



UiT Norges arktiske universitet

Norges fiskerihøgskole

## Ufordøyelig binder i fôr til laks - evaluering av velferd og tilvekst

Kristina Finden Tronsen

Mastergradsoppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap, Havbruk (60 stp) | FSK-3960 | Mai 2021



Foto forside: Kristina Finden Tronsen

# **Ufordøyelig binder i fôr til laks – evaluering av velferd og tilvekst**

av  
**Kristina Finden Tronsen**

Mastergradsoppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap  
Fordypning Havbruk  
(60 stp)

Norges fiskerihøgskole  
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi  
UiT – Norges arktiske universitet



Mai 2021



## Forord

*Når jeg som 15 år gammel lærling på settefiskanlegg forstod hvor avgjørende diett var for god fiskehelse og tilvekst, har interessen for både fôr og ernæring stått sterkt. Det var dermed med stor iver jeg tok muligheten til å skrive en masteroppgave om hvordan binderen guar gum, et ufordøyelig karbohydrat, påvirker tarmhelsen og tilveksten til laks. Prosessen har vært svært lærerik med mange nye innblikk i forskerverdenen. Oppgaven markerer slutten på et 5 år langt kapittel ved Norges fiskerihøgskole. Fem krevende, men lærerike, utviklende og fantastiske år. Takk til alle medstudenter for fem fine år.*

*Tilknyttet masteroppgaven vil jeg først takke veilederen min Bjørn-Steinar Sæther for å ha stilt opp gjennom prosjektets praktiske del, behandling av data, skriveprosess og en alltid åpen dør. Ønsker å takke alle dyktige ansatte ved Havbruksstasjonen i Tromsø for å ha tatt vare på forsøksfisken, utført merking og daglig røkting før og under forsøksperioden. Retter også en stor takk til Fride Tønning for strålende veiledning gjennom de ulike histologiske stegene, positivitet og en alltid åpen dør. Vil også takke Skretting AS for forsøksfôrene og Siri Tømmerås, Fagsjef landbasert i Skretting Norge, for informasjon tilknyttet forsøksfôrene.*

*Til slutt vil jeg takke hele min fantastiske familie og mine fantastiske venner for utrolig støtte gjennom alle fem år. Tusen takk til mine nærmeste venninner her i Tromsø som alltid har vært der gjennom opp- og nedturer. Dere vet hvem dere er. Dere er gull.*

Tromsø, mai 2021



Kristina Finden Tronsen



## Sammendrag

Med stadig økning i produksjon av oppdrettslaks og et relativt lavt antall tilgjengelig vannkilder til smoltproduksjon, ser man økt bygging av RAS-anlegg. Ved rensing av produksjonsvannet er første vannbehandlingstrinn mekanisk filtrering etterfulgt av biofiltrering, rensesystemets flaskehals. Biofilteret renses vannet for nitrogenholdige molekyler (TAN), som er giftig for laks, og er sensitivt for organisk materiale i vannet. Renseeffekten til det mekaniske filteret er derfor avgjørende for optimal biofiltrering. Det meste av metabolitter og partikulært avfall i produksjonsvannet stammer fra fôr og feces. I den sammenheng er det en fordel med økt stabilitet og fasthet på avføringen til fisken slik at mest mulig avfall filtreres ut før biofilteret. Dette er mulig ved å tilsette den ufordøyelige karbohydraten guar gum (GG) i fôret. Tilgjengelig nyere forskning om GG's effekt på laksefisk er for det meste gjennomført på regnbueørret, der det per nå ikke er avdekket negative effekter med 0,3% innblanding. Et upublisert forsøk på laks i settefiskstadiet viste derimot flere negative effekter på tarmvev og tilvekst med 0,15% GG. I denne oppgaven blir sistnevnte resultater etterprøvd på laks (*Salmo salar*) i settefiskstadiet over en forsøksperiode på 24-25 dager, med følgende gjennomsnittlig vekt, biomasse og tetthet ved start; 64,39g +/- 6,74, 3,35 kg og 8,27kg/m<sup>3</sup>. To triplikate diettgrupper med 52 individer per kar føres kontinuerlig på hver sin diett under kontinuerlig lys og 12°C vanntemperatur. Fôrtypene er kommersielt produsert, der den ene gruppe får kontrollfôr og den andre får fôr med ukjent GG-konsentrasjon. Parameterne som undersøkes er fiskens vekt, lengde, spesifikk vekstrate, kondisjonsfaktor, lengde på mucosafolder (villi) i tarm og nivå av inflammasjon ved histologisk analyse av to tarmsegment fra midttarm. Effekt på fiskevelferd vurderes ut ifra tilvekst og tarmhelse, der eventuell inflammasjon og slitasje i tarmvev indikerer fare for redusert velferd. Resultatene viser ingen signifikant forskjell mellom diettgruppene ved noen av parameterne. Dette til tross for at kontrollfôret inneholdt vekstfremmende mineralmiks. Det ble observert slitte mucosafolder i begge diettgrupper, og uavhengig av gruppe ser man høyere inflammasjonsgrad i bakre deler av midttarm. Resultatene sammenlignes med samsvarende forskning, det diskuteres mulige årsaker til større inflammasjonsgrad i bakre deler av midttarm, mulige årsaker til slitte mucosafolder, og hva resultatene har å si for fiskens helse og velferd. Konklusjonen er at konsentrasjonen av GG som nyttes i dette fôret ikke har negativ effekt på tilvekst, tarmvev, fiskevelferd eller fiskehelse hos laks i settefiskstadiet.

