det er mulig at disse problemene kan relateres til suboptimal ernæring i ferskvannsfasen. Siden fôr volumet i denne fasen er relativt lite, er det muligheter for at små investeringer i bedre fôr i denne fasen kan gi stor avkastning i form av forbedret fiskevelferd, vekst og overlevelse i seinere produksjonsstadier.

Prosjektet bestod av fem arbeidspakker; der den første innebar å føre fisken i ferskvannsfasen (fra ~15 -90 g) med syv ulike fôr; et tilnærmet kommersielt fôr som kontroll, og seks eksperimentelle fôr der



vi endrer henholdsvis fetttsyresammensetning eller elektrolyttbalanse, tilsetter høyere nivåer av utvalgte aminosyrer eller B-vitaminer, eller en kombinasjon av disse. Fisken ble pit-tagget og satt på et felles kommersielt fôr ved overføring til sjøvann, og ble deretter brukt videre i arbeidspakke 2-5. I arbeidspakke 2 undersøkte vi fiskens osmoreguleringsevne og stress-respons i forbindelse med sjøvannsoverføring ved tre ulike temperaturer (8, 12 og 16°C), og om fôrene gitt i ferskvannsfasen har noen innvirkning på dette. I arbeidspakke 3 ble fisken satt ut i merder i sjø for å teste hvordan fisk gitt de ulike fôrene i ferskvannsfasen takler dette ift miljøvariasjoner og suboptimale betingelser, stress, lusepåslag og smittepress. I arbeidspakke 4 ble fisk fra tre av fôringsgruppene utfordret i et smitteforsøk med SAV3 (viruset som forårsaker pankreassykdom), for å se hvordan ernæringsstatus påvirker immunrespons, sykdomsforløp og regenerering av vev. I arbeidspakke 5 studerte vi fiskens immunrespons i cellemodell (hodenyreceller isolert fra fisken i fôringsforsøket), eksponert for bakteriell og virus-mimikk.

Hovedresultatene fra prosjektet viste ikke positive effekter på robusthet, overlevelse og vekst av de testede endringene av fôret sammenlignet med et kontrollfôr med tilsvarende sammensetning som et gjennomsnittlig kommersielt fôr, noe som tilsier at dette fôret allerede var bra nok. Imidlertid tydet resultatene fra smitteforsøket med pankreassykdom og uttesting av immunrespons i hodeceller, på at aminosyredietten kan ha en gunstig effekt på fiskens immunrespons og motstandsdyktighet mot sykdom, selv om det var snakk om relativt små forskjeller som akkurat ikke var signifikante i smitteforsøket.

Alle fôrgruppene taklet overgangen til sjøvann bra, men direkte overføring fra 12 til 8 °C kan ikke anbefales basert på resultatene våre, da dette første til økt dødelighet samt redusert mukuslag og mer sår og skjelltap. Vi viste at det er stor variasjon i elektrolyttbalansen i kommersielle norske fôr for laks i ferskvann, og det er tydelig at endring av elektrolyttbalansen i ferskvannsfôr for laks påvirker både osmoregulering og mineralmetabolisme, men mer kunnskap trengs for å kunne gi klare anbefalinger her.

Summary (English):

The main aim of this project was to generate new knowledge regarding what is optimal nutrition for salmon in the freshwater phase to produce a robust smolt, and hence contribute to reducing the loss of fish in the early seawater phase. Such a reduction would greatly benefit both the animal welfare and the reputation and economy of the aquaculture industry. Norwegian salmon farming has a loss of 16-17% during the seawater production cycle, where a large proportion of this loss happens in the period after seawater transfer. These problems could possibly be related to suboptimal nutrition in the freshwater phase. As the feed volumes used in this phase are limited, small investments in better

feed during this period could potentially lead to large improvements in fish health, growth and survival at later production stages.

This project consisted of five work packages (WP); where the first involved feeding the fish in the freshwater phase (from ~15 -90 g) with seven different feeds; one close to an average commercial feed as a control feed, and six experimental feeds with changes in the fatty acid composition or electrolyte balance, or where extra amino acids or B-vitamins are added, respectively, or a combination of these changes. All fish were pit-tagged and fed a common commercial feed after transfer to seawater, and were then used in WP 2-5. In WP 2 we investigated the osmoregulatory ability and the stress response of the fish during seawater transfer at three different temperatures (8, 12 and 16°C), and if the freshwater feeds affected this. In WP3 the fish were transferred to seawater in open net pens to test how the fish groups handled this, including varying environmental conditions, stress and suboptimal conditions. In WP4, fish from three of the feeding groups were challenged with SAV3 (the virus causing pancreas disease), to see how nutritional status affects immune response, progression of the disease and regeneration of tissue. In WP 5 we studied the immune response of the fish in a cell model (head kidney cells isolated from the fish in the feeding trial), exposed for bacterial and viral mimic.

The main results of the project did not show positive effects on robustness, survival and growth of the tested changes of the feed compared to the control diet similar to an average commercial feed, indicating that such a diet was already sufficient. However, the results from the PD challenge and the cell studies did indicate that the amino acid diet could have a positive impact on the immune response of the fish and how it handles disease, although the differences were relatively small and only close to significant for the challenge trial.

All the feed groups handled the transfer to seawater well, but direct transfer from 12 to 8 °C is not recommended based on our results, as this caused increased mortality as well as reduced mucus layer and more wounds and scale loss. We showed that there is large variation in the electrolyte balance found in commercial feeds, and that changing this balance in the freshwater stage affects both osmoregulation and mineral metabolism, but more knowledge is needed to make clear recommendations in this area.

Innhold

1	Faglig bakgrunn for prosjektet.....	6
2	Prosjektorganisering	9
3	Problemstilling og formål	11
4	Prosjektgjennomføring	13
5	Resultater og diskusjon	18
6	Hovedfunn.....	46
7	Leveranser	47
8	Referanser	48

I Faglig bakgrunn for prosjektet

Dødeligheten i sjøvannsfasen i norsk lakseproduksjon ligger på 16-17% (Hjeltnes et al., 2016), og en stor andel av dette tapet forekommer i perioden like etter sjøvannsoverføring. Dette kan tyde på at dødeligheten er assosiert med dårlig smoltkvalitet og suboptimale forhold i ferskvannsfasen. Å oppfylle fiskens ernæringsbehov er essensielt for god smoltkvalitet. Dermed kan det å optimalisere ernæringen i ferskvannsfasen potensielt skape en mer robust smolt som er bedre rustet til å takle overgangen til sjøvann. Sammenlignet med sjøvannsfasen er volumene av fôr som brukes små i ferskvannsfasen, dermed kan relativt små investeringer i fôret i ferskvannsfasen potensielt bidra til økt fiskevelferd, samt bedret vekst og overlevelse i seinere stadier. Effektene av suboptimal ernæring kan også først avdekkes når fisken utsettes for utfordrende betingelser, sånn som transport, håndtering av fisken, overføring fra ferskvann til sjøvann, varierende miljøforhold og eksponering for sykdomsfremkallende patogener. Sjøvannsoverføring er i seg selv en stressende opplevelse for fisken, og dødlighet i tidlig fase i sjøvann kan ofte relateres til problemer med tilpasningen til sjøvann (Hjeltnes et al., 2016). Det har blitt vist at ferskvannsfôret kan påvirke stressresponsen ved sjøvannsoverføring (Jutfelt et al., 2007). Suboptimal ernæring kan, sammen med andre faktorer, gi produksjonslidelser sånn som katarakt og beindeforviteter (Hansen et al., 2010, Bjerkås et al., 2006). Studier har vist at fôret gitt i ferskvann kan predisponere fisken for utvikling av katarakt i seinere livsstadier (Waagbø et al., 2004, Sissener et al., 2016), mens beindeforviteter kan oppstå i alle livsstadier (Fjelldal et al., 2012).

Det er flere mulige mekanismer for hvordan ferskvannsfôret kan påvirke smoltifiseringen og hvordan det går med fisken etter overføring til sjø. En vellykket smoltifisering avhenger av en eneræringsstatus og energilagre over et visst nivå (Thorpe et al., 1998), og spesifikke næringsstoffer kan påvirke fiskens evne til å osmoregulere etter overføring til sjøvann (Bell et al., 1997, Tocher et al., 2000, Perry et al., 2006). Dette vil igjen påvirke hvor lang tid det tar før fisken får igjen appetitten og begynner å vokse igjen etter overføring. I tillegg til fiskens lager av næringsstoff være påvirket av fôret i ferskvannsfasen over en lengre periode etter overføring. For eksempel er det nødvendig med en 7-ganger økning av kroppsvekten før kroppssammensetningen av enkelte fettsyrer gjenspeiler sammensetningen av fôret (Rosenlund et al., 2016).

Kommersielle fôr som gis i ferskvannsfasen har generelt et høyt innhold av fiskemel og fiskeolje og dermed et høyt innhold av de langkjedede omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3). Selv om dette har vært vanlig praksis i mange år, er dette svært

ulikt den naturlige føden til vill laks på dette livsstadiet. De største forskjellene er at føden til vill laks i ferskvann inneholder høyere arakidonsyre (ARA, 20:4n-6), høyere alfa-linolensyre (ALA, 18:3n-3) og mindre DHA enn det som er i de kommersielle fôrene (Bell et al., 1994, Ghioni et al., 1996). Spesielt ARA spiller antakelig en viktig rolle i smoltifiseringsprosessen, siden innholdet av denne fettsyren nesten doblet seg i lever og gjeller hos laks i perioden opp mot smoltifisering (Bell et al., 1997). Å bruke planteolje (som har noen fellestrekk med ferskvanns evertebrater sammenlignet med fiskeolje) har gitt noen positive resultater, sånn som redusert plasma klorid etter overføring til sjøvann, hvilket indikerer bedre osmoregulering (Bell et al., 1997, Tocher et al., 2000).

Vitaminer og aminosyrer i fôret er spesielt viktige i perioder med rask vekst, som byggesteiner for peptider og proteiner, og som del av nucleotidsyntese og DNA metylering (Andersen et al., 2016, Wu, 2010, Xu et al., 2016). Spesielt metionin og B-vitaminene folat, B6 og B12 er viktige i biologiske metyleringsreaksjoner, inkludert epigenetisk regulering av genuttrykk. Mangel på disse næringsstoffene i sensitive utviklingsstadier, sånn som smoltifiseringen, kan ha langvarige fenotypiske effekter. Plante proteiner som brukes mye av i laksefôr, som soya og erterproteinkonsentrat, er generelt lave på metionin, taurin, lysin og B-vitaminer, og disse næringsstoffene må da tilsettes i fôret. Et nylig EU-prosjekt (ARRAINA), viste at de praktiske behovene i plantebaserte fôr for B-vitaminene folat, B12 og B6 var betydelig høyere enn det som er publisert tidligere (Hemre et al., 2016, NRC, 2011), og det å også tilsette ekstra metionin over tidligere anbefalinger økte fiskens vekstpotensiale etter sjøvannsoverføring (Espe et al. 2020). Vår hypotese er at gjeldende anbefalinger (NRC, 2011) ikke er tilstrekkelige for metionin, taurine, threonine, lysine og B-vitaminer i ferskvannsfasen for Atlantisk laks.

Et aspekt ved fôr som det til nå har vært lite fokus på når det gjelder fisk er elektrolyttbalansen i fôret, dvs balansen mellom monovalent kationer og anioner. Dette påvirker også syre-base balansen i fôret. Det er vist tidligere at det å berike fôret med salt økte overlevelsen etter sjøvannsoverføring hos salmonider (Zaugg, 1982, Staurnes and Finstad, 2000, Pellertier and Besner, 1992, Salman and Eddy, 1990). De få studiene som har blitt gjort i fisk viser at elektrolyttbalansen kan påvirke fôrintak, energibalanse, vekst og utnyttelse av næringsstoffer (Chiu et al., 1984, Chiu et al., 1988).

Etter sjøvannsoverføring testes fiskens robusthet på ulike områder, både ved at vi undersøker stressrespons og osmoreguleringsevne like etter sjøvannsoverføring, at fisken overføres til sjøvann ved ulike temperaturer uten akklimatisering for å gjøre overgangen mer stressende, at fisken settes ut i åpne merder i sjø med de variasjoner i miljøforhold osv som det innebærer, samt at fiskens immunrespons settes på prøve både ved å studere immunrespons i cellemodell og i et in vivo

smitteforsøk med pankreassykdom. En av de største årsakene til tap av laksefisk i sjøvannsfasen i Norge er virussykdommer, deriblant pankreassykdom (PD) som er forårsaket av salmonid alphavirus (SAV) (Sommerset et al., 2020). SAV angriper pankreas, hjerte og muskel hos laks, og syk fisk viser tegn til unormal svømmeadferd, mister appetitt, får redusert vekst og kondisjonsfaktor (Jansen et al., 2017). De kombinerte effektene på dødelighet, vekst, fôrutnyttelse og kvalitet fører til store økonomiske konsekvenser (Aunsmo et al., 2010) og representerer en vesentlig velferdsutfordring i oppdrett. Potensialet i å styrke fisken gjennom å bedre ernæringsstatusen i ferskvann kan derfor være en relevant strategi for å øke robusthet mot denne sykdommen.

Siden fôrkostnaden i ferskvannsfasen er relativt lav, kan tilsetninger/endringer i fôret som er beskrevet over være svært lønnsomme dersom de fører til bedret fiskevelferd, vekst og overlevelse i sjøvannsfasen.

2 Prosjektorganisering

Opprinnelig ble prosjektet søkt av NIFES, med HI som den største samarbeidspartneren, men etter fusjonen mellom NIFES og HI 1.jan 2018 er det HI som har stått både for prosjektledelse og mesteparten av forskningsarbeidet i dette prosjektet. NIVA har vært involvert i en mindre rolle på stressrespons, men Skretting ARC har vært involvert på fôrformulering og produksjon. Prosjektet har hatt en styringsgruppe utnevnt av FHF.

Prosjektgruppe:

Havforskningsinstituttet:

Nini Sissener, prosjektleder og hovedansvarlig for fett

Marit Espe, hovedansvarlig aminosyrer

Kaja Skjærven, hovedansvarlig B-vitaminer

Sofie Remø, hovedansvarlig smitteforsøk og katarakt

Elisabeth Holen, hovedansvarlig celleforsøk

Antony Prabhu, hovedansvarlig elektrolyttbalanse

Kristin Hamre, hovedansvarlig redokspotensiale

Per Gunnar Fjelldal, hovedansvarlig deformiteter

I tillegg har flere ved HI bidratt med ekspertise eller analyser, på uttak osv, inkludert.: Miao Linghong, Eva Mykkeltvedt, Chandrasekar Selvam, Mark Powell, Hedda Skjold, Søren Grove, Craig Morton, Stig Mæhle, Ingrid U. Fiksdal, Dawit Ghebretnsae, Joachim Nordbø. M. Chen, Whatmore P, Fernandes J.M.O, Oveland E

NIVA:

Erik Høglund og Christina Sørensen, fokus på stressrespons etter sjøvannsoverføring

Skretting ARC:

V. Vikeså og S. Subramanian

Styringsgruppe:

Arne Guttvik – Salmar

Ragna Heggebø – Mowi (tidligere i prosjektperioden: Øyvind Oaland)

Lisbeth Martinsen – Norway Royal Salmon (tidligere i prosjektperioden: Merete Schrøder)

Torolf Storsul- Midtnorsk Havbruk (skiftet jobb mot slutten av prosjektperioden, ble ikke erstattet i styringsgruppen da det var såpass kort tid igjen av prosjektet).

3 Problemstilling og formål

Hovedmål:

Studere hvordan ferskvannsfôrets sammensetning av fettsyrer, aminosyrer, B-vitaminer og elektrolyttbalanse påvirker robusthet, overlevelse og vekst hos Atlantisk laks etter overføring til sjøvann.

Delmål:

- Finne ut hvordan ferskvannsfôret påvirker osmoregulering og stressrespons etter overføring til sjøvann ved ulike temperaturer.
- Finne ut om ferskvannsfôret påvirker vekstregulering, metabolisme og redoxregulering etter sjøvannsoverføring.
- Finne ut om tidlig programmering gjennom DNA metylering kan forklare disse forskjellene.
- Finne ut om fiskevelferd relatert til katarakt og beindeforviteter i sjøvann ved ulike temperaturer påvirkes av ferskvannsfôret.
- Finne ut om ferskvannsfôret påvirker vekst, overlevelse og robusthet i laks overført til sjøvann i åpne merder.
- Finne ut om ferskvannsfôret påvirker inflammasjon, immunrespons, sykdomsforløp og regenerering av vev etter SAV-smitte i sjøvann.
- Finne ut i cellemodeller om ferskvannsfôret påvirker evne til å takle infeksjoner og stress.