## Liste over forkortelser

BBM	Børstesøm membran (engelsk: Brush border membrane)
BV	Bindevev
CV	Variasjonskoeffisienten (engelsk: Coefficient of Variation)
EtOH	Etanol
FF	Førfaktor
GC	Goblet cell
GG	Guar gum
Bindergruppe	Kar 1, 3, 5 føret på fø med guar gum
Kontrollgruppe	Kar 2, 4, 6 føret på kontrollfø
HE-farget	Hematoxylin og Eosin-Y farget
HiT	Havbruksstasjonen i Tromsø
k-faktor	Kondisjonsfaktor
LD24:0	Lys (light) i 24 timer i døgnet, og mørke (dark) 0 timer i døgnet.
LP	Lamina Propria
M1	Prøveuttak fremre del av midttarm
M2	Prøveuttak bakre del av midttarm
MF	Mucosafold
MP	Målepunkt
T	Måletidspunkt
T0	Målinger utført ved fordeling av fisk til forsøkskar (21.09.20)
T1	Målinger utført ved forsøksstart (05.10.20)
T2	Målinger utført ved forsøkslutt (29-30.10.20)
NSP	Polysakkarider som ikke er stivelse (engelsk: Non-starch polysaccharide)
PBS	Fosfatbufret saltvann (engelsk: phosphate Buffered Saline)
PIT-tag	Passive Integrated Transporter tag
RAS	Resirkulerende Akvakultursystemer (engelsk: Recirculating Aquaculture System)
rpm	Rotasjoner per minutt
SBM	Soyabønnemel (engelsk: Soy Bean Meal)
SC	Stratum compactum
SG	Stratum granulosum
SGR	Spesifikk vekstrate (engelsk: Specific Growth Rate)
SPC	Soyaproteinkonsentrat (Soya Protein Concentrate)
S.A.	Standardavvik
SV	Supranukleære vakuoler
TAN	Total ammonium nitrogen



# Innholdsfortegnelse

1	Bakgrunn .....	1
1.1	Akvakultur i Norge.....	1
1.2	Fôr og fôrråvarer .....	1
1.3	Resirkulerende akvakultursystem .....	3
1.4	Guar gum i RAS-fôr .....	5
1.5	Fordøyelseskanalen .....	6
1.5.1	Oppbygging av tarmveggen .....	6
1.5.2	Cellene i tarmepitel .....	8
1.6	Ernæring og velferd.....	10
1.7	Problemstilling .....	10
2	Material og Metode .....	11
2.1	Forsøksfisk og merking.....	11
2.2	Forsøksbetingelser.....	13
2.3	Forsøksdiettene.....	15
2.4	Vannstrømmåling .....	16
2.5	Fordeling av fisk til forsøkskar (21.09.2020).....	17
2.6	Forsøksstart (05.10.2020).....	18
2.6.1	Tarmprøveuttak .....	18
2.7	Forsøksslutt (29-30.10.2020) .....	19
2.8	Histologi .....	20
2.8.1	Kriterier for valg av individ til histologianalyse .....	20
2.8.2	Fremføringsmaskin; dehydrering og parafinfiltrering av vev .....	20
2.8.3	Innstøpning i parafinwax.....	21
2.8.4	Snitting av prøvene.....	22
2.8.5	HE-farging av snitt .....	23
2.8.6	Mikroskopi .....	25

2.8.7	Scoring .....	26
2.8.8	Lengdemåling av mucosafoldene.....	28
2.9	Dataanalyse .....	29
2.9.1	Spesifikk vekstrate .....	29
2.9.2	Kondisjonsfaktor .....	30
2.9.3	Variasjonskoeffisient.....	30
2.9.4	Fôrfaktor og biomasseøkning.....	30
2.9.5	Korrelasjonsanalyse .....	32
2.9.6	ANOVA .....	32
2.9.7	ANCOVA.....	32
2.9.8	Pearson Chi square .....	33
3	Resultat.....	33
3.1	Vekt- og lengdeutvikling.....	33
3.2	Spesifikk vekstrate .....	36
3.3	k-faktor .....	36
3.4	Utfôring .....	37
3.5	Histologi .....	38
3.5.1	Frekvens av score mellom grupper .....	38
3.5.2	Lengde på mucosafolder og angitt score.....	41
3.5.3	Mikrografi av snitt.....	43
3.6	Tarminnhold.....	47
4	Diskusjon.....	48
4.1	Vekstdata.....	48
4.2	Histologi .....	52
4.3	Karforhold og fôring .....	57
5	Konklusjon .....	59
	Referanseliste .....	60

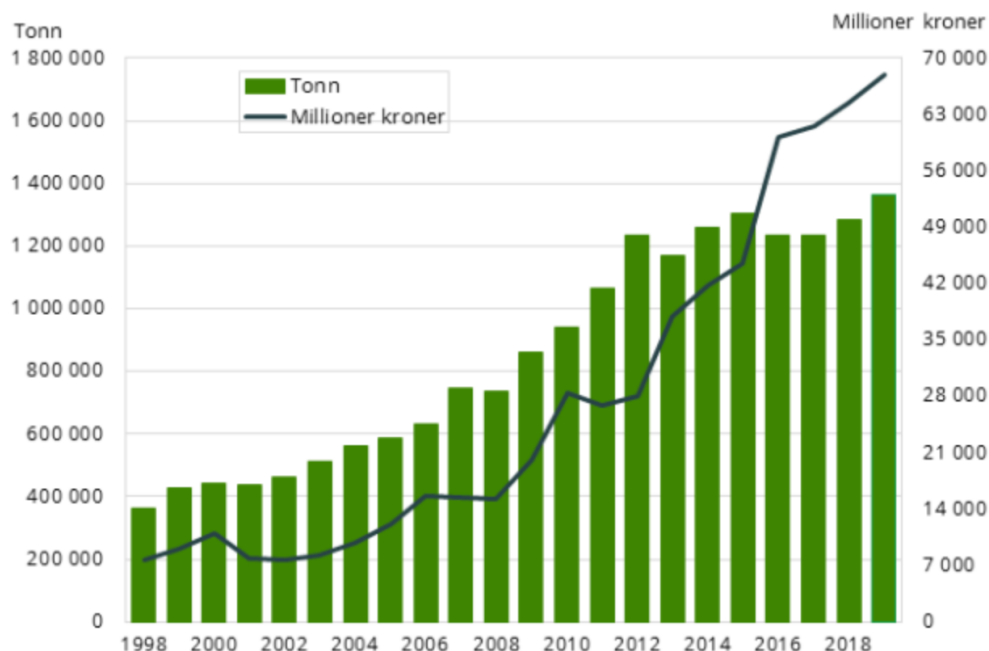
Internettkilder .....	72
Annet .....	73
Kompendium .....	73
Upublisert materiale .....	73
Program .....	73
Vedlegg 1 .....	74
Vedlegg 2 .....	75
Vedlegg 3 .....	77
Vedlegg 4 .....	78
Vedlegg 5 .....	79
Vedlegg 6 .....	80
Vedlegg 7 .....	81
Vedlegg 8 .....	82
Vedlegg 9 .....	83
Vedlegg 10 .....	84
Vedlegg 11 .....	85
Vedlegg 12 .....	86
Vedlegg 13 .....	87



# 1 Bakgrunn

## 1.1 Akvakultur i Norge

Oppdrett av laksefisk i Norge skjøt fart fra 1970-tallet. Siden har biologiske og teknologiske innovasjoner, gode naturressurser, gode geografiske produksjonsforhold, samt forvaltning, gjort Norge til verdens største produsent av Atlantisk laks (*Salmo salar*) (FAO, 2020; Hovland, 2014), heretter omtalt som laks. Næringen har vært en kommersiell suksess for landet (Hersoug, 2015) med rask økning i produksjonen fra sent 1990-tallet frem til i dag (figur 1). Økt lakseproduksjon krever tilsvarende økning i fôrproduksjon som har tvunget frem et skifte i bruk av fôrråvarer, fra hovedsakelig å bestå av marine råvarer til dominerende innhold av vegetabiliske råvarer (Ytrestøyl m.fl., 2015).



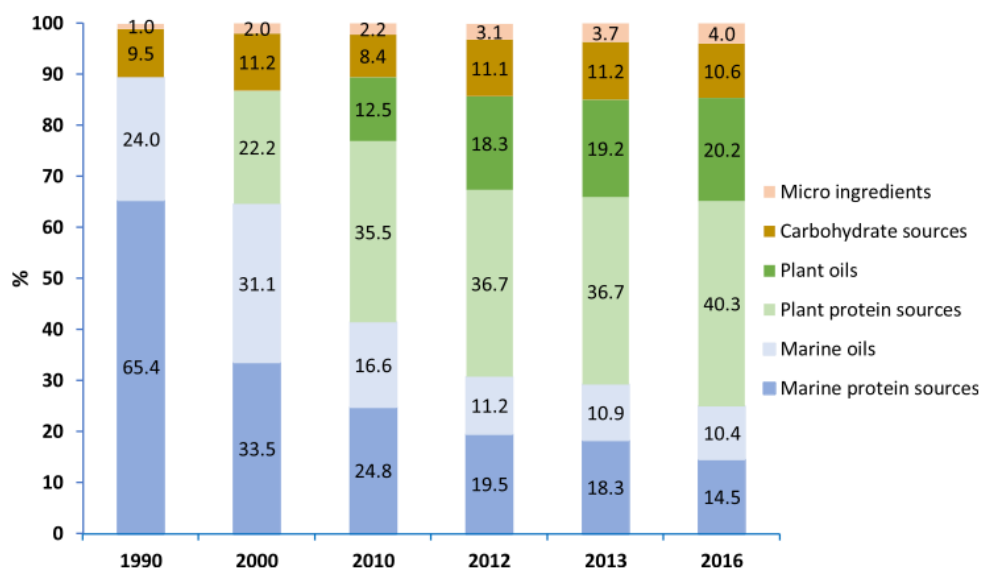
Figur 1. Solgt mengde norsk laks og førstehåndsverdi i 1998 frem til 2019. Kilde: figur; Baklien, 2020, datasett; Fiskeridirektoratet, 2020.

## 1.2 Fôr og fôrråvarer

De fire største fôrprodusentene i Norge per tidspunkt er Skretting AS, Cargill (EWOS), Biomar og Mowi Feed. I 2019 var produksjonen av laks 1 364 042 tonn (Fiskeridirektoratet, 2020), samsvarende var produksjon av fôr 1 726 297 tonn (Fiskeridirektoratet, u.å).

Fôret er sammensatt av råvarer som er kilder til makronæringsstoffene protein, fett, karbohydrat, og mikronæringsstoffer som vitamin, mineral, samt astaxanthin. Tradisjonelt var

fiskemel og fiskeolje de viktigste ingrediensene i fôr til laksefisk (Moldal m.fl., 2014), samsvarende med laksens naturlige diett (Aas m.fl., 2019). Disse råstoffene er ideell kilde til protein, fett og er lettfordøyelig (Gatlin m.fl., 2007 referert i Sørensen m.fl., 2011 s. 6; Sørensen m.fl., 2011). Som følge av økt fokus på bærekraftig produksjon av fôr og laks, pris, og at produksjon av fiskemel og fiskeolje er stabil, men begrenset (Hardy, 2010; Naylor m.fl., 2009; Powell, 2003), har ingrediensene i fôret i stadig større grad blitt erstattet av plantebaserte råvarer. Siden 1990 til 2013, har den totale andelen marine råvarer blitt redusert fra 90% i 1990, til i underkant av 25% i 2016 (figur 2). Det er en reduksjon av marine råvarer på 72%, erstattet med landbaserte ingredienser (Aas m.fl., 2019; Ytrestøyl m.fl., 2015).



Figur 2. Endring i fôrsammensetning i norsk laksefôr. Ingrediensene utgjør % av fôr. Kilde: Aas m.fl., 2019.