Prosjektets effektmål

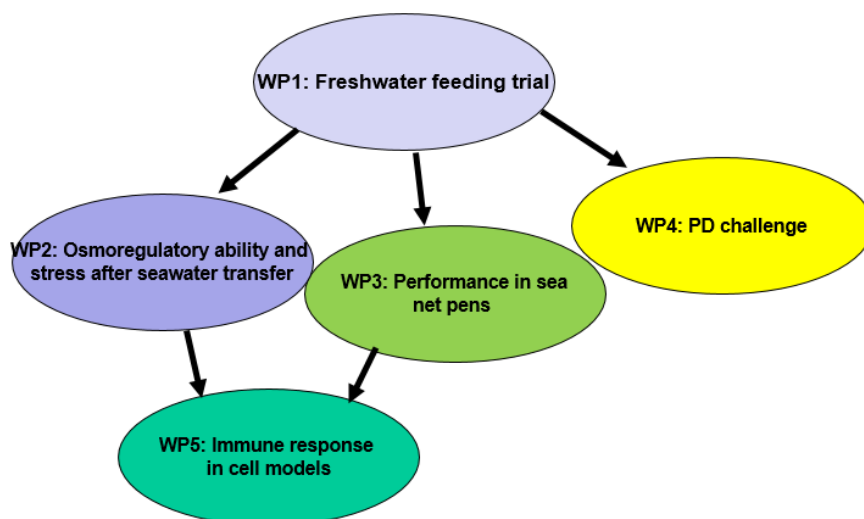
Atlantisk laks er den dominerende arten i norsk havbruk. Dødelighet, målt som antall fisk som ikke lever til innhøsting ved overføring til sjø i norsk laksenæring er i størrelsesorden 15-18%. Dette representerer et betydelig økonomisk tap for havbruksnæringen. Flere studier indikerer at ubalansert nærings sammensetning i fôret er av stor betydning for fiskens helse og robusthet. Det foreslåtte prosjektet har som mål å optimalisere sammensetningen av ferskvannsfôret for Atlantisk laks for å øke robusthet, overlevelse og vekst i sjøvannsfasen, noe som vil kunne gi bedre fiskevelferd og økt lønnsomhet. Selv om flere av de potensielle forbedringene av ferskvannsfôret som skal testes ut antakelig vil føre til noe økte fôrkostander i denne fasen, er det relativt sett veldig små volumer av fôr det er snakk om, og kostnaden vil dermed raskt kunne kompenseres om man oppnår økt vekst og helse og redusert tap i sjøvannsfasen.

Prosjektets resultatmål

Statusrapporter til FHF og gjennomføring av møter med prosjekt- og styringsgruppe samt innsending av referat fra disse møtene er gjennomført til oppsatte frister. Den faglige sluttrapporten inneholder en oversikt over resultatene som er fremkommet i prosjektet, og arbeidet med vitenskapelige artikler basert på disse resultatene er pågående. En detaljert oversikt over referanser finnes i kapittel 7.

4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet bestod av 5 arbeidspakker, der den første arbeidspakken (WP1) var gjennomføring av fôringsforsøk i ferskvann med 7 ulike eksperimentelle fôr, mens de påfølgende arbeidspakkene hadde som mål å teste ulike aspekter ved fiskens robusthet etter overføring til sjøvann (Figur 1). I arbeidspakke 2 så vi på fiskens osmoreguleringsevne og stressrespons etter sjøvannsoverføring på ulike vanntemperaturer, arbeidspakke 3 gikk i åpne merder i sjø, arbeidspakke 4 var et smittetest med pankreassykdom og arbeidspakke 5 så på immunrespons i cellemodell (hodenyreceller isolert fra laks fra ulike diettgrupper på ulike tidspunkt i forsøket). I sjøvann gikk fisken fra alle de opprinnelige diettgruppene i samme kar og fikk det samme kommersielle fôret, men alt fisk var pit-merket slik at den kunne spores tilbake til hvilket fôr den hadde fått i ferskvannsfasen.



Figur 1. De fem arbeidspakkene i prosjektet, der den første ble gjennomført i ferskvannsfasen med ulike fôr, mens de øvrige ble gjennomført i sjøvannsfasen for å se på effektene av ferskvannsfôret her.

Nivåer i kommersielle fôr av B-vitaminer og elektrolytter:

Da det var usikkert hvor nivåene av B-vitaminer og elektrolytter lå i dagens kommersielle ferskvannsfôr, ble det gjort en undersøkelse på dette i forkant av formulering av forsøksfôrene. 13 kommersielle fôr fra ulike aktører ble analysert, disse kom fra fôrovervåkningsprogrammet som HI har ansvar for, samt fra Skretting.

Fôrformulering og produksjon:

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

Forsøksfôrene ble formulert som vist i tabell 1, og ble produsert i to batcher med ulik pelletstørrelse (2mm og 3mm; 2mm er vist i tabellen under, mens det ble gjort små justeringer av protein- og fettnivå for 3mm, tilsvarende hva som brukes kommersielt for fiskestørrelsen). Kontrollfôret ble formulert for å være så likt som mulig til et gjennomsnittlig kommersielt fôr til Atlantisk laks på dette livsstadiet, basert på data tilgjengelig fra fôrovervåkningsprogrammet gjennomført av HI. I de andre fôrene ble enten fettsyreprofilen endret (Fatty acid diet), utvalgte aminosyrer ble tilsatt (Amino Acid diet), nivå av noen B-vitaminer samt methionin ble økt (B-vitamin-diet/1C-diet), alle disse endringene ble gjennomført samtidig (Combined diet) eller elektrolyttbalansen ble endret (henholdsvis redusert og økt i diettene dEB- og dEB+). Tilsats av aminosyrer, B-vitaminer og saltene brukt for å justere elektrolyttbalansen ble balansert med hvete, mens kontroll og fettsyrediетten kun var forskjellige på oljeblandingen. Alle fôrene ble formulert og produsert av Skretting ARC. Nivået av fiskemel ble holdt konstant på 25% av resepten i alle fôrene.

Tabell 1. Fôrformulering, g 100 g⁻¹ av de syv eksperimentelle fôrene som ble brukt til laks i dette prosjektet i siste del av ferskvannsfasen og fram til sjøvannsoverføring.

	Control	Fatty acid	Amino acid	B-vitamin	Combined	dEB-	dEB+
Wheat ¹	18.88	18.90	16.54	17.85	16.52	16.53	17.57
Wheat gluten ²	3.50	3.49	3.39	3.68	3.39	3.91	3.73
Soy protein concentrate ³	26.45	26.45	26.45	26.45	26.45	26.45	26.45
Pea protein concentrate ⁴	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Fish meal ⁵	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Rapeseed oil ³	4.56	3.96	4.57	4.48	3.86	4.57	4.56
Fish oil ⁶	9.97	0.00	10.03	10.03	0.00	10.00	9.99
Palm oil ⁷	0.000	2.677	0.000	0.000	2.837	0.000	0.000
Linseed oil ⁸	0.000	2.374	0.000	0.000	2.389	0.000	0.000
EPA conc-incomega ⁹	0.000	4.326	0.000	0.000	4.326	0.000	0.000
ARA conc.CABIO ¹⁰	0.000	1.187	0.002	0.032	1.187	0.000	0.000
Water	0.724	0.721	1.012	0.836	1.012	0.987	0.875
Taurine ¹¹	0.13	0.13	0.33	0.13	0.33	0.13	0.13
DL-Methionine ¹²	0.000	0.000	0.680	0.674	0.680	0.000	0.000
L-Lysine ¹³	0.636	0.636	1.289	0.638	1.289	0.640	0.638
L-Threonine ¹⁴	0.064	0.064	0.585	0.065	0.585	0.065	0.065

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

Calcium chloride	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.625	0.000
Sodium carbonate	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	0.90
Vit B6 ¹⁴	0.010	0.010	0.010	0.022	0.022	0.010	0.010
Vit B12 ¹⁴	0.014	0.014	0.014	0.036	0.036	0.014	0.014
Folate ¹⁴	0.003	0.003	0.003	0.008	0.008	0.003	0.003
NRC vitamin premix ¹⁴	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Mineral premix ¹⁴	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Yttrium premix ¹⁴	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Astaxanthin 10% ¹⁵	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.100	0.100
Other microingredients	0.712	0.695	0.736	0.719	0.719	0.757	0.769

¹Fiskå mølle, ²Cargill Nordic AS, ³European Commodity Company S.A., ⁴AM Nutrition, ⁵Norsildmel, ⁶P/F Havsbrun, ⁷Aarhus Karlshamn, ⁸Linagro, ⁹Croda, ¹⁰Cabio Biotech, ¹¹Orffa, ¹²Evonic Nutrition and Care GmbH, ¹³Meihua Group International Trading, ¹⁴Trouw Nutrition Nederland BW, ¹⁵Divi's laboratories Europe B.V.

Fôringsforsøk i ferskvann:

Forsøket ble gjennomført med Atlantisk laks (Aquagen) på Matre forskningsstasjon (HI). All fisk ble individuelt pit-tagget med microtransponders (RFID tags; Trac Id Systems) før forsøket, ved en størrelse på ~15g. Fisken ble tilfeldig fordelt i 21 fiberglass kar (1x1 m) og akklimatisert i 2 uker før forsøksstart. Under forsøket ble hvert av de 7 fôrene gitt til triplikate kar. Fisken hadde en startvekt på 36.0 g (SD 4.3), og ble fôret i ferskvann i 10 uker fra 20. august til 28. oktober 2018. Fisken hadde blitt eksponert for kontinuerlig lys før forsøket, og under forsøket ble det brukt 12L:12D fotoperiode i 6 uker etterfulgt av 24L:0D (kontinuerlig lys) i 4 uker for å indusere smoltifisering. Vannstrømmen i karene ble tilpasset slik at oksygenmetningen i vannet ut av karet ble holdt over 80%. Temperaturen ble holdt konstant på 12°C. Fisken ble fôret i lysperioden når det var LD12:12-regime, og fôret kontinuerlig når det var kontinuerlig lys. Prøveuttak ble gjennomført ved avslutning av ferskvannsfasen.

Overføring til sjøvann og prøvetaking etter 1 timer og 24 timer:

Fisken ble overført til sjøvann ved tre ulike temperaturer, 8, 12 and 16 °C, uten akklimatisering. 24 fisk fra hver diettgruppe ble overført til hver temperaturene i triplikate kar (fôrgruppene ble blandet, og ble prøvetatt etter 1 time eller 24 timer i sjøvann (12 fisk per diettgruppe og tidspunkt). Separate kar ble brukt for fisken som skulle prøvetas 1 time og 24 timer etter overføring, for å hindre ekstra stressing av fisken som skulle prøvetas etter 24 timer. Fisk ble overført fra ferskvann og over i hvert av

saltvannskarene med gitte tidsintervaller, for å muliggjøre uttak nøyaktig 1 time og 24 timer etter overføring av hvert kar. Fisken ble bedøvd, og det ble tatt vekt og lengde, samt blodprøver, gjelleprøver og hjerne.

Temperaturforsøk i sjøvann (kar):

72 fisk fra hver diettgruppe ble overført til sjøvann på tre ulike temperaturer (8, 12 °C and 16 °C) i duplikate kar (2 kar per temperatur, 12 fisk fra hver diettgruppe i hvert kar). Disse ble gitt det samme kommersielle fôret (Skretting Supreme) i 6 uker. Saliniteten var 34 ppt, vannstrømmen ble tilpasset for å holde oksygenmetningen over 80%, fotoperioden var 24t lys og fisken ble kontinuerlig fôret *ad libitum*. Ved avslutning etter 6 uker ble det tatt blod og organprøver, homogenisert helfiskprøver, scoret karatarakt og gjort røngten av ryggrad for å se på deformiteter (Witten et al., 2009).

Forsøk i åpne merder:

Fisken som skulle settes ut i åpne merder ble vaksinert (PharmagMicro 6) 3 uker før sjøvannsoverføring. 90 fisk per diettgruppe ble overført til sjøvann (34 ppt) i 1x1 m kar (ett kar per diettgruppe) ved 9°C i 4 dagen, før overføring til merder. Tre merder på 5x5 m (7m dybde) ble brukt, der hver inneholdt en miks av de opprinnelige diettgruppene fra ferskvannsforsøket. All fisken ble gitt det samme kommersielle fôret (Skretting Supreme), og det var naturlig fotoperiode og vanntemperatur. Miljødata ble målt på 5m dyp. Vanntemperaturen gikk ned i løpet av forsøket, men gjennomsnittstemperatur på 12.1°C (SD 0.7) i november, 10.6°C (SD 1.2) i desember, mens temperaturen var ganske lik i januar og februar med et gjennomsnitt på 7.3°C (SD 0.4). Saliniteten holdt seg jevnt gjennom perioden, med et gjennomsnitt på 30.9 ppt (SD 1.9). 24. januar (to uker før sluttuttaket) gjennomførte vi en pumping av all fisken for å simulere situasjonen i kommersielt oppdrett, med stadig håndtering og stressing av fisken pga avlusning osv. En Vaki fiskepumpe ble brukt, og all fisken ble trengt sammen i en liten del av merden før den ble pumpet gjennom en 30 m lang slange og tilbake ut i merden. Å bli pumpet gjennom slangen tok ca 20 sekunder per fisk (med litt individuell variasjon avhengig av hvor mye hver fisk svømte mot strømmen), mens det tok ca 12 minutter å pumpe all fisken i en merd.

Merdforsøket ble avsluttet 5. Februar, 14 uker etter sjøvannsoverføring. Ved sluttuttaket ble det gjort velferdsscoreing av all fisken, inkludert evaluering av skinn, finner, øyne, kjeve og lus. Speilberg scoring ble gjort for bieffekter av vaksine, og 50 fisk per gruppe ble scoret for katarakt.

Smitteforsøk med PD:

Fisken som inngikk i smitteforsøket ble de siste 10 ukene i ferskvann gitt tre ulike dietter (WP1): en kommersielt relevant diett, eller dietter der enten fettsyresammensetningen (FA fôret) eller aminosyresammensetningen (AA fôret) ble endret. For FA fôret ønsket vi å undersøke om en diett nærere det laks spiser i naturen kan være en fordel under en infeksjon og for aminosyrefôret ville vi undersøke om aminosyrene gjennom sine ulike funksjonelle egenskaper kunne gi bedre beskyttelse.

For å undersøke mulige forskjeller i mottakelighet ble fisken ble smittet med en badsmittemodell basert på (Jarungsriapisit, 2016), der de ble badet i vann som inneholdt SAV3, noe som simulerer naturlig smittevei. Smittet fisk ble fordelt på triplikate kar, mens usmittet kontrollfisk ble holdt i «common garden» i tre kar. Smitteforsøket varte i 56 dager, og prøver ble tatt ut dag 7, 14, 21, 35 og 56. Ved hvert uttak ble det tatt prøver av 6 fisk per kar (totalt 18 per fôrgruppe) fra smittet fisk og 2 fisk per diett per kar for kontrollfisk (totalt 6 fisk per fôrgruppe). Under smitteforsøket fikk alle gruppene det samme kommersielle fôret.

Celleforsøk:

I denne *in vitro* studien, som var en del av den FHF finansierte hovedstudien (Sissener et al. 2020) ble det høstet laks ved slutten av ferskvannsfasen - en uke etter overføring av sjøvann – ved seks uker i sjøvann og etter 8 ukers pågående Pancreas Disease (PD)-infeksjon. Ved hver fase ble hodenyrer isolert fra 6 fisk per diett, og fra disse ble leukocytter isolert for *in vitro*-dyrking. Leukocytene fra hver fisk ble dyrket hver for seg i brønner og stimulert av LPS (*lipopolysaccharide*) eller PIC (*polyinosinic: polycytidylic acid*) for å provosere frem en bakteriell eller virusindusert betennelse *in vitro*. Dette vil kunne si noe om diettene i ferskvannsfasen kan modulere immuncellenes evne til å transkribere gener under infeksjoner.

5 Resultater og diskusjon

Fôrsammensetning

Alle fôrene hadde relativt like nivåer av makronæringsstoffer og energi, og var kun forskjellige på de tingene som var planlagt i forsøksdesignet (Tabell 2).

Tabell 2. Fôranalyser. 2mm pellets (3 mm pellets i parentes). Hvert tall er gjennomsnittet av to analytiske paralleller. “ - ” betyr at parameteren ikke ble analysert i det aktuelle fôret.