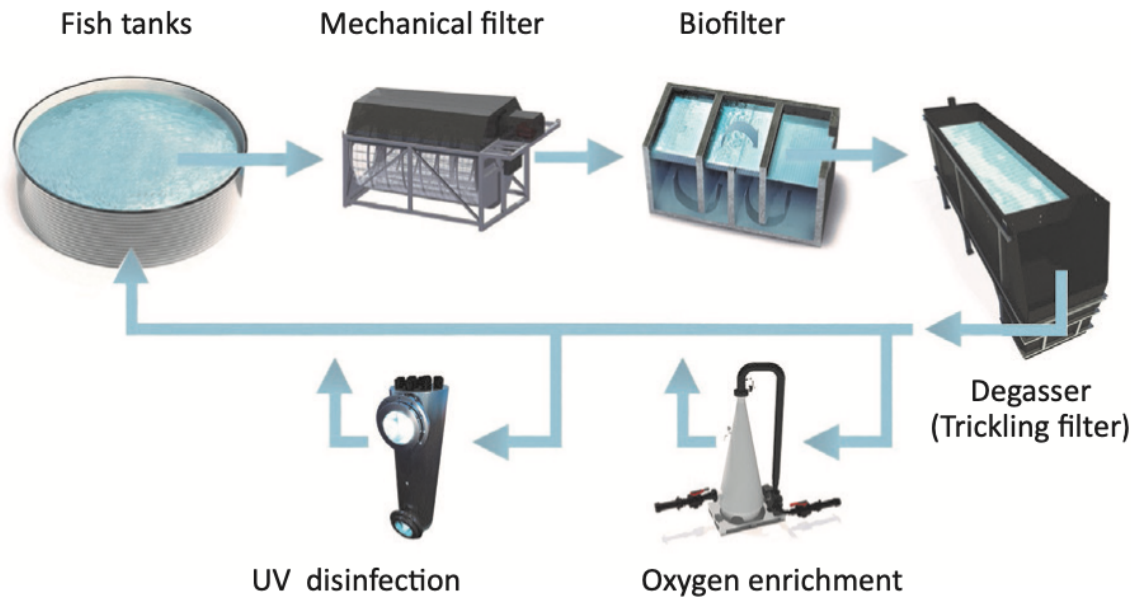
Laks er en karnivor fiskeart og dermed ikke tilpasset et kosthold med vegetabiliske råvarer. Effekten av overgangen fra nesten helt marint fôr til 70% planteråvarer bør derfor overvåkes i forbindelse med fiskevelferd og fiskehelse (Hjeltnes m.fl., 2016; Naylor, 2009). Egenskaper ved avføringen kan også påvirkes av denne råvaresammensetningen. Deriblant har høye nivåer vegetabiliske proteinkilder vist å kunne føre til løsere avføring hos laksefisk, med økt vanninnhold i kymet i baktarm (Hu m.fl., 2016; van den Ingh, 1991). Det høye vanninnholdet i feces kan blant annet være resultat av osmotisk aktive molekyler av polysakkarider som ikke er stivelse (NSP) (Francis m.fl., 2001), og ufordøyelige oligosakkarider som er osmotisk aktive (Krogdahl m.fl., 2010). I følge Krogdahl m.fl. (2010) er det heller ikke usannsynlig at antinæringsstoffer i vegetabiliske råvarer kan føre til diaré. Videre har Brinker & Friedrich (2012) vist at 100% erstatning av fiskemel med vegetabiliske ingredienser gir en feces som raskere går i oppløsning til små partikler.

### 1.3 Resirkulerende akvakultursystem

Laks er en anadrom fiskeart. Den gyter, og dermed lever, første del av livet i ferskvann, for etterhvert å smoltifisere og bli klar for næringsvandring i sjøvann. Når laksen blir kjønnsmoden returnerer den til elva og ferskvann for å gyte (Hansen, 1987). Ved tradisjonell produksjon av laks, kultiveres fisken i ferskvannsanlegg på land frem til den blir smolt, såkalt settefisk. Settefisk overføres (settes) i sjø, der den produseres videre til oppnådd slaktevekt.

Norge er et land med store, gode ferskvannsressurser, men tilgangen på rene vannressurser for fiskeoppdrettsnæringen er begrenset (Kittelsen m.fl., 2006; Hilmarsen m.fl., 2018). I takt med at næringen vokser, er det mindre bærekraftig å bygge tradisjonelle gjennomstrømningsanlegg til produksjon av smolt, der vannet forbrukes én gang, renses og slippes ut i naturen. I denne sammenheng har det de siste årene vært klar dreining mot bygging av Resirkulerende Akvakultursystemer (RAS) på land, ved etablering av nye lakseproduksjonsanlegg (Hilmarsen m.fl., 2018; Sommerset m.fl., 2020). I RAS-anlegg produseres mer fisk på mindre vann (Bregnballe, 2015), man har større kontroll på biologisk materiale og større allsidighet for plassering (Hilmarsen m.fl., 2018; Summerfelt m.fl., 2009). Et RAS-anlegg er mindre avhengig av en stor vannkilde som gjør etablering av RAS-anlegg i forhold til vannressurser mer fleksibel, og kan plasseres på mer taktiske områder i forhold til produksjon, foredling og marked sammenlignet med et gjennomstrømningsanlegg.

I et RAS-anlegg med høy resirkuleringsgrad gjenbrukes vanligvis 99% av vannet (Hilmarsen m.fl., 2018). For å rense vannet består et RAS-anlegg av flere tekniske konstruksjoner med avansert teknologi og mekanismer, og er mer teknisk krevende enn gjennomstrømningsanlegg. Produksjonsvann i landbaserte anlegg forringes ved at fisken tar opp oksygen, produserer karbondioksid og metabolitter fra stoffskiftet, samt ekskresjon av feces og fôrspill. En av flere metabolitter som fisken skiller ut er ammoniakk, et avfallsprodukt fra proteinmetabolismen, som er direkte giftig for fisk, og må filtreres ut av vannet. Produksjonsvannet renses ved følgende vannbehandlingstrinn; fiskekar → partikkelfjernende enhet (mekanisk filter) → biologisk filter → lufting av overflødige gasser → eventuell desinfisering → eventuell protein-skimmer → oksygentilsetting → fiskekar (V. Mota, forsker i Nofima, personlig kommunikasjon, 18. januar 2021) (figur 3).



Figur 3. Skjematisk oversikt av grunnleggende vannbehandlingsprinsipper i et RAS-anlegg. Vannet behandles ved mekanisk filtrering, biofilter, lufting (degassing), oksygentilsetning, og eventuell desinfisering før gjenbruk i fiskekaret. Kilde: Bregnballe, 2015.

Det er essensielt at første vannbehandlingssteg etter fiskekaret er en partikkelfjernende enhet som fjerner feces, fôr og slam. Dette fordi partikler i vannet, samt mye næringsstoff, reduserer rens effektiviteten til biofilteret som er neste steg i vannbehandlingen. I biofilteret renses vannet for ammoniakk/ammonium (Total ammonium nitrogen, TAN) ved hjelp av nitrifiserende bakterier, der reduksjon i biofilterets renseseffekt følgelig kan ha alvorlige konsekvenser for fiskehelsen. Det er vist en lineær sammenheng mellom økt mengde organisk materiale og nedadgående effekt av TAN-nedbrytningen i biofilteret. Dette som følge av at økt organisk materiale (karbon/C) i forhold til nitrogen (N) (C/N), gir økt mengde heterotrofe bakterier grunnet mye substrat/næring (Ling & Chen, 2005). Store mengder heterotrofe bakterier (som produserer ammonium i sin metabolisme) fører til konkurranse med de autotrofe nitrifiserende bakteriene om plass i biofilteret og tilgjengelig oksygen, som etterhvert senker biofilterets renseseffekt (Michaud m.fl., 2006). Av denne grunn er det viktig med et effektivt mekanisk filter som tar opp mest mulig organisk materiale for optimal reduksjon av TAN. For å øke filtreringseffekten av vannet er det derfor en stor fordel at fisken sin avføring er fast og stor, slik at mest mulig filtreres ut og ikke går i oppløsning. En måte å manipulere feces til å bli fastere og mer stabil, er ved tilsetning av den ufordøyelige karbohydraten guar gum (GG) i fôret.

I biofilteret forekommer nitrifikasjon ved hjelp av levende, autotrofe bakterier som danner biofilm på mediet som beveger seg rundt i biofilteret. Disse bakteriene er to aerobe



bakterieslekter som reduserer ammonium-konsentrasjonen ved nitrifikasjon i to steg. Først brytes ammoniumionet ( $\text{NH}_4^+$ ) ned til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ). Deretter blir nitrogenholdige molekyler denitrifisert fra nitritt til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) (Hjeltnes m.fl., 2012). Nitrat betraktes som ufarlig for fisk, med mindre det kommer opp i svært store konsentrasjoner (Bregnballe, 2015). Neste vannbehandlingstrinn er lufting av vannet der overmetning av uønskede gasser frigjøres til omgivelsene (degassing). Deretter kan vannet desinfiseres, og noen anlegg har protein-skimmere som fjerner proteiner og fettstoffer fra vannet (Sterner AS, u.å.). Til slutt tilsettes oksygen før vannet er klart for gjenbruk. Nytt vann tilsettes ved behov.

## 1.4 Guar gum i RAS-fôr

Småpartikulære stoffer i vannet stammer hovedsakelig fra fôr og fiskeavføringen som løses opp (Brinker m.fl., 2005B; Summerfelt, 1998; Wheaton & Singh, 1999).

Vannrensekonstruksjonene i RAS-anlegg konstrueres derfor basert på maksimal fôrbelastning (Hjeltnes m.fl., 2012), og resirkuleringsgraden kan defineres som vannutskifting per dag per kilo fôr (Fjellheim m.fl., 2016).

Nedbrytning av feces og fôrpartikler frigir mye av total nitrogen og fosfor som fører til økt mengde næringsstoffer i vannet (Summerfelt, 1998). Næringsstoffer og partikulært avfall som ikke fanges opp av det mekaniske filteret vil etterhvert akkumulere i RAS-systemet (Davidson m.fl., 2009; Davidson & Summerfelt, 2005). I tillegg til at dette fører til redusert biologisk filtrering, kan høy andel småpartikulært stoff være direkte skadelig for fisken som følge av redusert gjellehelse/gjelleskade (Bash m.fl., 2001; Bullock, 1997; Chen m.fl., 1993; Davidson m.fl., 2009), samt foreslår Bruton (1985), Patterson m.fl. (1999) (referert i Brinker m.fl., 2005B s. 255) og Bash m.fl. (2001) at det kan føre til stress hos laksefisk.

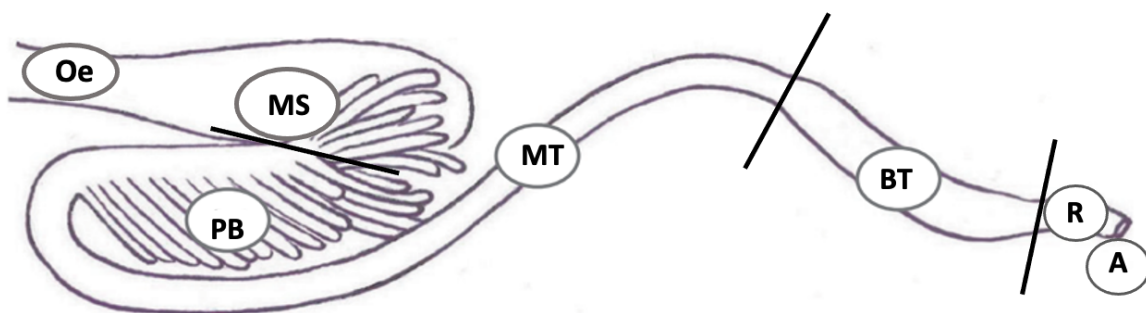
Å fjerne små partikler fra vannet er nødvendig, men en dyr teknologisk utfordring i RAS-anlegg (Cripps & Bergheim, 2000; Patterson m.fl., 1999). Løse avføring hos laksefisk som følge av vegetabiliske fôringredienser er derfor uheldig i sammenheng med produksjon i RAS-anlegg. Tilsetning av GG i fôr til regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) har vist å føre til en mer stabil og fast avføring, og gir et skifte i størrelsesfordelingen av fecespartiklene til større andel store partikler (Brinker m.fl., 2005A; Brinker 2007, 2009; Brinker & Friedrich, 2012). Dette har i tur gitt økt mekanisk filtreringseffekt (Brinker m.fl., 2005A, 2005B; Brinker, 2009), og redusert lekkasje av næringsstoffer som fosfor og nitrogen (Brinker m.fl., 2005A; Brinker m.fl., 2005B). Disse resultatene vil totalt sett reduserer belastningen på det biologiske filteret, føre til økt renseeffekt og rensekapasitet, og medvirke til bedre fiskevelferd.

## 1.5 Fordøyelseskanalen

Fordøyelsessystemet består av flere organer og vev som har et tett og effektivt samarbeid om å gjøre næringsstoffer i mat tilgjengelig for organismen (Krogdahl, 2001; Olsson, 2011).

Systemet er viktig for opprettholdelse av ione- og vannbalansen (osmoregulering), og forsvare organismen mot patogene mikroorganismer og andre uønskede komponenter som entrer systemet (Olsson, 2011; Olsson & Holmgren, 2011).

Fordøyelsessystemet starter med munnen som går over til svelg, magesekk, midttarm, baktarm, rektum og anus (figur 4). Tilleggsorganer til fordøyelsessystemet er lever som produserer galle lagret i galleblæren og pankreas som sekreser enzymer (eksokrin del) og hormoner (endokrin del) (Axelsson & Seth, 2011). I denne oppgaven om laks brukes følgende nomenklatur på fordøyelsessystemet; fortarm som består av spiserør/oesophagus og magesekk. Distalt for pylorus lukkemuskel som skiller magesekk og tarm, starter midttarmen som strekker seg til baktarm med synlig større diameter. Fremre deler av midttarm er omsluttet av pylorusblindsekkene, omtrent 70 hos laks (Kryvi & Totland, 1997). Baktarm går videreover til rektum, som er kort hos laks (Krogdahl, 2001), og ender i anus som holdes lukket av en ringmuskel.