	Control	Fatty acid	Amino acid	B-vitamin	Combined	dEB+	dEB-
<i>Proximate composition:</i>							
Protein	46 (46)	46 (44)	46 (46)	46 (44)	47 (46)	45 (44)	46 (46)
Lipid	19.0 (19.0)	18.3 (18.8)	18.8 (18.6)	18.8 (18.7)	19.0 (18.9)	19.0 (18.7)	19.3 (18.7)
Energy, kJ g ⁻¹	21.8 (21.7)	21.7 (21.3)	21.7 (21.6)	21.8 (21.5)	21.7 (21.8)	21.4 (21.3)	21.7 (21.7)
Ash	6.2 (6.1)	6.2 (5.8)	6.1 (6.1)	6.2 (6.2)	6.2 (6.3)	7.2 (7.1)	7.0 (7.1)
Dry matter	93 (93)	93 (91)	92 (92)	93 (92)	93 (93)	93 (92)	94 (93)
<i>Fatty acids. % of total fatty acids:</i>							
16:0	13.1 (12.7)	11.3 (11.0)	-	-	-	-	-
Sum SFA	19.7 (19.7)	16.3 (16.3)	-	-	-	-	-
18:1n-9	27.4 (27.3)	24.4 (24.3)	-	-	-	-	-
22:1n-11	6.2 (6.9)	2.1 (1.9)	-	-	-	-	-
Sum MUFA	46.9 (45.6)	32.3 (31.2)	-	-	-	-	-
18:2n-6	10.1 (10.0)	11.7 (11.7)	-	-	-	-	-
20:4n-6 (ARA)	0.4 (0.4)	3.9 (4.2)	-	-	-	-	-
Sum n-6	10.9 (10.8)	16.5 (16.9)	-	-	-	-	-
18:3n-3	4.0 (4.1)	10.2 (10.3)	-	-	-	-	-
20:5n-3 (EPA)	5.7 (5.6)	15.8 (15.9)	-	-	-	-	-
22:6n-3 (DHA)	8.3 (7.8)	5.5 (5.5)	-	-	-	-	-
Sum n-3	20.7 (21.1)	33.9 (34.6)	-	-	-	-	-
Sum PUFA	31.8 (32.2)	50.3 (51.4)	-	-	-	-	-
<i>Amino acids, mg g⁻¹:</i>							
Taurine	3.5 (3.2)	-	5.2 (5.0)	-	-	-	-
Methionine	8.5 (8.1)	-	14.6 (14.0)	-*	-	-	-
Lysine	32 (33)	-	38 (37)	-	-	-	-
Threonine	18.2 (17.6)	-	22.7 (21.8)	-	-	-	-
<i>B-vitamins, mg kg⁻¹:</i>							
Vit B6	9.3 (9.4)	-	-	17 (19)	-	-	-
Vit B12	0.22 (0.20)	-	-	0.42 (0.37)	-	-	-
Folate	3.2 (4.1)	-	-	6.9 (8.5)	-	-	-
<i>dEB (mEq):</i>	237 (217)	-	-	-	-	-25 (-46)	383 (382)

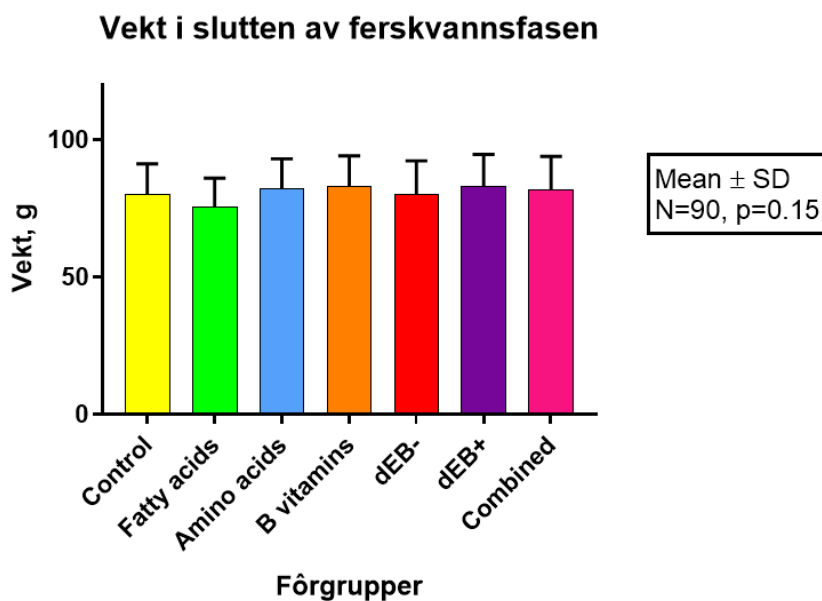
Sum SFA inkluderer 14:0. 15:0. 17:0. 18:0. 20:0. 22:0. sum MUFA inkluderer 16:1n-9. 18:1n-1. 18:1n-7. 20:1n-11. 20:1n-9. 20:1n-7. 22:1n-11. 22:1n-9. 24:1n-9. sum n-6 inkluderer 18:3n-6. 20:2n-6. 20:3n-6. 22:5n-6. sum n-3

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

inkluderer 18:4n-3, 20:4n-3, 21:5n-3, 22:5n-3, 24:5n-3. *Methionin ble tilsatt i same nivå til B-vitaminfôret som i aminosyrefôret.

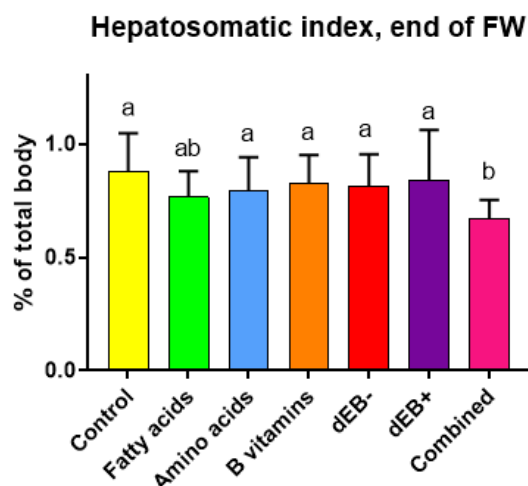
Vekst og kroppssammensetning i ferskvannsfasen

Ved slutten av ferskvannsperioden hadde fisken mer enn doblet vekten mens den gikk på forsøksfôrene. Det var en trend mot forskjell i sluttvekt ($p=0.15$, Figur 2), mens p-verdiene for både vektøkning og spesifikk vekstrate var høyere (dvs lengre unna å være signifikante) pga små, usignifikante forskjeller i startvekt. Det var ingen signifikante forskjeller på kondisjonsfaktor og lengde mellom gruppene (data ikke vist). Fisk gitt fettsyredietten hadde numerisk lavest vekt ved slutten av ferskvannsfasen, men det var også en sterk kareffekt, der spesielt ett kar gitt dette fôret presterte dårlig. Da kombinert dietten hadde akkurat samme fettsyresammensetning som fettsyredietten, men ingen tendenser til dårlig vekst, er det lite sannsynlig at dette kan tilskrives fettsyresammensetningen i fôret. Det var heller ingen forskjeller i vekst etter henholdsvis 6 uker og 3 måneder i sjøvann.



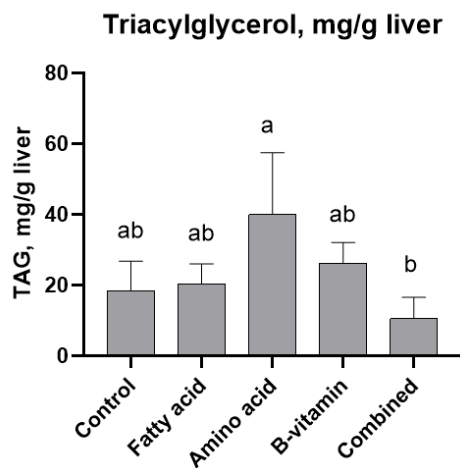
Figur 2. Sluttvekt etter 10 ukers fôring i ferskvannsfasen.

Størrelsen av leveren relativt til hele kroppen (leverindeks) var signifikant lavere for kombinert gruppen enn for kontrollgruppen, aminosyregruppen og B-vitamingruppen, mens fettsyregruppen lå midt imellom (Figur 3). Tilsvarende mønster så vi for viscerosomatisk indeks (vekt av indre organer relativt til total vekt), bare at her lå både kontrollgruppen og fettsyregruppen midt i mellom. Hjerteindeks var lik for alle gruppene.



Figur 3. Lever indeks ved slutten av fôringsperioden i ferskvann.

Lipidklasser i lever ble analysert i fem av diettgruppene, og viste at kombinertgruppen hadde det laveste nivået av lagringsfett (triacylglycerol) av alle gruppene, men det var stor variasjon i dataene og kombinertgruppen var kun signifikant ulik aminosyregruppen (Figure 4). Kroppssammensetningen (protein, fett og tørrstoff) var lik i alle gruppene ved avslutning av ferskvannsfasen.

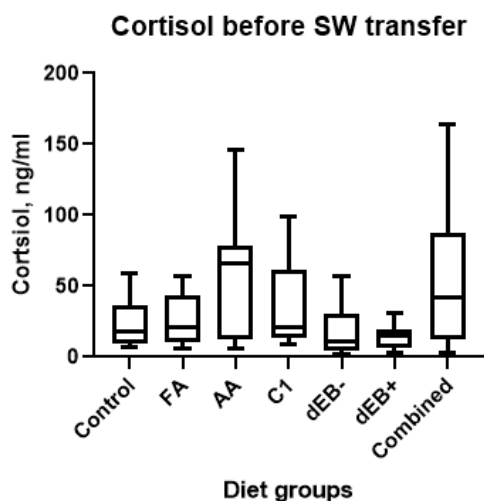


Figur 4. Lagringsfett (triacylglycerol, TAG) i lever fra Atlantisk laks gitt fem av de eksperimentelle fôrene, ved slutten av ferskvannsfasen. Grafen viser gjennomsnitt og standard avvik (n=3), og bokstavene viser hvilke grupper som er signifikant ulike ($p > 0.05$).

Stressrespons etter overføring til sjøvann

Kortisolverdiene før sjøvannsoverføring var svært variable med store kareffekter, der spesielt to kar fra aminosyrefôret og ett kar fra kombinertfôret hadde høye kortisolverdier av en størrelsesorden

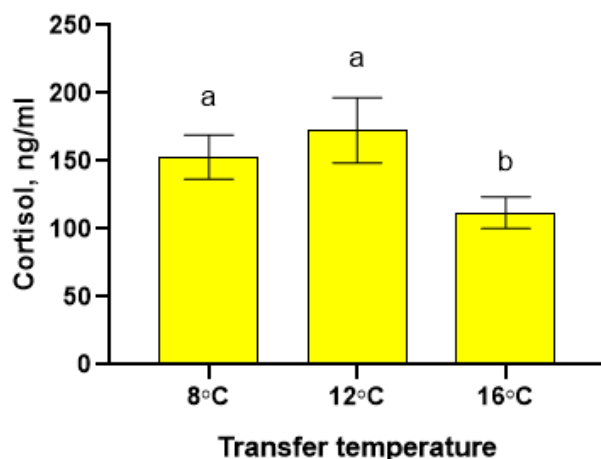
som normalt assosieres med akutt stress (Figur 5). Allikevel var det en klar økning i kortisol i alle gruppene 1 time etter sjøvannsoverføring, sammenlignet med før.



Figur 5. Plasma kortisol i fisk fra de ulike diettgruppene før sjøvannsoverføring. Siden det var stor variasjon i dataene og de ikke var normalfordelte, vises de som box-plot som angir median, samt minimum og maksimumsverdier

Det var også en signifikant temperatureffekt, der fisk overført til 16 °C hadde signifikant lavere plasma kortisol 1 time etter overføring enn fisk overført til 8 eller 12 °C (Figur 6). 24 timer etter overføring til sjøvann var kortisolverdiene tilbake på samme nivå som før overføring.

Cortisol 1h after SW transfer (Mean&95%CI)



Figur 6. Kortisolverdier i plasma 1 t etter sjøvannsoverføring. Siden det ikke var forskjeller mellom diettgruppene, er disse slått sammen i figuren.

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

Når det gjelder 5-HIAA/5-HT ratioen i hjerne (markør på neuroendokrin stress-respons), var det ingen forskjeller verken mellom diettgruppene, før og etter sjøvannsoverføring eller mellom fisken som ble overført på ulike temperaturer (Tabell 3).

Tabell 3. 5-HIAA/5-HT ratio i hjernestammen på laksesmolt gitt de ulike førene i ferskvannsfasen, fra prøver tatt like før sjøvannsoverføring, samt 1 time og 24 timer etter sjøvannsoverføring. Data er oppgitt som ng ml⁻¹ og er gjennomsnitt og standard avvik, n=12 per diettgruppe og temperatur.

	Kontrollfôr	Kombinertfôr
Før overføring	1.30 (3.45)	0.24 (0.10)
1 t etter, 8°C	0.37 (0.14)	0.32 (0.09)
1 t etter, 12°C	0.33 (0.08)	0.28 (0.16)
1 t etter, 16°C	1.35 (3.43)	0.36 (0.19)
24 t etter, 8°C	0.38 (0.20)	0.28 (0.12)
24 t etter, 12°C	0.26 (0.17)	0.39 (0.23)
24 t etter, 16°C	0.25 (0.13)	0.28 (0.09)

Redoksstatus

Redoksstatus ble analysert for alle gruppene i ferskvannsfasen, men kun for kontrolldietten og kombinertdietten 24 t og 6 uker etter sjøvannsoverføring (tabell 4). Ved slutten av ferskvannsperioden var det ikke noen forskjeller mellom diettgruppene i redoksmarkører. 24 t etter sjøvannsoverføring var det forskjell mellom de to gruppene som ble analysert, der GSH i muskel var høyere i fisk gitt kontrollfôret ($p=0.001$). Redokspotensialet (E) var også høyere ($p=0.04$) i denne gruppa. Det var ingen effekt på GSSG (Table 6) og vanntemperatur ved overføring hadde heller ingen påvirkning. I lever var det ingen forskjeller mellom diettgruppene. I desember (6 uker etter sjøvannsoverføring) var GSH og GSSG høyere enn tidligere i forsøket, mens leveren også var mer redusert (dvs redusert redokspotensiale). I muskel var det ingen tydelige forskjeller mellom uttakstidspunktene.

Tabell 4. Redoksstatus ved slutten av ferskvannsfasen, samt 24 t og 6 uker etter sjøvannsoverføring (gjennomsnitt \pm SD, n=9-18) All gruppene ble analysert i ferskvann, men kun kontroll og kombinertgruppen i sjøvann. Der det ikke er forskjeller mellom diettgruppene er disse vist samlet for å vise forskjellene mellom de tre uttakstidspunktene.

	GSH μ mol/g	GSSG μ mol/g	E mV
Lever			
Ferskvann	2190 (540) ^b	8.2 (1.8) ^b	-233 (7) ^a
24t	2340 (470) ^b	9.6 (1.7) ^b	-233 (5) ^a
6 uker	3990 (590) ^a	11.6 (2.1) ^a	-244 (5) ^b

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

Muskel

Ferskvann	375 (34) ^b	5.3 (1.3)	-196 (3) ^b
24t diett A	490 (45) ^a	2.7 (1.2)	-213 (11) ^a
24t diett G	384 (67) ^b	3.0 (1.4)	-204 (6) ^{ab}
6 uker	337 (74) ^b	3.0 (0.5)	-199 (6) ^b

Osmoregulering etter sjøvannsoverføring

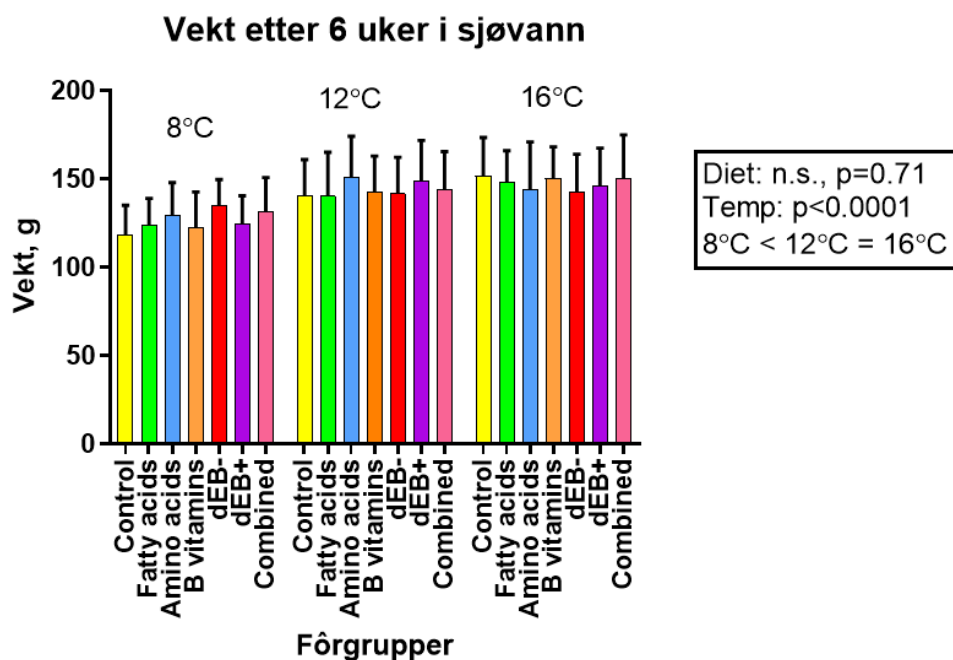
Før sjøvannsoverføring var plasma klorid signifikant lavere i fisk som hadde fått kontrollfôret sammenlignet med aminosyrefôret ($p=0.006$, Tabell 5), mens de andre gruppene lå midt i mellom. 24 t etter sjøvannsoverføring var det ingen fôreffekt på kloridnivåer, kun en temperatureffekt, der kloridnivåene var høyere i fisk som ble overført til sjøvann på 16 °C sammenlignet med fisk overført ved 8 og 12 °C ($p<0.0001$). Kloridnivåene i plasma var svært like før og etter sjøvannsoverføring, noe som indikerer en god smoltifisert fisk som taklet overgangen til sjøvann bra.