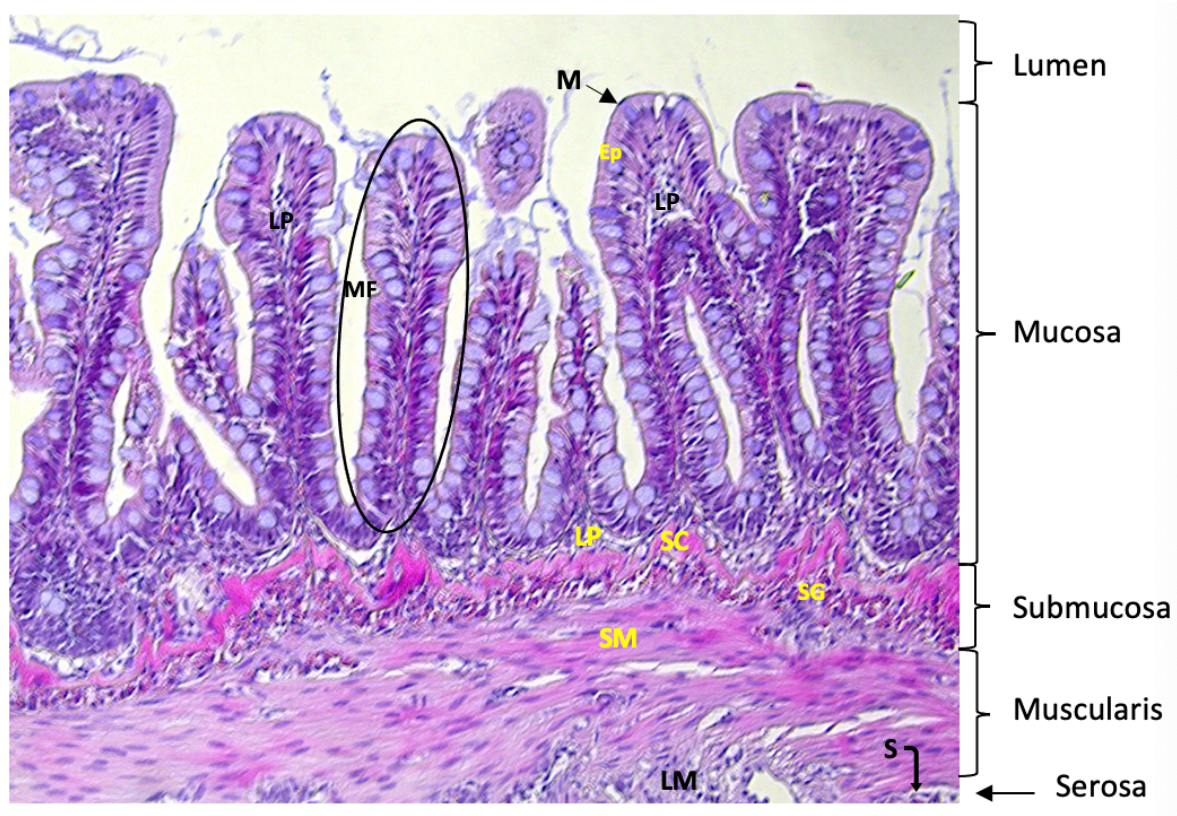


Figur 4. Segmentinndeling av tarmkanalen til laks. Oe=oesophagus, MS= magesekk, PB= pylorusblindsekkene, MT= midttarm, BT= baktarm, R= rektum, A= anus. Modifisert illustrasjon fra Moldal m.fl., 2014.

### 1.5.1 Oppbygging av tarmveggen

Tarmveggen er bygd opp av flere lag (se figur 5). Lagene er de samme gjennom tarmkanalen, men tjuknelsen varierer (Olsson, 2011). Nærmest lumen er mucosa. Mucosa danner tverrgående folder, kalt primærfolder, som kan ha foldhøyder på over halvparten av tarmens omkrets (Kryvi & Totland, 1997), en tilpasning for å øke tarmens overflateareal og trolig øke passasjetiden til kymet (Olsson, 2011). Primærfoldene består av ytterlige utbuktninger, som kalles mucosafolder, villi, eller sekundærfolder (Kryvi & Totland, 1997). Mucosafoldene i

tarmen består for det meste av lange, tynne og enkle folder i pylorusblindsekkene og midttarm, mens i baktarm er det høyere andel komplekse/forgreinede folder (Bjørngen m.fl., 2020; Løkka m.fl., 2013). Man kan dele tarmveggen inn i to lag; mucosa og submucosa, etterfulgt av et muskellag. Mucosa sitt ytterste lag er et monocellelag av epitelceller som utgjør barrieren mellom det ytre (lumen) og det indre (vevet) i fisken. Epitelcellene er bundet sammen via bindeproteiner som danner tett celleforbindelse (engelsk: tight junctions), og reduserer diffusjon gjennom det paracellulære rommet mellom cellene (Jutfelt, 2011). Over epitelcellelaget/mucosa ligger en slimhinne; unstirred water layer som består av mucus, som skilles ut av goblet cellene (GC) i tarmveggen, og vann (Sundell & Rønnestad, 2011). Monocellelaget i mucosa er festet til basal-lamina (engelsk: basement membranen), som skiller epitelcellelaget og det underliggende lamina propria (LP), som er et løst bindevev (Kryvi & Totland, 1997) med sensoriske nervefibre og kapillærer (Krogdahl, 2001). Bindevevet i mucosafoldene, samt bindevevet under bunnen av mucosafoldene er LP (Løkka m.fl., 2013) og består av immunceller, blant annet fagocytotiske celler (Bjørngen m.fl., 2020; Jutfelt, 2011). Det andre laget i tarmen er submucosa. Submucosa består av stratum compactum (SC) som er et kompakt bindevevslag under LP og over muscularis. På begge sider av SC finner man mye mastceller/mastocytter og eosinofile granulære celler som sannsynligvis er en viktig del av tarmens forsvar mot bakterier og parasitter (Bjørngen m.fl., 2020; Kryvi & Totland, 1997). På undersiden av SC kalles dette laget med løst bindevev og immunceller for stratum granulosum (SG). Etterfulgt av submucosa, ligger muskulaturen i tarmveggen; muscularis, som består av sirkulær og ytre langsgående glatt muskulatur. Mellom muskellagene er *plexus myentericus*, et tett nettverk av nervecellelegemer (bodies) og fibre. Ytterste lag er et monoepitel bindevev kalt serosa, som skiller tarmen fra bukhulen (Kryvi & Totland, 1997).