Tabell 5. Plasma klorid (mmol L^{-1} , gjennomsnitt og standardavvik) i fisk prøvetatt før sjøvannsoverføring og 24 t etter overføring ved 8, 12 and 16 °C. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller.

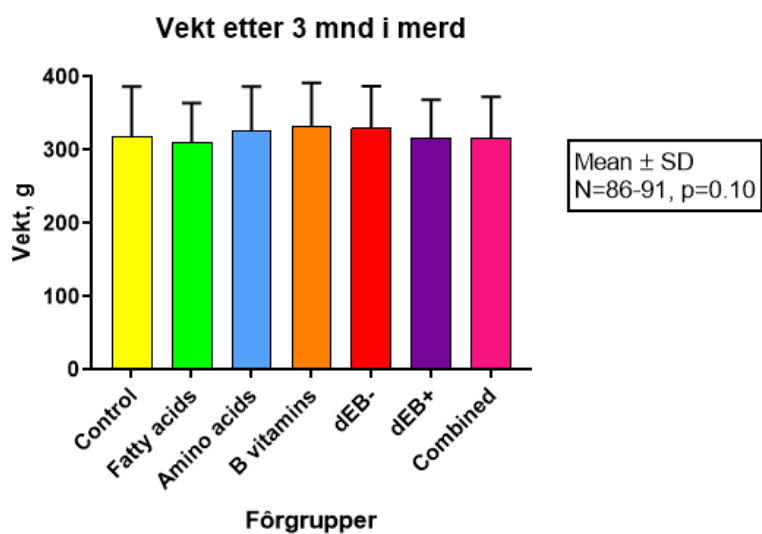
	Kontroll	Fettsyre	Aminosyre	B-vitamin	Kombinert
Før overføring	124.7 (4.7) ^a	125.5 (3.4) ^{ab}	129.8 (3.0) ^b	126.8 (2.9) ^{ab}	128.2 (3.2) ^{ab}
24 t etter, 8°C	126.2 (2.7)	127.5 (4.8)	128.3 (4.4)	124.0 (4.4)	126.1 (3.3)
24 t etter, 12°C	127.7 (4.9)	128.3 (5.6)	127.1 (2.8)	124.0 (3.4)	126.0 (3.7)
24 t etter, 16°C	130.7 (4.8)	131.0 (2.9)	129.7 (3.5)	130.7 (3.3)	130.3 (4.0)

Vekst og kroppssammensetning i sjøvannsfasen

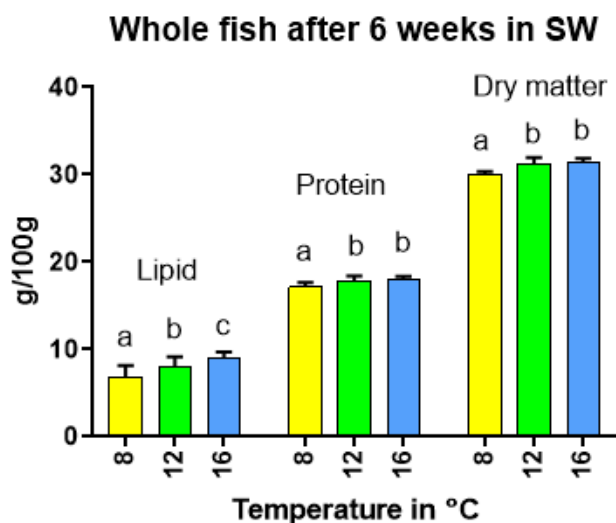
Fiskens vekt og lengde etter 6 uker i sjøvann på felles kommersielt fôr, var lik mellom alle de opprinnelige fôrgruppene fra ferskvannsfasen, men var høyere ved 12 og 16 °C sammenlignet med 8 °C (Figure 7). Tilsvarende var det ingen forskjeller i sluttvekt etter 3 måneder i sjø i merdforsøket (Figur 8). De var ingen forskjeller i organindekser mellom fôrgruppene, verken etter 6 uker eller 3 måneder i sjø. Det var heller ingen effekt av fôrgruppene på kroppssammensetning etter 6 uker i sjøvann, mens temperatur hadde signifikant effekt på både fett, protein og tørrstoff (alle $p>0.0001$, Figur 9).



Figur 7. Sluttvekt etter 6 uker i sjøvann, for de 7 opprinnelig fôrgruppene på tre ulike vanntemperaturer.



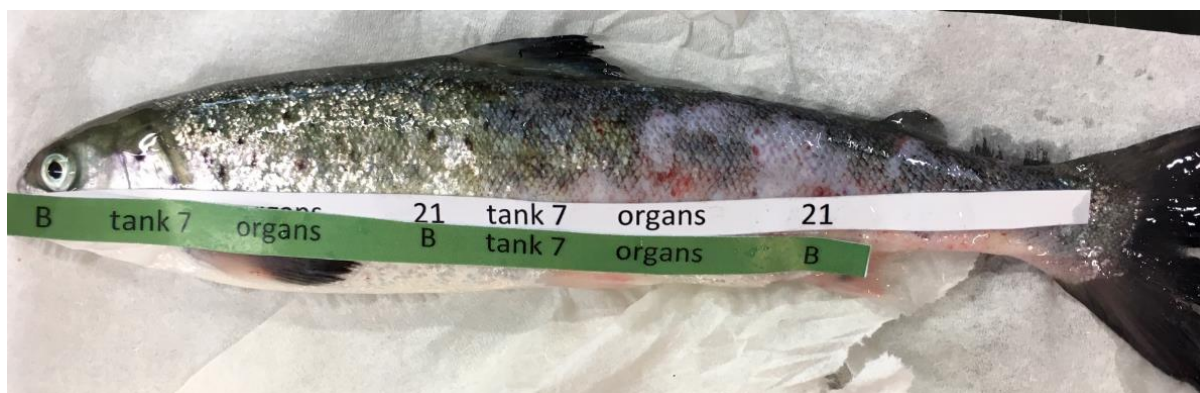
Figur 8. Sluttvekt etter 3 måneder i sjø i åpne merder for de 7 opprinnelige fôrgruppene.



Figur 9. Kroppssammensetning til fisken etter 6 uker i sjøvann. Da det ikke var forskjeller mellom de opprinnelige fôrgruppene, er disse slått sammen i grafen for å vise temperaturforskjellene.

Overlevelse, velferd og produksjonslidelser i sjøvannsfasen

Mot slutten av temperaturforsøket i sjøvann var det noe dødelighet. Denne var ganske jevnt fordelt mellom fôrgruppene (0-3 fisk per gruppe), men all var i kar holdt på 8 °C. Ved sluttuttaket ble det observert at fisken som ble holdt på 8 °C hadde svært redusert mukuslag, og de hadde også mye sår og skjelltap sammenlignet med fisk fra de andre temperaturene (Figur 10). Dette var tilfelle med så og si all fisk i 8 °C karene, uten noen forskjeller mellom de opprinnelige fôrgruppene. Det anses som svært sannsynlig at dette var årsaken til dødeligheten som ble sett på denne temperaturen, og at dødeligheten ville økt ytterligere dersom forsøket hadde gått lengre enn 6 uker, da all dødeligheten kom i den siste uka før avslutning av forsøket.

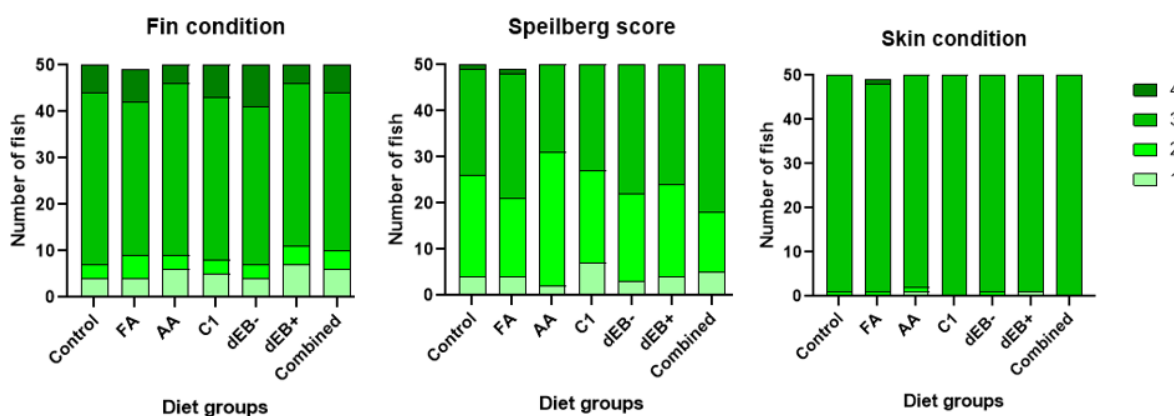


Figur 10. Bilde av fisk overført direkte til 8 °C sjøvann (fra 12 °C i ferskvann) uten akklimatisering. Disse fiskene hadde mye skjelltap, sår og et synlig redusert mukuslag sammenlignet med fisk på de andre temperaturene.

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

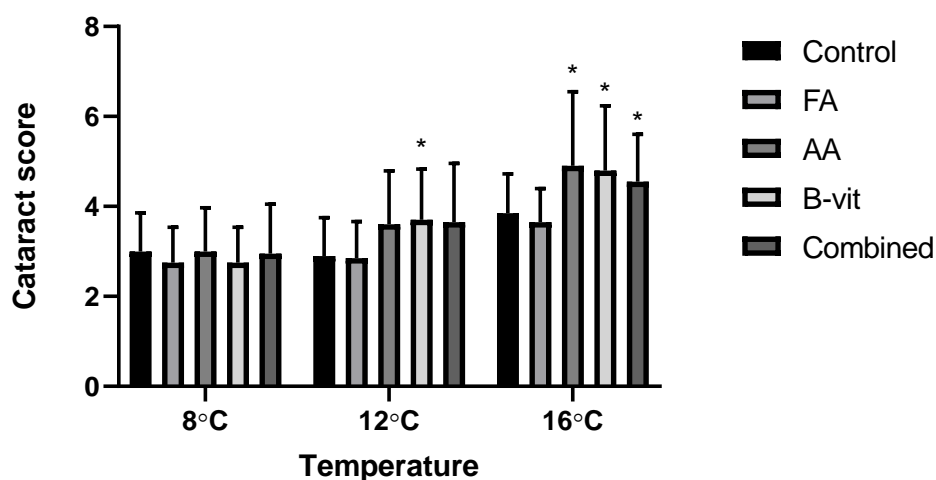
I sjøvannsforsøket som gikk i åpne merder var det svært lav dødelighet i alle grupper, på tross av pumpingen som ble gjennomført 2 uker før sluttuttaket for å stresser fisken. Her var gjennomsnittstemperaturen i vannet 12 grader den første måneden etter sjøvannsoverføring, og gikk gradvis ned etter det, dermed samsvarer dette bra med at vi heller ikke så dødelighet ved 12°C i det 6-ukers temperaturforsøket. Dette viser at man bør være forsiktig med å overføre fisk til sjøvann med stor temperaturforskjell fra hva fisken har gått på i ferskvann, spesielt dersom temperaturen i sjøvann er lavere.

Det var ikke signifikante forskjeller i deformiteter mellom gruppene etter 6 uker i sjøvann (data ikke vist), og det var heller ingen forskjeller i velferdsscore mellom gruppene etter 3 måneder i åpne merder i sjøvann (Figur 11).



Figur 11. Velferdsscore for fisk fra de 7 opprinnelige diettgruppene etter 3 måneder i åpne merder i sjøvann på felles kommersielt fôr.

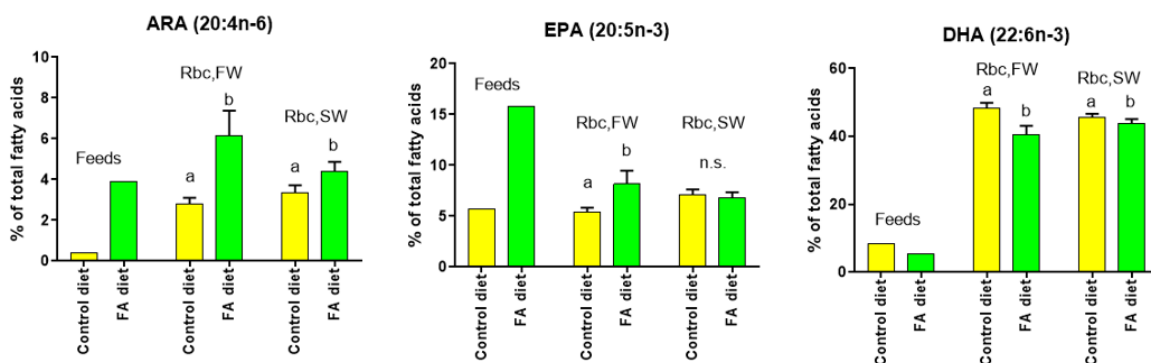
Når det gjelder kataraktscore var det noen små forskjeller mellom diettgruppene. 6 uker etter sjøvannsoverføring så vi en tydelig effekt temperatur, der høyere vanntemperatur ga økt kataraktutvikling, og dietteffekter kom også kun fram ved høyere temperaturer (Figur 12). Ved 12°C var kun B-vitamingruppen signifikant forskjellig fra kontroll (selv om både AA, B-vit og kombinertgruppen viste samme tendens), mens ved 16°C hadde alle disse tre diettgruppene signifikant høyere kataraktscore enn kontrollgruppen. Dette har vi ikke en god forklaring på.



Figur 12. Kataraktscore etter 6 uker i sjøvann ved ulike temperaturer.

Effekter av endret fetttsyresammensetning i fôret

Fetttsyresammensetning i fisken reflekterte til dels forskjellene i fôret ved avslutning av ferskvannsfasen og vedvarte for noen fettsyrer også 6 uker etter sjøvannsoverføring. I røde blodceller (rbc) var innholdet av ARA (i % av fettsyrene) høyere enn i fôret for begge diettgrupper, og selv om forskjellen i vev var noe redusert ift forskjellen i fôr, var det fortsatt ca dobbelt så mye ARA i rbc fra fisk som hadde fått fettstyredietten (Figur 13). Etter 6 uker i sjøvann på felles kommersielt fôr var det fortsatt signifikant forskjell i ARA-innhold mellom gruppene. Når det gjelder EPA var det motsatt, dvs at innholdet i rbc var lavere enn innholdet i fôret. Også her var det forskjell mellom gruppene etter ferskvannsfasen som gjenspeilet forskjellene i fôret, men etter 6 uker i sjøvann var det ikke lengre forskjell. DHA var svært oppkonsentrert i rbc sammenlignet med innhold i fôret, og forskjellen i fôret ble gjenspeilet i rbc både etter ferskvannsfasen og etter 6 uker i sjøvann. Dette tyder på at eventuelle helseeffekter av fetttsyresammensetningen i ferskvannsfôret vil vare en god stund inn i sjøvannsfasen, da det tar lang tid å endre sammensetningen av vevene etter endring av fôr.

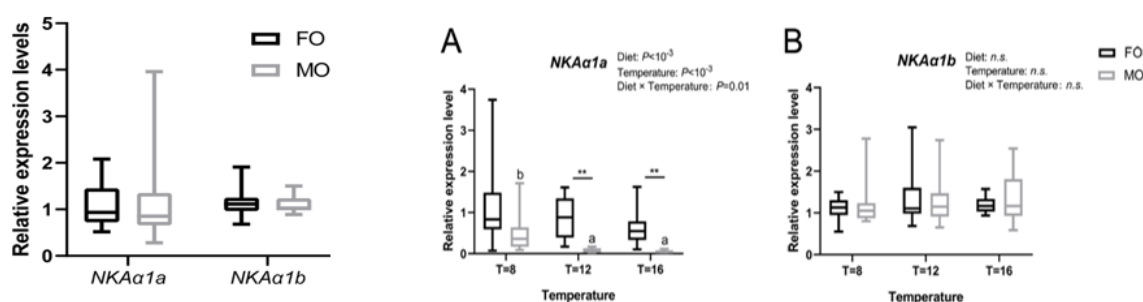


Figur 13. ARA, EPA og DHA i henholdsvis ferskvannsfôret (til venstre), i røde blodceller etter 10 ukers fôring i ferskvann (midten) og 6 uker etter sjøvannsoverføring på felles kommersielt fôr (høyre).

Det ble også gjort analyser av genuttrykk i gjelleprøver fra fisk gitt kontrollfôret og fettisyrefôret, både før sjøvannsoverføring og 24 timer etter. For to ulike isoformer av Natrium Kalium ATPase (som ofte brukes som en markør på at fisken har tilpasset seg sjøvann og osmoregulerer som den skal) var genuttrykket likt mellom diettgruppene før sjøvannsoverføring, mens etter sjøvannsoverføring var det lavere uttrykk av den ene isoformen i fisk som hadde fått endret fettisyresammensetning, mens uttrykk av den andre isoformen var lik (Figur 14).

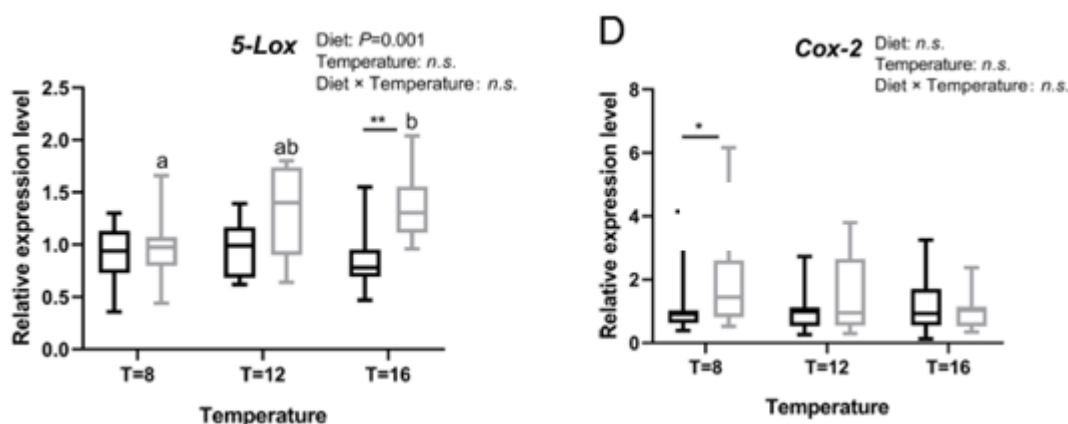
FW:

24 h after SW transfer:



Figur 14. Genuttrykk i gjeller av to ulike isoformer av Natrium Kalium ATPase i fisk gitt kontrollfôret (med innhold av fiskeolje, kalt FO i figuren), og fisk gitt fettisyrefôret (med modifisert oljemiks, kalt MO i figuren), både før sjøvannsoverføring og 24 timer etter sjøvannsoverføring ved tre ulike temperaturer.

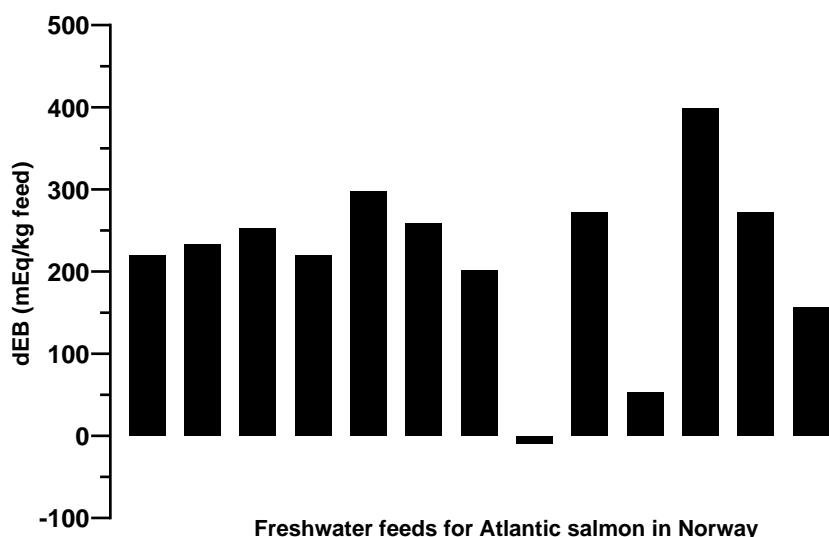
Genuttrykk av 5-LOX og COX-2 (enzymer som bidrar til dannelsen av eikosanoider) var også likt mellom de to diettgruppene i slutten av ferskvannsfasen (data ikke vist), men forskjellene først oppstod 24 timer etter sjøvannsoverføring (Figur 15). Uttrykk av 5-Lox økte med økende vanntemperatur, og lå også generelt høyere i fisk som hadde fått fettisyrefôret (signifikant forskjell ved 16 °C). For Cox-2 var det ingen temperaturforskjell, og kun forskjell mellom diettgruppene ved 8 °C.



Figur 15. Genuttrykk av 5-Lox og Cox-2 i gjeller fra fisk gitt kontroldietten (i svart) og fettisyredietten (i grått), 24 timer etter overføring til sjøvann på tre ulike temperaturer.

Elektrolyttbalanse i fôret

Smoltifisering er en fysiologisk prosess der lakseparr i ferskvann tilegner seg egenskapene som trengs for å leve i saltvann og blir til smolt. Smoltifisering i produksjon av laks induseres normal ved å manipulere daglengden (fotoperioden). Alternativt eksisterer det også regimer der man induserer smoltifisering ved å tilsette salt i fôret. Denne strategien har fått mye oppmerksomhet i det siste, og man har hatt suksess med å benytte en kombinasjon av lys og fôr. Det å tilsette store mengder salt (ca. 4-6%) for å sette i gang smoltifisering vil påvirke fôrets elektrolyttbalanse. Vi undersøkte elektrolyttbalansen i ulike kommersielle ferskvannsfôr (n=13) fra ulike fôrprodusenter i Norge (fra fôrovervåkningsprogrammet). Resultatene viste stor variasjon i fôrets elektrolyttbalanse (dEB) fra -10 til 400 mEq/kg fôr (Figur 16).

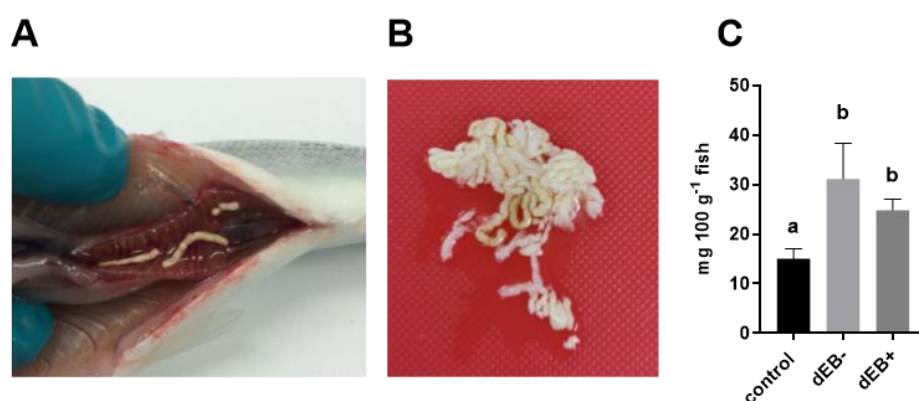


Figur 16: Elektrolyttbalansen (mEq/kg feed) i 13 ulike kommersielle norske ferskvannsfôr for laks.

Ubalanse i elektrolytter fra fôret kan påvirke flere fysiologiske prosesser i fisken, sånn som fordøyelse, osmoregulering, syre-base balanse, metabolisme av næringsstoffer osv. Selv om smoltifiseringen i seg selv har fungert bra i salt-basert smoltifiseringsstrategi (enten alene eller i kombinasjon med lys), er konsekvensene av denne strategien for næringsstoffmetabolisme og fiskevelferd i den påfølgende sjøvannsfasen lite undersøkt. For å undersøke dette, lagde i fôr med svært ulik elektrolyttbalanse (dEB- og dEB+) tilsvarende de minimale og maksimale nivåene (-50 and 400 mEq/kg fôr) vi fant i de kommersielle fôrene, og sammenlignet dette med et kontrollfôr som lå på 250 mEq/kg fôr (medianen av de kommersielle fôrene).

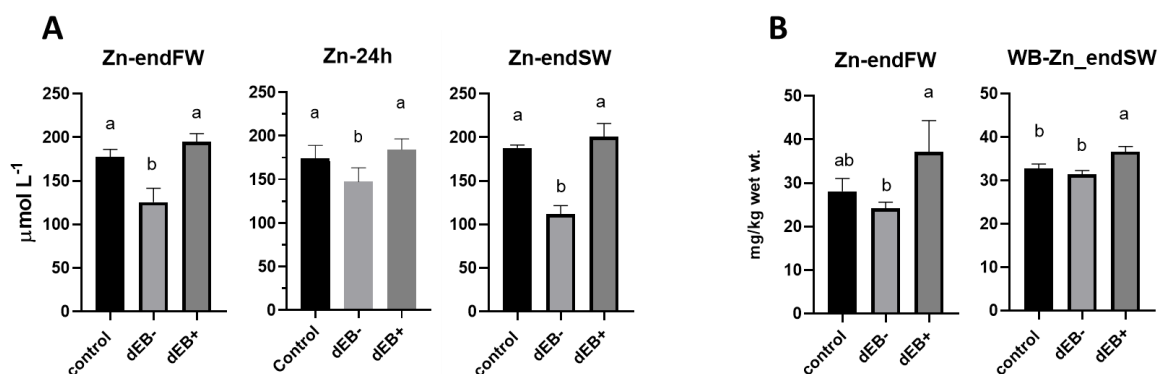
Når laksesmolt overføres til sjøvann har vi ulike biokjemiske markører som ofte brukes for å måle om fisken er klar for sjøvannsoverføring, som elektrolytter i plasma (natrium og klorid) og uttykket av

natrium kalium ATPase enzym i gjellene. Fisk som ble fôret med høy elektrolyttbalanse (dEB+) i ferskvann hadde høyere uttrykk av natrium kalium ATPase (isoform 1b) i gjellene og høyere nivå av natrium og klorid i plasma, noe som indikerer en bedre hypo-osmotisk ioneregulering og homeostase. Videre var mengden av persipitert kalsium magnesium karbonat i mage-tarm kanalen høyere i begge fôrene med manipulert elektrolyttbalanse (dEB+ og dEB-) sammenlignet med kontrollfôret (Fig 17). Dette er et tegn på effektiv utskillelse av divalente ioner (Ca and Mg) i tarmkanalen som et resultat av at fisken drikker sjøvann.



Figur 17: Persipitert kalsium magnesium i mage-tarm kanalen til laks 24 timer etter sjøvannsoverføring (A); oppsamlet for kvantifisering (B); mengde persipitat normalisert til fiskevekt i de tre fôrgruppene.

Konsentrasjonen av sink i plasma, både ved slutten av ferskvannsfasen og 24 timer og 6 uker etter sjøvannsoverføring, var høyere i dEB+ gruppen enn dEB- gruppen. Det samme mønsteret så vi i sink innhold i helkropp både ved avslutning av ferskvannsfasen og 6 uker etter sjøvannsoverføring (Fig. 18, det ble ikke tatt prøver av helkropp 24 timer etter overføring). Mens effekten av dEB- med å redusere sink absorpsjon var forventet pga tilsetningen av kalsium klorid i dette fôret, er det et nytt og interessant funn at denne effekten vedvarte etter 6 uker på same fôr etter sjøvannsoverføring. Dette demonstrerer at dEB i ferskvannsfôret påvirker metabolismen av sink både i ferskvannsfasen og etter sjøvannsoverføring.



Figur 18: Plasma Zn konsentrasjon (A) og Zn konsentrasjon i hel kropp (B) av Atlantisk laks før og etter sjøvannsoverføring.

Konklusjoner, elektrolyttbalanse:

Det er stor variasjon i elektrolyttbalansen i kommersielle norske fôr for laks i ferskvann, og det er tydelig at endring av elektrolyttbalansen i ferskvannsfôr for laks påvirker både osmoregulering og mineralmetabolisme. Absorpsjon og retensjon av sink (Zn) påvirkes av dEB balansen i ferskvannsfôret både når fisken er i ferskvann, og etter at den er overført til sjøvann og går på felles fôr.

AA diett og B-vitaminsdiett

Dietter bestående av en tilnærmet kommersiell diett (kontroll diett) ble sammenlignet med en diett som var tilsatt krystallinsk metionin, threonin, lysin og taurin (AA diett) og en diett som var tilsatt samme mengde metionin som AA dietten, men ble i tillegg tilsatt B6, B12 og folat (1C diett) (Tabell 2), for å undersøke om dette hadde innvirkning på vekst og metabolisme. I AA dietten ble metionin og taurin ble tilsatt da metionin inngår i 1-C metabolismen (Obeid, 2013) og er kjent for å påvirke metabolismen og føre til fettleverutvikling om de er lave (Espe et al., 2010). Taurin bedret også levercellenes overlevelse når den ble tilsatt i mediene i et *in vitro* forsøk med primære leverceller isolert fra laks (Espe and Holen, 2013). Threonin er kjent for å være viktig for mucindannelsen og er rapportert å bedre tarmhelsen hos fisk (Yang og Liao, 2019). Lysin ble tilsatt da den er viktig for proteinsyntesen, men er også en komponent i carnitinsyntesen (Arslan, 2006), og kan således være involvert i utvikling av fettlever. Vi har tidligere funnet at lavt nivå av lysin i fôr til laks fører til utvikling av fettlever (Espe et al., 2007). I 1C dietten ble metionin, B6, B12 og folat tilsatt da alle deltar i 1C metabolismen (og kan derfor påvirke fettlever, metyleringen og tilgangen på metylgrupper for

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

metabolismen (Skjaerven et al., 2018). Både aminosyretilsetning og tilsetning av vitaminene kan da ha en effekt på overlevelsen, samt bedret vekst (Espe et al., 2020) fra ferskvann til saltvann i laks.

I dette forsøket var det ingen vekstforskjeller eller forskjeller i proteindeponering hos laks gitt noen av diettene. Vi fant ikke tegn til økt leverstørrelse hos laks gitt noen av disse tre diettene, som indikerer at nivåene for å hindre utvikling av fettlever var tilfredsstillende i kontrolldietten. Dette ble bekreftet av at det ikke var noen økning i TAG i leveren. Det ble likevel funnet en økning i fosfolipider i leveren til den fisken som hadde fått 1C dietten tilsatt metionin og B-vitaminer sammenlignet med den som fikk kontrolldietten, men de som fikk aminosyredietten var generelt lik begge diettene (Tabell 6).

Tabell 6. Lipidklasser i leveren (mg/g vev).

	Kontrolldiett	AA diett	1C diett	ANOVA
Phosphatidylcholine	29.3 ± 1.0 ^a	33.1 ± 1.8 ^{ab}	37.1 ± 1.9 ^b	p=0.03
Phosphatidylserine	2.5 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.1 ^b	3.0 ± 0.1 ^b	p=0.035
Phosphatidylinositol	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	n.s.
Phosphatidylethanolamine	7.7 ± 0.1 ^a	8.5 ± 0.2 ^b	9.0 ± 0.0 ^b	p=0.026
Diacylglycerol	0.4 ± 0.0 ^a	0.8 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^{ab}	p=0.04
Cholesterol	4.5 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.2 ± 0.2	n.s.
Free fatty acids	0.1 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	0.3 ± 0.1 ^{ab}	p=0.027
Triacylglycerol	18.4 ± 4.9	40.0 ± 10.1	26.3 ± 3.3	n.s. (p=0.15)
Sum phospholipids	47.2 ± 1.3 ^a	53.0 ± 2.0 ^{ab}	57.8 ± 2.2 ^b	p=0.017
Sum neutral lipids	23.4 ± 4.8	46.2 ± 10.2	32.6 ± 3.2	n.s. (p=0.13)
Sum lipids	70.6 ± 4.1	99.2 ± 10.5	90.4 ± 1.8	n.s. (p=0.05)

Verdier er samleprøver fra hvert kar, n=3

Heller ikke nivået av oksidasjonsstatus var forskjellig mellom fisk gitt de ulike fôrene. N-metabolitter i lever og muskel er vist i Tabell 7 og 8. Hverken muskel lysin eller threonin var påvirket av fôrene, mens lever lysin og threonin var lavere i de som hadde blitt gitt 1C dietten. Lever hos fisk gitt ekstra metionin viste små endringer i N-metabolitter assosiert med 1C metabolismen. Bare cystationin økte i muskelen når metionin var tilsatt i fôrene, mens glycin, som forbrukes i 1C metabolismen, var lavere i disse to diettene. I leveren var taurin og cystationin likt i alle diettene, mens fri lysin, glycin, serin og threonin var lavere i leveren til laks gitt AA-fôret og 1C fôret.

Tabell 7. Frie Aminosyrer og N metabolitter i lever (µmol/100g). Verdier er gjennomsnitt ± SE, n=3

	Control diet	AA diet	1C diet	p-values
--	--------------	---------	---------	----------

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

Thr	345.4±22.8a	297.8±8.5a	207.6±9.9b	0.002
Lys	491.5±34.5a	388.6±6.1b	251.0±11.4c	0.0006
Met	206.7±10.3a	165.7±10.3a	108.3±10.3b	0.001
Gly	544.0±14.0a	467.7±14.0b	330.9±14.0c	0.0001
Ser	452.9±19.2a	360.0±19.2b	235.5±19.2c	0.0006
Cystathionine	8.5±0.1	11.1±0.1	9.0±0.1	0.21
Cys	8.9±0.6	9.1±0.6	7.4±0.6	0.18
Taurine	1956±91	1989±91	2039±91	0.81

Tabell 8. Frie aminosyrer og N-metabolitter i muskelen ($\mu\text{mol}/100\text{g}$). Verdier er gjennomsnitt \pm SE, n=3

	Control diet	AA diet	1C diet	p-values
Thr	28.5±2.7	35.6±2.7	29.3±2.7	0.21
Lys	48.4±3.8	45.6±3.8	44.9±3.8	0.80
Met	7.9±0.8	7.0±0.8	7.3±0.8	0.76
Gly	499.2±16.7a	536.7±16.7a	393.6±16.7b	0.002
Ser	32.2±3.0	26.6±3.0	21.5±3.0	0.12
Cystathionine	2.7±1.5b	12.7±1.5a	13.0±1.5a	0.005
Cys	nd	nd	nd	-
Taurine	119.7±19.7	145.0±19.7	158.3±19.7	0.42

Det ble heller ikke funnet store forskjeller i B-vitaminsnivåene hos laks gitt de ulike diettene (tabell 9 og 10).