Figur 5. Oppbyggingen av midttarm til laks. Snittet er HE-farget og forstørret med obj. x10. L= lumen, M= mucus, Ep= epitelcellelaget, MF= mucosafold (innringet), LP= lamina propria, SC= stratum compactum, SG= stratum granulosum, SM= sirkulær muskulatur, LM= langsgående muskulatur, S=serosa. Illustrasjonsbilde: Kristina Finden Tronsen.

## 1.5.2 Cellene i tarmepitel

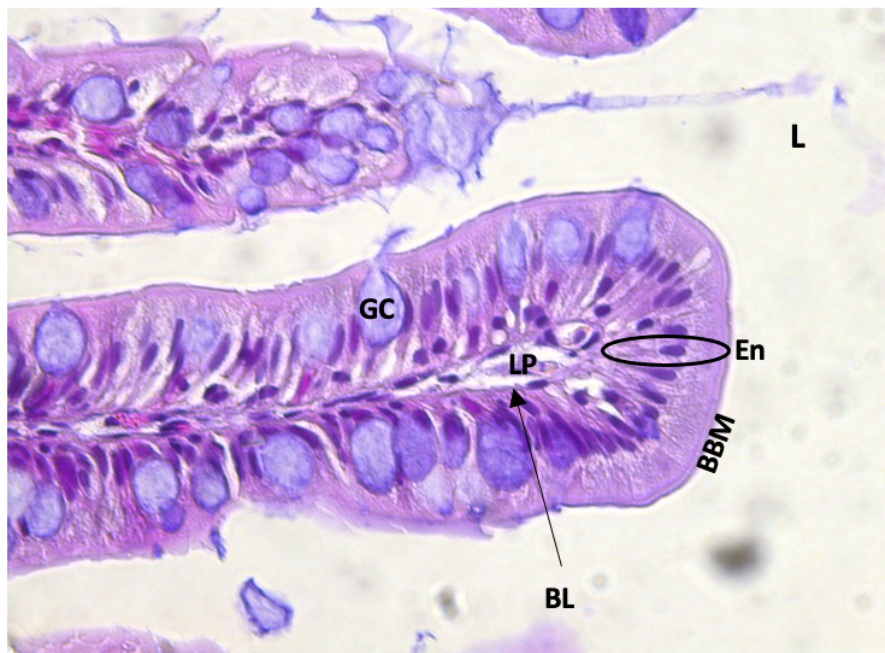
Cellene i tarmepitel består hovedsakelig av absorpsjonscellene enterocytter, mucusproduserende GC, endokrine celler og immunceller deriblant rodlet celler (Jutfelt, 2011). Hos laksefisker differensieres trolig nye epitelceller fra stamceller lokalisert i basen av primære og sekundære tarmfolder (Løkka m.fl., 2013). Cellene forflyttes fra bunnen av mucosafolden og oppover mot toppen, der cellene omsider avstøtes. Generelt har cellene i epitelet kort levetid og skiftes ut med noen få dagers mellomrom (Kryvi & Totland, 1997).

Tarmkanalen, samt gjeller og skinn hos fisk, er de mest utsatte innfallsporene for patogene mikroorganismer, der disse vevene er utviklet med fysiske og immunologiske barrierer for økt forsvar mot invasjon. Tilstanden til både celler og selve vevet i tarmkanalen er derfor vitalt for å holde individet friskt (Ringø m.fl., 2007).

### 1.5.2.1 Enterocytter

Enterocytterne er cellene i tarmepitelet som absorberer næringsstoffer. De er sylindrerformet, med basalt lokalisert cellekjerne (figur 6). Den siden av cellen som vender ut mot tarmlumen

kalles apikalmembranen, siden mot naboceller kalles lateral side, mens siden lengst fra tarmlumen kalles basalmembran og er festet til bindevevet basal-lamina, som holder epitelet på plass (Jutfelt, 2011). Den apikale overflaten av cellen består av utfoldinger, kalt mikrovilli, også referert til som børstesøm membran (engelsk; Brush border membrane (BBM)), som øker overflaten og absorpsjonskapasiteten i tarm omtrent ti ganger (Kryvi & Totland, 1997; Sundell & Rønnestad, 2011). I BBM finnes samtlige fordøyelsesenzymmer som utfører siste steg i fordøyelsen av næringsstoffer til små nok fragmenter som enterocytten kan absorbere (Bjørgeren m.fl., 2020). Komponenter blir absorbert via to hovedveier; transcellulært eller paracellulært (Sundell & Rønnestad, 2011). Selve enterocytterne fordøyer også næringsstoffene for egen energi. Enterocytter i midttarm kan inneholde noen få, små supranukleære vakuoler. Deres funksjon er opptak og transport av næringsstoffer fra tarmlumen til portalvenen (Johansson, 2014, s. 8).



Figur 6. Oppbyggingen av en mucosafold i midttarm til laks. Snittet er HE-farget og forstørret med obj. x40. L= lumen, LP= lamina propria, GC= goblet cell, En = enterocyt (innringet), BBM= børstesøm membran, BL=basal-lamina. Illustrasjonsbilde: Kristina Finden Tronsen.

### 1.5.2.2 Goblet celler

Goblet celler sekreterer mucus som dekker mucosafoldene og fyller rommene mellom mucosafoldene (Jutfelt, 2011). Mucus består av vann og muciner (mucins) som er høyt glykosylerte proteiner med høy vannbindingsevne. Mucus er viktig for å sikre at maten/kymet glir gjennom tarmen, og beskytter individet mot kjemiske påvirkningsfaktorer som syre, base og enzymer skilt ut av organismen selv, samt fysiske påvirkningsfaktorer som sliteskader fra

komponenter i dietten (Krogdahl m.fl, 2011; Montagne m.fl., 2004; Sinha m.fl., 2011). Komponenter i mucus beskytter også individet mot mikrober og kjemikalier som kan true fiskens helse (Krogdahl m.fl., 2011; Montagne m.fl., 2004). Mucus-produserende celler er funnet i epitelet i hele tarmsystemet; for-, midt- og baktarm, lever og pankreas. Antall GC og dermed mengde mucus varierer gjennom systemet fra lav i munn til høy i tarmregionene (Krogdahl m.fl., 2011). Formålet med økt antall GC bakover tarm er blant annet å lette passasjen av avføring som etterhvert blir tørrere (Kryvi & Totland, 1997).