Tabell 9. Muskel cobalamin (vitamin B12, mg/kg) og folat ($\mu\text{g}/100\text{g}$) i fisk gitt de tre diettene. Verdier er gjennomsnitt \pm SE, n=3 B12 og folat metabolitter i muskel

Vitamin	Control diet	AA diet	1C diet	p-value
B12	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.54
THF	0.59±0.06	0.58±0.05	0.63±0.03	0.80
5,10-Me-THF	0.45±0.10	0.60±0.01	0.69±0.09	0.19
10-CHO-FA	1.56±0.29	0.98±0.04	1.11±0.05	0.12
5-CHO-FA	0.15±0.07	0.08±0.08	0.21±0.12	0.64
FA	1.3±0.26	1.06±0.11	1.02±0.04	0.52

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

5-Me-THF	0.28±0.06	0.18±0.02	0.11±0.02	0.037
∑ Folates	4.19±0.73	3.37±0.24	3.7±0.26	0.50

Vitamin B6 ble ikke analysert da ikke nok materiale.

Tabell 10. Liver cobalamin (vitamin B12, mg/kg) og folate (µg/100g) i fisk gitt de tre diettene. Verdier er gjennomsnitt±SE, n=3

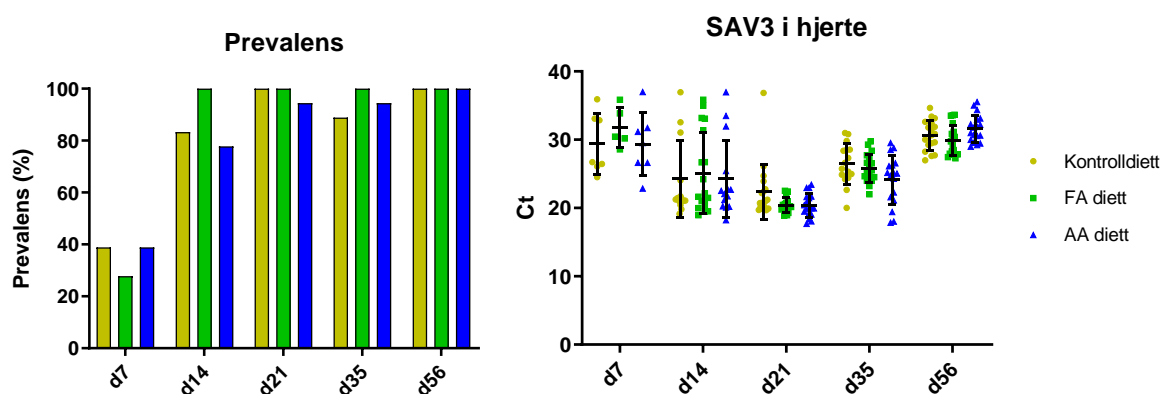
Vitamin	Control diet	AA diet	B-vitamin diet	p-value
B12	0.82±0.14	0.77±0.24	0.76±0.24	0.97
THF	721±20	780±91	839±75	0.52
5,10-Me-THF	373±108	171±62	305±106	0.91
10-CHO-FA	10.9±6.6	7.3±5.8	11.5±5.9	0.88
5-CHO-FA	253±56	160±24	218±25	0.29
FA	5.4±1.6	6.5±1.7	10.7±2.4	0.21
5-Me-THF	933±140	841±173	644±51	0.35
∑ Folates	2223±62	1909±76	1970±106	0.08

Det var bare små endringer i genuttrykk i lever, mens muskelresultatene viste flere forskjeller. Muskelprøver ble derfor valgt til RNA sekvensering. Det som var ekstra interessant var at de forskjellene i muskelprøvene, var mellom kontroll og de to diettene som var tilsatt ekstra aminosyrer og B-vitaminer, mens AA og 1C diettene gav nesten identisk genuttrykk i muskel, kun fem gener hadde svakt forskjellig genuttrykk, mens det var ti ganger så mange gener som var forskjellig mellom AA og kontroll samt 1C og kontroll. I muskel prøver fra AA samt 1C dietten var det endret mRNA nivå for gener som regulerer aminosyre metabolisme, vitamin binding og neurotransmittere. Generelt viste dataene at det var et lavere mRNA nivå i både AA og 1C dietten i forhold til kontroll dietten. Dette tyder på at mindre aktivitet i disse metabolismeveiene når fisken får mer frie aminosyrer eller økt mengde av B-vitaminer i dietten.

Det synes som om ekstra tilsetning av aminosyrer eller B-vitaminer hadde ingen påvirkning på vekst og deponering or relativt liten påvirkning på de målte verdiene for metabolismen. Sannsynligvis ville en fått endringer om en hadde fulgt fisken ut i saltvann med de samme diettene. Spesielt siden vi tidligere har vist at forskjellene først inntreffer etter en tid i sjø når laksen blir gitt dietter med ulik 1C metabolitter gjennom ferskvanns og påfølgende saltvannsfase (Espe et al., 2020).

Smitteforsøk med PD:

Smittet fisk hadde en signifikant lavere vektøkning og lengdevekst sammenlignet med kontrollfisk. Den usmittede fisken hadde en SGR på 1,3-1,4 mens den smittede fisken hadde en SGR på 0,2-0,4 i snitt, og kondisjonsfaktor var lavere i smittet fisk i forhold til kontrollfisk (1,4 mot 1,2). Appetitt ble indirekte undersøkt som tilstedeværelse av fôr eller feces i mage/tarm, og basert på disse observasjonene ble fôrintak redusert frem til dag 21 før det begynte å øke igjen. Det var ingen dødelighet i løpet av forsøket.

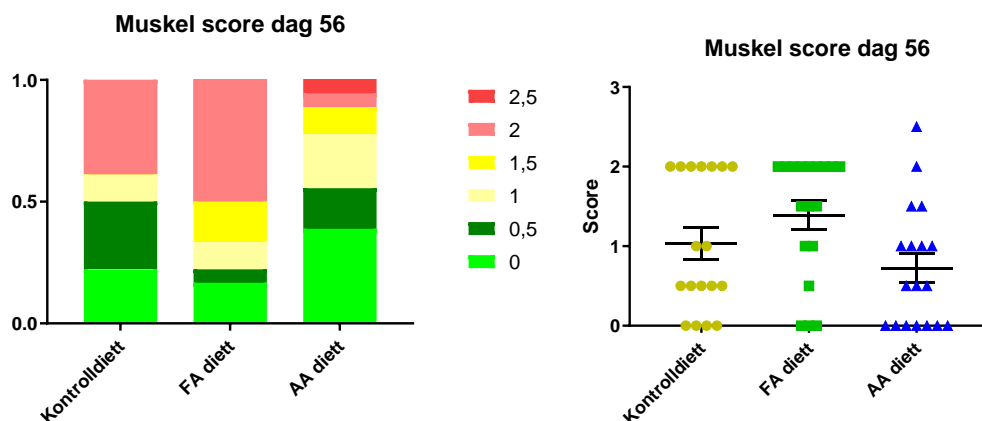


Figur 19. Prevalens og virusmengde i fisk ved de ulike uttakene. Figuren til venstre viser prosentandel av de prøvetatt fiskene der virus ble påvist (fordelt på de tre diettgruppene som ble brukt i smitteforsøket), mens figuren til høyre viser virusmengde hos de fiskene som var positive (lav Ct-verdi indikerer høy virusmengde).

Syv dager etter smitte, var SAV påvist i hjerte hos totalt 39% av fisk fra kontrollfôr og AA gruppene, og 27% i fisk gitt FA dietten (Figur 19). I resten av forsøket var alle undersøkte fisk fra FA gruppen positive (100% prevalens), mens det for de andre gruppene varierte, og det for fisk gitt AA dietten ikke var funnet 100% prevalens før ved avslutning av forsøket. Virusmengde i hjerte hos de smittede fiskene var ikke påvirket av dietten ved noen tidspunkt, men det var en indikasjon på høyere virusmengde i fisk gitt FA fôret og lavere virusmengde i fisk gitt AA fôret ved avslutning av forsøket ($p=0.06$). Basert på prevalens og virusmengde i hjerte ble det videre fokusert på dag 14 og dag 56 for å undersøke eventuelle forskjeller i en fase der fiskene var i ferd med å bli syke eller mot slutten når fiskene var i ferd med å bli friske, og det ble gjort histologisk undersøkelse av pankreas og hjerte i alle fiskene, og i tillegg av muskel dag 56.

Dag 14 var det stor variasjon i virusmengde blant de smittede fiskene, noe som kan tyde på at noen fisk hadde blitt syke tidligere enn de med lavere virusmengde, men det var ingen forskjeller mellom diettene. Histologiske undersøkelser av hjerte og pankreas viste at fisken hadde vevsskader typisk for PD og virusmengde korrelerte signifikant med histologscore (omfang av vevsskade), men det var ingen

forskjeller mellom diettene. Ved skade på vev vil det skje en lekkasje av ulike enzym i plasma, slik at et forhøyet nivå indikerer at skade på vev er i ferd med å skje. Dag 14 var det signifikant høyere konsentrasjon av ASAT og CK i plasma i smittet fisk, og disse korrelerte med virusmengde og histologiscore i pankreas og hjerte, noe som tyder på at et høyt innhold av disse kan brukes som en indikasjon på patologiske forandringer i tidlig fase, til tross for at de ikke er vevs- eller sykdomsspesifikke.



Figur 20. Skade i muskel ved avslutning av forsøket.

Ved avslutning av forsøket ble det bare sett vevsskade i hjerte i en fisk selv om SAV ble påvist i hjerte fra all fisk på dette tidspunktet (100% prevalens). Derimot var det veldig mange fisk som fremdeles hadde høy score i pankreas i alle grupper, og 31% hadde ingen patologi. Det var ingen forskjell i omfanget av vevsskade i pankreas eller hjerte. I muskel var det flere fisk som ikke hadde vevsskader i gruppen som ble gitt AA fôret, samt at det var lavere alvorlighet i fisk gitt AA fôret og høyere alvorlighet i fisk gitt FA fôret, men ikke signifikant forskjellig score ($p=0.06$, Kruskal-Wallis). Sammenligning av gruppe for gruppe viste at score i fisk gitt FA eller AA gruppen ikke var forskjellig fra score i kontrolldietten, men score var lavere i fisk gitt FA enn AA fôret ($p=0.01$ for FA vs. AA, Mann-Whitney). Dette kan henge sammen med både det at det i AA gruppen ikke var 100% prevalens før dag 56, slik at det kan være at noen fisk nettopp hadde blitt smittet og ikke hadde utviklet patologi i muskel ennå, eller at omfanget av vevsskade var lavere i denne gruppen. Virusmengde i muskel ble også undersøkt, og det var ingen forskjell i virusmengde mellom diettene. Uttrykk av gen som koder for antivirale protein som viperin og Mx i muskel korrelerte med virusmengde, slik at uttrykket ser ut til å reflektere virusmengde i muskel og blir påvirket av at ulike individ i dette studiet trolig var i ulik fase av sykdommen, men det var ikke forskjell mellom diettene.

Siden fisk som blir smittet med PD ofte slutter å spise er det relevant å undersøke mulighetene for å styrke fisken før et utbrudd. I dette forsøket ble det valgt å bruke en badsmittemodell for å simulere

naturlig smittevei for å undersøke om fôrene fisken hadde fått i ferskvann kunne påvirke mottakelighet og senere om de ble raskere friske. En av hypotesene var at fisk gitt AA fôret kunne ha et sterkere mukuslag fordi treonin er en viktig komponent i mukus og dermed kan styrke barrierene (Wang et al., 2009). Dette kan være en av grunnene til at ikke all fisk fra denne gruppen var smittet før ved avslutning av forsøket. De ulike aminosyrene har også ulike funksjonelle egenskaper som kan være viktig under en infeksjon gjennom å påvirke for eksempel antioksidantforsvar og apoptoseregulering (Li et al., 2007), noe som kan ha spilt en rolle i forhold til at det var en indikasjon på lavere omfang av muskelskade i AA gruppen ved avslutning av forsøket, i tillegg til at lavere score i muskel kan komme av at muskelen ikke hadde blitt skadet ennå fordi noen av fiskene gitt AA dietten kan ha blitt smittet senere og dermed var i en tidlig fase av sykdommen.

Tidligere studier har vist at både mengde fett, type fett og n-6/n-3 ratio kan påvirke utfall etter sykdom (Sissener et al., 2016). For eksempel har resultat fra arbeid med regnbueørret vist en positiv effekt av å ha høyere n-6/n-3 ratio i ferskvann i smitteforsøk med SAV 1 (Lopez-Jimena et al., 2015), mens flere andre forsøk har vist at mye n-6 kan være uheldig for laks i sjøvann (Sissener et al., 2016). Fettsyrene i dietten påvirker sammensetning av cellemembraner, inkludert immunceller, og fettsyrer i dietten kan modulere inflammasjon og immunrespons under en infeksjon (Trichet, 2010). I dette prosjektet ble både n-6 og n-3 fettsyrer økt i FA fôret, slik at både mengde n-6 og n-3 var høyere i FA fôret enn i kontrollfôret for å simulere sammensetningen i den naturlige dietten til laks i ferskvann, men n-6/n-3 ratio var den samme som kontrollfôret. Basert på resultatene fra dette forsøket ser det ikke ut til at denne endringen i fôret påvirker hvordan fisken håndterer en PD infeksjon. Det kan likevel være verdt å merke seg at det ved avslutning av forsøket var en indikasjon på at det var høyere virusmengde i hjerte hos fisk gitt FA dietten sammenlignet med AA dietten, og det var også flere fisk gitt dette fôret som hadde mer alvorlig skade (høyere score) i muskel. Dette kan tyde på at denne fisken har fått mer skade i muskel under infeksjonen eller en antydning til at fisken bruker lenger tid på å bli kvitt viruset sammenlignet med AA fôret, slik at de to endringene i fôrsammensetning drar i hver sin retning med hensyn til hvor robust fisken er under en infeksjon.

Immunrespons i cellemodeller

Hovedmålet med studien var å fôre laksefisk i ferskvannsfase ulike dietter for å sammenligne ulike dietteffekter både i ferskvannsfasen og senere i sjøvannsfasen. Laks i sjøvannsfase ble kun fôret en kommersiell diett (Spirit Supreme, Skretting) tilpasset fiskens størrelse på hvert stadium. Aminosyre dietten ble beriket med DL-metionin, L-lysin, L-Treonin og Taurin mens en Fettsyre diett var sammensatt av vegetabiliske oljer (raps-, palme- og linoljer) som er tilnærmet lik fettsyre

sammensetningen i insekter som laksen spiser i ferskvanns-fasen, i vill tilstand. En kontroll diett tilnærmet lik vanlige kommersielle dietter føret til parr i ferskvannsfase ble inkludert.

Overføringen av laksefisk fra ferskvann til sjøvann endret transkripsjonen av flere gener. Spesielt i leukocytter isolert fra fisk føret Kontroll- eller Fettsyre dietten, gikk den generelle transkripsjonen ned (*IL-1 β* , *CD83*, *INF- γ* , *Cox2*, *CD36*, *MGAT1*, *katalase*). Aminosyredietten så ut til å ha potensiale for å kunne opprettholde en god LPS-indusert respons av immungenene *IL-1 β* , *CD83*, *Cox2* og *INF- γ* ved overgangen fra ferskvann til sjøvannsfase. De fleste gen-transkripsjons responsene, alle dietter, ble gjenopprettet etter seks uker i sjøvann. Imidlertid, og som sannsynligvis indikerer et behov for å bekjempe oksidasjon og styrt celledød (apoptose) og rekruttere nok dendritiske celler, transkriberte leukocytter isolert fra laks føret med Aminosyre dietten en betydelig mengde *katalase*, *Bcl2* og *CD83* seks uker inn i sjøvannsfasen.

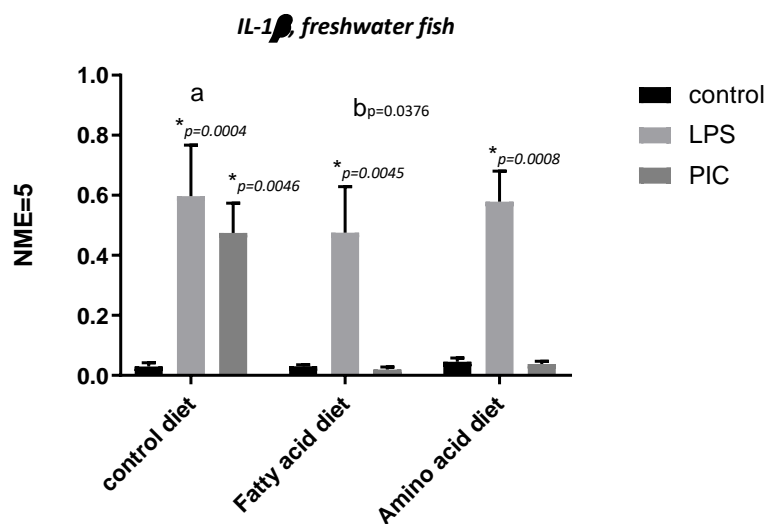
Isolerte leukocytter fra fisk føret Fettsyre- eller Aminosyre-dietten induserte signifikante PIC-induserte genresponser (*Mx* og *viperin*) i ferskvannsfasen, sammenlignet med kontroldietten. Dette kan bety at Fettsyre- og Aminosyre diettene kan være gunstig for å beskytte fisken mot virusinfeksjoner på dette stadiet. *Mx* og *viperin* reagerte tilstrekkelig på PIC-stress i alle andre målepunkter, alle dietter. Videre, i leukocytter isolert fra PD-infisert fisk, var alle PIC-induserte genresponser adekvate og like uansett diett. Spesielt var PIC-indusert *INF- γ* -transkripsjon sterkere i leukocytter isolert fra PD-infisert fisk enn *INF- γ* -responsen til leukocytter observert i de andre fasene. Leukocytter isolert fra laks som allerede var infisert med et virus, PD, kunne fortsatt svare på PIC-stress *in vitro*, noe som tyder på viktigheten av å ha et sterkt immunforsvar mot virus, uavhengig av disse spesifikke diettene.

I leukocytter isolert fra PD-fisk og når de ble behandlet med PIC *in vitro*, ble det observert en reduksjon i transkripsjonen av *IL-1 β* , *arginase* og *Bcl2*, i alle dietter sammenlignet med respektive kontroller uten tilsatt PIC. Siden dette er gener som oppreguleres ved bakterie infeksjoner (LPS), kan det tenkes at immuncellene prioriterer oppregulering av virus relaterte gener for å spare energi. Leukocytter fra PD-infisert fisk føret Fettsyre dietten, nedregulerte total transkripsjon av *CD36*, *PLA2G4* og *5LOX* mens leukocytter isolert fra PD-fisk føret med Aminosyre dietten nedregulerte *MGAT1*, *PLA2G4* og *CD83* sammenlignet med Kontroll diett. Fettsyre og Aminosyre dietten gitt laks i ferskvannsfasen har altså effekt på leukocyttenes transkripsjon av gener involvert i fettsyremetabolisme spesielt, hos laks infisert med PD virus. Det kan tyde på at transkripsjon av gener relatert til fettsyremetabolisme i leukocytter isolert fra virus infisert laks ikke er nødvendig eller prioritert når fiskene er blitt føret med disse to spesifikke førene i ferskvannsfasen.

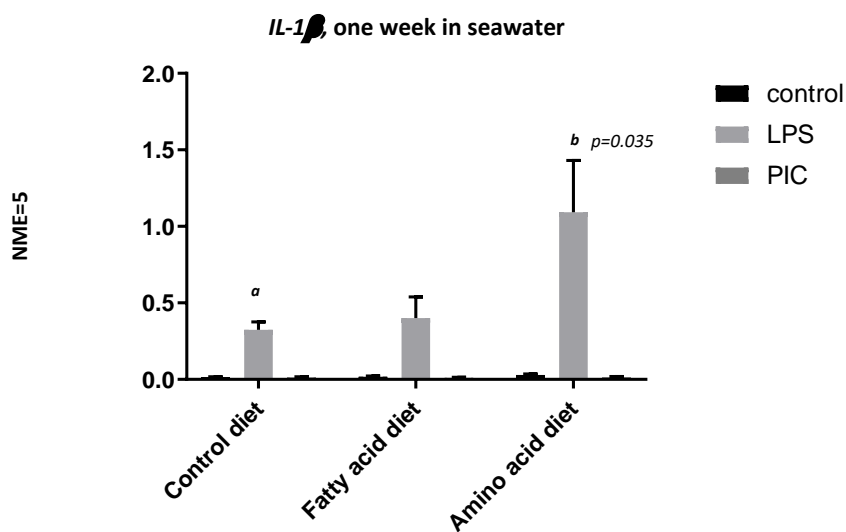
Konklusjoner, immunrespons i cellemodell:

- Diettene påvirket transkripsjon av immungener i leukocytter isolert fra laks i ferskvann så vel som i leukocytter isolert fra laks i senere sjøvannfaser og hos laks infisert med PD.
- Ved overgangen fra ferskvann til sjøvann, syntes Aminosyredietten som ble fôret laks i ferskvann å være gunstig for leukocyttdinduserte immunresponser (*IL-1 β* , *INF- γ* , *Cox2*, *CD83*), ved LPS og PIC behandling. Aminosyredietten forbedrer trolig forsvaret mot bakterie- og virusinfeksjon i den sårbare overgangsperioden fra ferskvann til sjøvann.
- Lakseparr i ferskvann så ut til å være mer robust mot virusinfeksjoner når den ble fôret med Fettsyre- eller Aminosyre diettene, enn når fisken ble fôret med kontrolldietten. Signifikant PIC-indusert transkripsjon av *Mx* og *viperin* ble observert i leukocytter isolert fra disse to diettene.
- Å overføre fisken til sjøvann påvirket sterkt leukocyttenes *katalase*-transkripsjonen, uavhengig av dietter, noe som indikerer at fiskens immunceller på dette stadiet er spesielt sårbare for oksidativ skade.

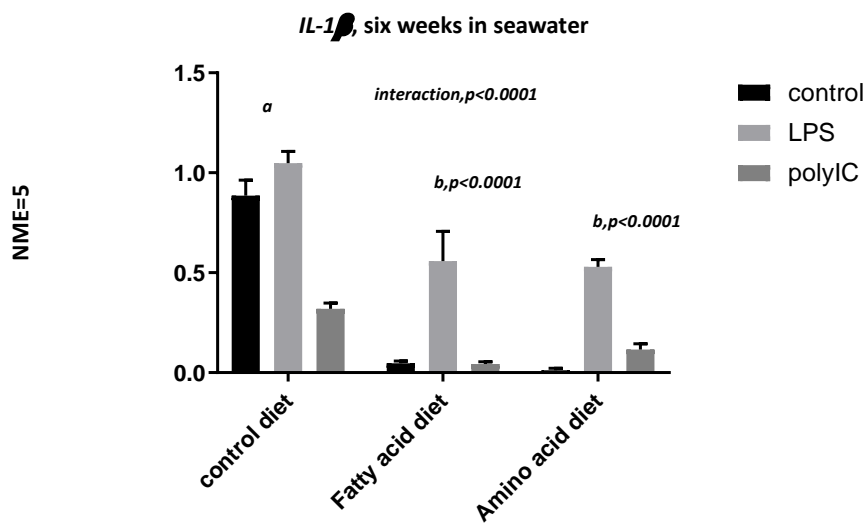
Eksempel på LPS induerte responser:



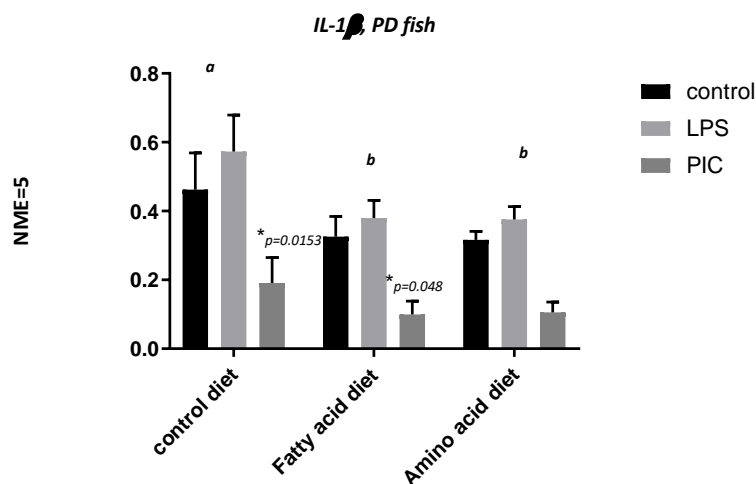
Figur 21a) Leukocytter isolert fra fisk i ferskvannsfase og fra alle diettene oppregulerer *IL-1 β* sammenlignet med respektive kontroll kulturer når de ble eksponert for LPS.



Figur 21b) Leukocytter isolert fra fisk etter en uke i saltvann transkriberer *IL-1 β* når de ble eksponert for LPS. Leukocytter isolert fra fisk føret Aminosyre dietten transkriberer *IL-1 β* signifikant forskjellig fra de andre diettene.

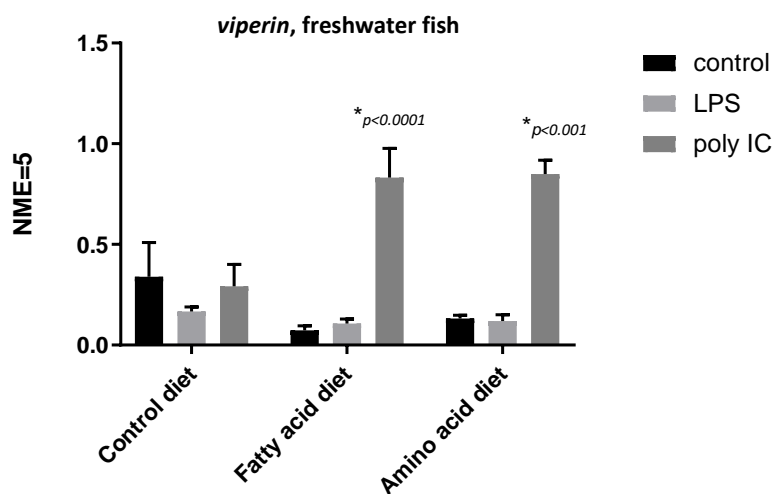


Figur 21c) Leukocytter isolert fra laks føret Fettsyre eller Aminosyre diettene transkriberer *IL-1 β* signifikant forskjellig fra kontroll kulturene når de ble eksponert for LPS, seks uker i sjøvannsfase.

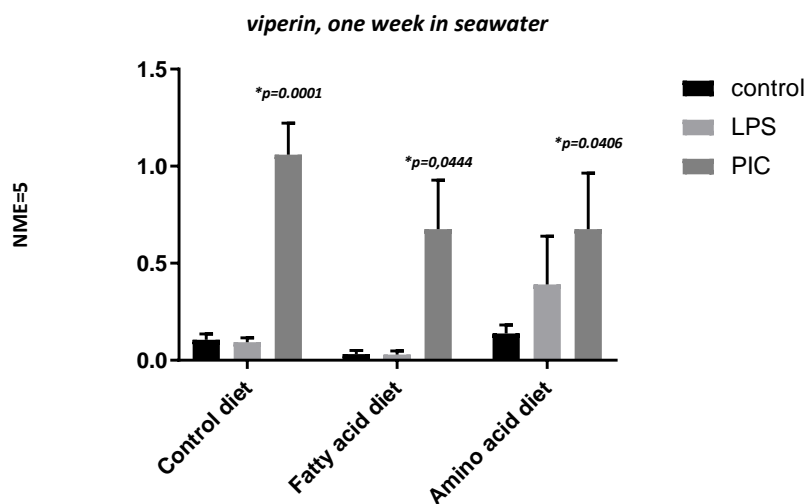


Figur 21d) Leukocytter isolert fra PD-smittet fisk nedregulerer transkripsjon av *IL-1 β* når leukocytterne blir eksponert for PIC, alle dietter. Ingen LPS stimulering er observert forskjellig fra kontroll kulturene, uansett dietter, men leukocytter isolert fra laks føret med Fettsyre eller Aminosyre diettene har lavere generell transkripsjon av *IL-1 β* enn Kontroll dietten.

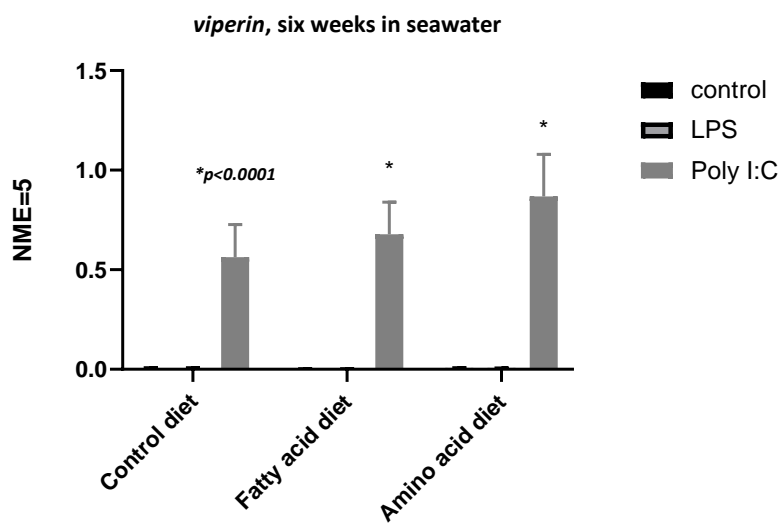
Eksempel på PIC induserte responser:



Figur 22a) Leukocytter isolert fra laks føret med Fettsyre eller Aminosyre diettene transkriberer PIC indusert *viperin* signifikant forskjellig fra respektive kontroll-kulturer, i ferskvannsfasen. Det gjør ikke leukocytter isolert fra fisk føret med Kontroll dietten.

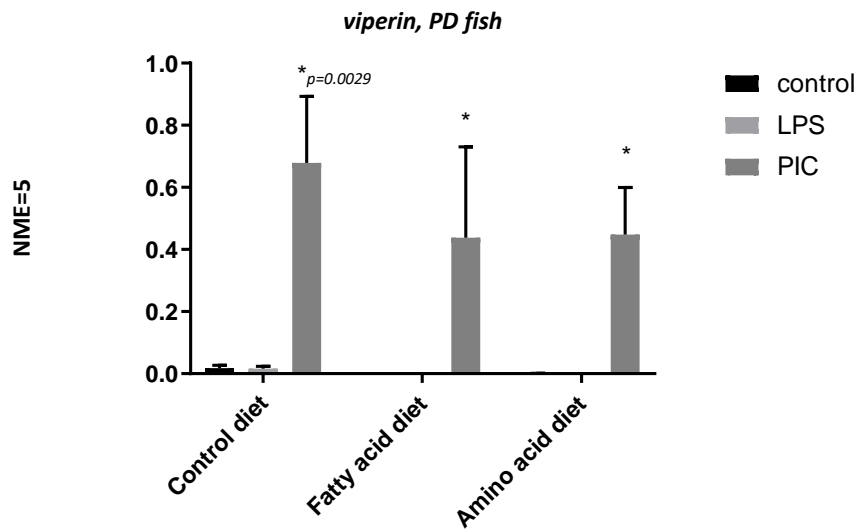


Figur 22b) Leukocytter isolert fra laks, uansett diett, transkriberer PIC industert *viperin* signifikant forskjellig fra respektive kontroll kulturer etter en uke i sjøvann. Virus responsen er adekvat.



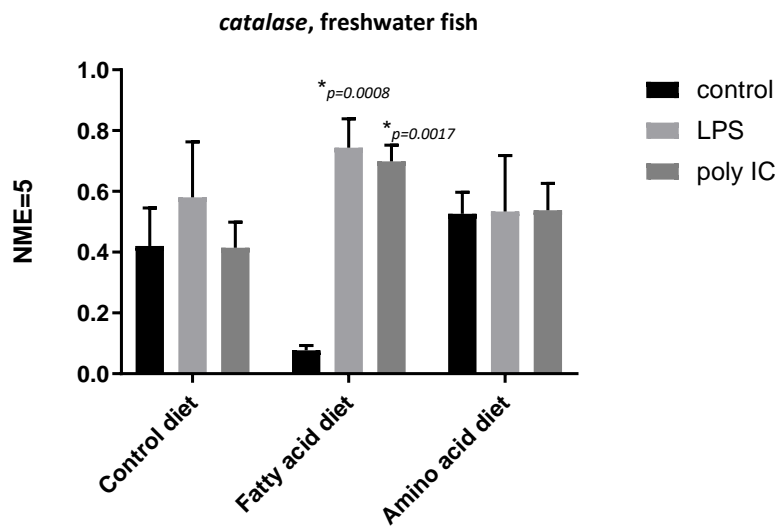
Figur 22c) Leukocytter isolert fra fisk, uansett diett, transkriberer PIC industert *viperin* signifikant forskjellig fra respektive kontroll kulturer, etter seks uker i sjøvann.

Optimal ernæring for laks i ferskvann for å øke fiskens robusthet, overlevelse og vekst etter overføring til sjø

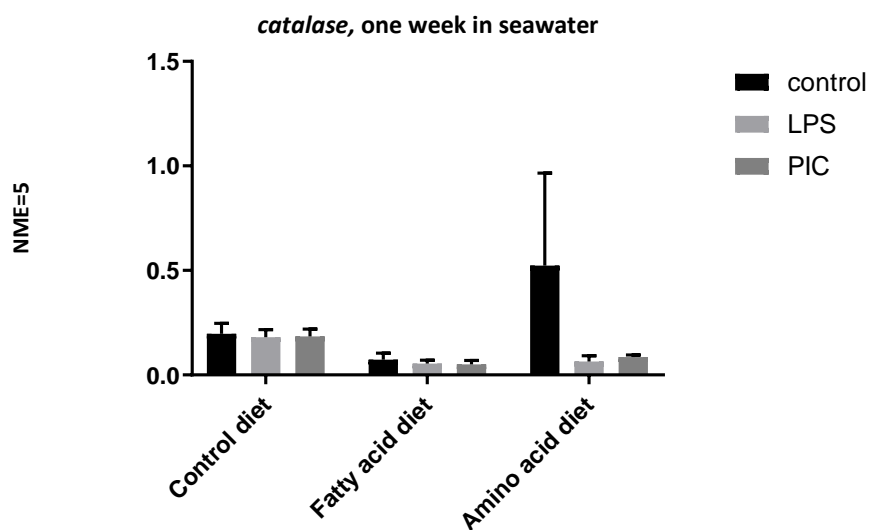


Figur 22d). Leukocytter isolert fra PD smittet fisk, uansett diett, transkriberer PIC industert *viperin* signifikant forskjellig fra respektive kontroll kulturer.

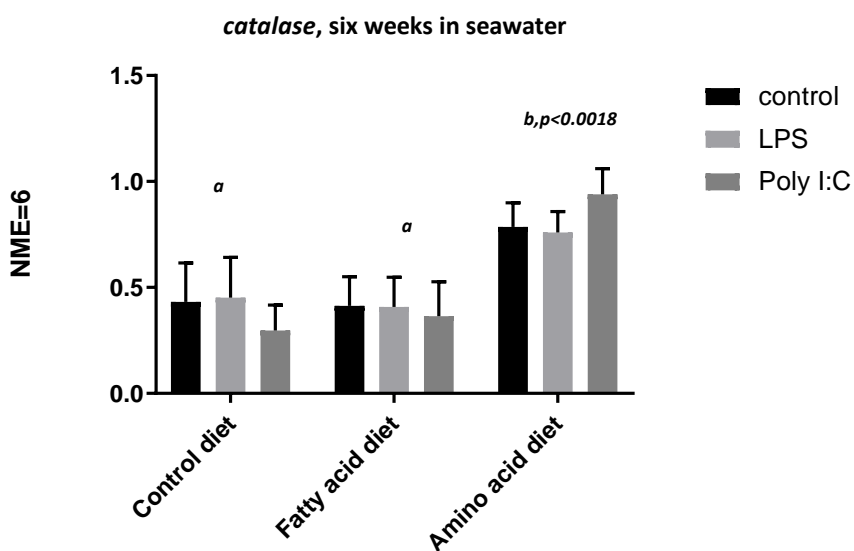
Eksempel fra et redox enzym:



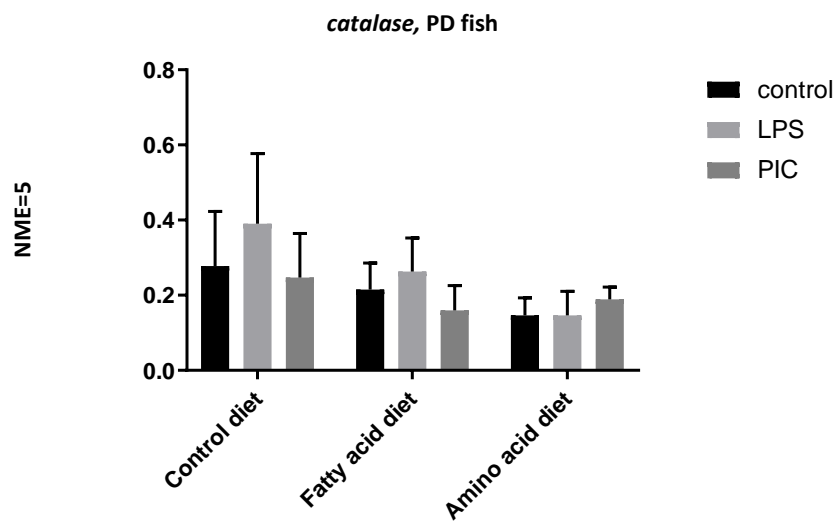
Figur 23a) Kun leukocytter isolert fra laks føret med Fettsyre dietten transkriberer LPS eller PIC industert *katalase* signifikant forskjellig fra kontroll kulturene, i ferskvannsfasen.



Figur 23b) Leukocytter isolert fra laks etter 1 uke i sjøvann transkriberer lite *katalase* uansett fôr eller *in vitro* behandling.



Figur 23c) Etter seks uker i sjøvann har den generelle transkripsjonen av *katalase* tatt seg opp igjen, særlig i leukocytter isolert fra fisk fôret med Aminosyre dietten.



Figur 23d) Leukocytter isolert fra PD smittet fisk transkriberer lite *katalase* uansett fôr og behandling *in vitro*.

6 Hovedfunn

Dette prosjektet viste ikke positive effekter på robusthet, overlevelse og vekst av de testede endringene av fôret sammenlignet med et kontrollfôr med tilsvarende sammensetning som et gjennomsnittlig kommersielt fôr, noe som tilsier at dette fôret allerede var bra nok.

Alle fôrgruppene taklet overgangen til sjøvann bra, men direkte overføring fra 12 til 8 °C kan ikke anbefales basert på resultatene våre, da dette førte til økt dødelighet samt redusert mukuslag og mer sår og skjelltap.

Det er stor variasjon i elektrolyttbalansen i kommersielle norske fôr for laks i ferskvann, og det er tydelig at endring av elektrolyttbalansen i ferskvannsfôr for laks påvirker både osmoregulering og mineralmetabolisme, men mer kunnskap trengs for å kunne gi klare anbefalinger her.

Samlet sett tyder resultatene fra smitteforsøket med PD og uttesting av immunrespons i hodeceller, på at aminosyredietten kan ha en gunstig effekt på fiskens immunrespons og motstandsdyktighet mot sykdom, selv om det var snakk om relativt små forskjeller som akkurat ikke var signifikante i smitteforsøket.

7 Leveranser

Følgende artikler er under arbeid:

Optimal nutrition for salmon in freshwater to increase fish robustness, survival and growth after seawater transfer. Forfattere: N.H. Sissener, K. Hamre, P.G. Fjelldal, A.J. Prabhu, M. Espe, K. M. Linghong, E. Høglund, C. Sørensen, K. Skjærven, E. Holen, S. Subramanian, V. Vikeså, B. Nordgren and S. Remø

Electrolyte balance of freshwater feed affects osmoregulatory response, mineral metabolism and welfare of Atlantic salmon in seawater. Forfattere: Antony Jesu Prabhu. P, Per Gunnar Fjelldal, Sofie C. Remø, Chandrasekar Selvam, Kristin Hamre, Marit Espe, Elisabeth Holen, Kaja H. Skjærven, Vibeke Vikså, Saravanan Subramanian, Johan W. Schrama, Nini H. Sissener

Specific diets fed salmon parr in freshwater phase may be beneficial for fish immunity during smoltification, early and late seawater phases by providing additional resources during stressful events and infections. Forfattere: E. Holen, M. Espe, M. Chen, P.G. Fjelldal, K. Skjærven, S. Remø, A. J. Prabhu, K. Hamre, V. Vikeså, S. Subramanian, B. Nordgren, N.H. Sissener.

Supplementation of threonine, lysine and the sulfur amino acids, methionine and taurine or cobalamine, pyridoxine and folate plus methionine during the fresh water period of Atlantic salmon did not improve growth or accretion Forfattere: Espe M, Hamre K, Whatmore P, Fernandes J.M.O Sissener N.H., Prabu A, Fjelldal PG, Remo S.C., Holen E, Oeland E and Skjaerven K

Dietary plant oil supplemented with arachidonic acid and eicosapentaenoic acid affects the fatty acid composition and eicosanoid metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Forfatterer: L.H. Miao, S. Remø, M. Espe, A. Prabhu, K. Hamre, P.G. Fjelldal, K. Skjærven, E. Holen, V. Vikeså, N.H. Sissener

Planlagt artikkel:

SAV1 challenge of fish fed modified amino acid and fatty acid compositions during the freshwater phase. Forfattere: Sofie C. Remø, Mark Powell, Nini Sissener, Hedda Skjold, Søren Grove, Craig Morton, Stig Mæhle, Ingrid U. Fiksdal, Dawit Ghebretsaie, Joachim Nordbø.

8 Referanser

- AUNSMO, A., VALLE, P. S., SANDBERG, M., MIDTLYNG, P. J. & BRUHEIM, T. 2010. Stochastic modelling of direct costs of pancreas disease (PD) in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 233-241.
- BELL, J. G., GHIONI, C. & SARGENT, J. R. 1994. Fatty acid compositions of 10 freshwater invertebrates which are natural food organisms of Atlantic salmon parr (*Salmo salar*): a comparison with commercial diets. *Aquaculture*, 128, 301-313.
- BELL, J. G., TOCHER, D. R., FARNDAL, B. M., COX, D. I., MCKINNEY, R. W. & SARGENT, J. R. 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation. *Lipids*, 32, 515-525.
- BJERKÅS, E., BRECK, O. & WAAGBØ, R. 2006. The role of nutrition in cataract formation in farmed fish. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 1, 1-16.
- CHIU, Y. N., AUSTIC, R. E. & RUMSEY, G. L. 1984. Effect of dietary electrolytes and histidine on histidine metabolism and acid-base balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Comparative Biochemistry*, 78, 777-783.
- CHIU, Y. N., AUSTIC, R. E. & RUMSEY, G. L. 1988. Effect of feeding level and dietary electrolytes on the arginine requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 69, 79-91.
- ESPE, M. & HOLEN, E. 2013. Taurine attenuates apoptosis in primary liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Br J Nutr*, 110, 20-28.
- ESPE, M., LEMME, A., PETRI, A. & EL-MOWAFI, A. 2007. Assessment of lysine requirement for maximal protein accretion in Atlantic salmon using plant protein diets. *Aquaculture*, 263, 168-178.
- ESPE, M., RATHORE, R. M., DU, Z.-Y., LIASET, B. & EL-MOWAFI, A. 2010. Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18:1 to 18:0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* *Amino Acids*, 39, 449-460.
- ESPE, M., VIKESA, V., THOMSEN, T. H., ADAM, A. C., SAITO, T. & SKJAERVEN, K. H. 2020. Atlantic salmon fed a nutrient package of surplus methionine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6 improved growth and reduced the relative liver size, but when in excess growth reduced. *Aquaculture Nutrition*, 26, 477-489.
- FJELLDAL, P. G., HANSEN, T., BRECK, O., ØRNSRUD, R., LOCK, E.-J., WAAGBØ, R., WARGELIUS, A. & ECKHARD WITTEN, P. 2012. Vertebral deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - etiology and pathology. *J. Appl. Ichthyol.*, 28 433-440.
- GHIONI, C., BELL, J. G. & SARGENT, J. R. 1996. Polyunsaturated fatty acids in neutral lipids and phospholipids of some freshwater insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114, 161-170.
- HANSEN, T., FJELLDAL, P. G., YURTSEVA, A. & BERG, A. 2010. A possible relation between growth and number of affected vertebrae in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Ichthyology* 26, 355-359.

- HEMRE, G.-I., LOCK, E. J., OLSVIK, P. A., HAMRE, K., ESPE, M., TORSTENSEN, B., SILVA, J., HANSEN, A.-C., WAAGBØ, R., JOHANSEN, J. & SISSENER, N. H. 2016. Atlantic salmon (*Salmo salar*) require increased dietary levels of B-vitamins when fed diets with high inclusion of plant based ingredients. *PeerJ*, 4:e2493.
- HJELTNES, B., WALDE, C. S., JENSEN, B. B. & HAUKKAAS, A. 2016. Fiskehelsesrapporten 2015. Veterinærinstituttets rapportserie, 3/2016.
- JANSEN, M. D., BANG JENSEN, B., MCLOUGHLIN, M. F., RODGER, H. D., TAKSDAL, T., SINDRE, H., GRAHAM, D. A. & LILLEHAUG, A. 2017. The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: a summary of the current state of knowledge. 40, 141-155.
- JARUNGSRIAPISIT, J. 2016. Salmonid alphavirus infection in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., bath challenge, viral shedding and host susceptibility. PhD, University of Bergen, Norway.
- JUTFELT, F., OLSEN, R. E., BJÖRNSSON, B. T. & SUNDELL, K. 2007. Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 273, 298-311.
- LI, P., YIN, Y.-L., LI, D., WOO KIM, S. & WU, G. 2007. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98, 237-252.
- LOPEZ-JIMENA, B., LYONS, P., HERATH, T., RICHARDS, R. H., LEAVER, M., BELL, J. G., ADAMS, A. & THOMPSON, K. D. 2015. The effect of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on salmonid alphavirus subtype 1 (SAV-1) replication in tissues of experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Microbiology*, 178, 19-30.
- NRC 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp, Washington D.C., The national academies press.
- OBEID, R. 2013. The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. 5, 3481-3495.
- PELLERTIER, D. & BESNER, M. 1992. The effect of salty diets and gradual transfer to sea water on osmotic adaptation, gill Na⁺, K⁺-ATPase activation, and survival of brook charr, *Salvelinus fontinalis*, Mitchill. 41, 791-803.
- PERRY, S. F., RIVEO-LOPEZ, L., MCNEILL, B. & WILSON, J. 2006. Fooling a freshwater fish: how dietary salt transforms the rainbow trout gill into a seawater gill phenotype. *Journal of Experimental Biology*, 209 4591-4596.
- ROSEN LUND, G., TORSTENSEN, B. E., STUBHAUG, I., USMAN, N. & SISSENER, N. H. 2016. Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *J Nutr Sci*, 5, e19, 1-13.
- SALMAN, N. A. & EDDY, F. B. 1990. Increased sea-water adaptability of non-smolting rainbow trout by salt feeding. *Aquaculture*, 86, 259-270.
- SISSENER, N. H., RUYTER, B., TORSTENSEN, B. E., ØSTBYE, T.-K., WAAGBØ, R., JØRGENSEN, S. M., HATLEN, B., LILAND, N. S., YTTEBORG, E., SÆLE, Ø., RUD, I., REMØ, S. C., MØRKØRE, T., DESSEN, J.-E., SKJERVEN, K., YTRESTØYL, T., HOLEN, E., ADAM, A. C. & BERGE, G. 2016. Oppdatering av utredningen: Effekter av endret fetttsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet "Fett for fiskehelse - 2016". In: [HTTP://WWW.FHF.NO/PROSJEKTDETALJER/?PROJECTNUMBER=901250](http://www.fhf.no/prosjektDETALJER/?PROJECTNUMBER=901250) (ed.). FHF- report.

SKJAERVEN, K. H., JAKT, L. M., FERNANDES, J. M. O., DAHL, J. A., ADAM, A. C., KLUGHAMMER, J., BOCK, C. & ESPE, M. 2018. Parental micronutrient deficiency distorts liver DNA methylation and expression of lipid genes associated with a fatty-liver-like phenotype in offspring. *Sci Rep*, 8, 3055.

SOMMERSET, I., WALDE, C. S., BANG JENSEN, B., BORNØ B, A, H. & BRU, N. E. 2020. Fiskehelse rapporten 2019. Veterinærinstituttet 2020 Publisert 20.02.2020 på www.vetinst.no Revidert utgave 23.03.2020.

STAURNES, M. & FINSTAD, B. 2000. The effects of dietary NaCl supplement on hypo-osmoregulatory ability and sea water performance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) smolts. 31, 737-743.

THORPE, J. E., MANGEL, M., METCALFE, N. B. & HUNTINGFORD, F. A. 1998. Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evol Ecol*, 12, 581-599.

TOCHER, D. R., BELL, J. G., DICK, J. R., HENDERSON, R. J., MCGHEE, F., MICHELL, D. & MORRIS, P. C. 2000. Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23, 59-73.

TRICHET, V. V. 2010. Nutrition and immunity: an update. 41, 356-372.

WAAGBØ, R., BRECK, O. & TORSTENSEN, B. 2004. Dietary lipid regimes can affect cataract development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) growers. In 11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish, Phuket, Thailand.

WANG, W. W., QIAO, S. Y. & LI, D. F. 2009. Amino acids and gut function. *Amino Acids*, 37, 105-110.

WITTEN, P. E., GIL-MARTENS L., HUYSSEUNE A., TAKLE H. & K., H. 2009. Towards a classification and an understanding of developmental relationships of vertebral body malformations in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 6-14.

ZAUGG, W. S. 1982. Some changes in smoltification and seawater adaptability of salmonids resulting from environmental and other factors. *Aquaculture*, 28, 143-151.



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET

Postboks 1870 Nordnes

5817 Bergen

Tlf: 55 23 85 00

E-post: post@hi.no

www.hi.no