## 1.6 Ernæring og velferd

Basert på flere samfunnssyn, norsk lovverk og forskere/vitenskap oppsummerer Noble m.fl. (2018) definisjon av dyrevelferd som «livskvalitet som oppfattet av dyret selv» (side 12). Viktige faktorer for god velferd er at fisken trives optimalt, vokser og holder seg frisk (Noble m.fl., 2018), der vekst og vekstrate kan brukes som velferdsindikator ved produksjon av fisk (Huntingford & Kadri, 2009). Dårlig ernæring kan trigge uønskede immunresponser (Bjørngen m.fl., 2020), føre til redusert kondisjonsfaktor, avmagring (lav vekt) og dårlig vekstrate (Noble m.fl., 2018) som dermed indikerer dårlig velferd. Fôr kan også inneholde komponenter som fysisk skader tarmoverflaten og gir innfallsport for patogene mikroorganismer, sopp og parasitter (Løkka & Koppang, 2016; Ringø m.fl., 2007). Et godt fôr som dekker fiskens behov er dermed avgjørende for god velferd.

## 1.7 Problemstilling

Tilsetning av GG i fôr er en metodikk som allerede nyttes i kommersielt fôr til laksefisk. Effekten av GG i dagens kommersielle fôr, er i utgangspunktet basert på studier på ørretarter, der en så langt ikke har sett negativ påvirkning tilknyttet tarmhelse, velferd, tilvekst eller utnyttelse (Brinker m.fl., 2005A; Brinker, 2007, 2009; Brinker og Reiter, 2011). I forsøket Feed'n'Treat (2014), et upublisert forsøk på laks i settefiskfasen, ble det derimot observert slitasje på tarmvev, samt mikroskopiske så vel som makroskopiske blødninger (Johnsen, 2012). Fisken viste også dårligere tilvekst, fôrutnyttelse og redusert fordøyelighet sammenlignet med kontrollfisk som fikk fôr uten GG (B.-S. Sæther, professor ved UiT-Norges arktiske universitet, personlig kommunikasjon, 2. september 2020).

I denne masteroppgaven var det ønskelig å etterprøve de tidligere negative funnene på laks, med fokus på fiskens tarmvev og tilvekst. Forsøket baseres på kommersielt produsert og tilgjengelig fôr. Bruk av GG er patentert, diettene er derfor fra Skretting AS.

Formålet med forsøket er å avdekke om den ufordøyelige binderen, guar gum, har negativ effekt på velferd hos laks (*Salmo salar*) i settefiskstadiet ved å påvirke tarmvev og tilvekst.

Spesielt var det ønskelig i denne oppgaven å undersøke:

1. forskjell mellom diettgruppene i vekt, lengde, spesifikk vekstrate og kondisjonsfaktor.
2. forskjell mellom diettgruppene i frekvens av histologisk vurdert inflammasjon og slitasje i midttarm
3. korrelasjon mellom histologisk vurdert grad av slitasje på mucosafolder i tarm ved bruk av scoresystem, og faktisk målt lengde.

## **2 Material og Metode**

To triplikate grupper laks ble føret på ulik diett, der en gruppe fikk fôr med GG, og den andre uten. Behandlingen pågikk over en vekstperiode på nesten fire uker. Vekstdata og histologiske analyser av tarmvev ble undersøkt og sammenlignet mellom diettgruppene.

### **2.1 Forsøksfisk og merking**

Forsøket ble gjennomført på Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT), avdeling Fiskehelselaboratoriet i Kårvika. Havbruksstasjonen i Tromsø, Landanlegget, mottok rogn av laks fra Aqua Gen Steigen 9. januar 2020 (for mer informasjon om stammen se vedlegg 1). Hvilke hendelsesforløp forsøksfisken har vært igjennom, og hvilket fôr den har fått tildelt i perioder er vist i tabell 1. Forsøksfisken er ikke vaksinert.

Tabell 1. Hendelsesforløpene forsøksfisken har gjennomgått fra mottak av rogn til forsøksslutt, og hvilket før (Skretting AS) den har fått tildelt i perioder. ST= Nutra ST (startfôr), NS = Nutra Sprint, NO= Nutra Olympic, RC= Nutra RC (recirculation).

Måned:	Januar	Februar	Mars	Apr.-Jun.	Juli	August	September	Oktober	Kommentar
Hendelse:									
HiT mottar rogn fra Aqua Gen	09.01.2020								
Klekking	23.01.2020								
Startfôring			07.03.2020						
Merking av fisk							11.09.2020		
Fisk overført fra Landanlegget til FHL							18.09.2020		En uke restitusjon etter merking av fisk
Fordeling av fisk til forsøkskar							21.09.2020		
Forsøksoppstart								05.10.2020	Forsøksoppstart etter 14 dager restitusjon etter fordeling
Forsøksavslutning								29-30.10.2020	Forsøksslutt etter 24-25 dager
Fôr (Skretting)			ST	NS	NS/NO	NO	NO		Forsøksfôr: RC og NO

Halvparten av forsøksfisken ble individmerket med Passive Integrated Transponder (PIT-tags) på Landanlegget 11. september 2020 og mellomlagret i eget kar. På grunn av smittevernrestriksjoner i forbindelse med koronapandemi, individmerket personell ved HiT fisken før forsøkshaver overtok den.

PIT-tag ID-100 er et indre individspesifikt merke som under bedøvelse legges inn i bukhulen til fisken. Når en scanner sender ut radiofrekvens fungerer merkene som en liten radio transponder, der en PIT-tag i nærheten av scanneren vil respondere med et signal som oppgir den unike ID-koden (Fishbio, 2010). Denne merkemethoden gjør at man kan følge individer i en dyregruppe over tid. I følge Mattilsynet er PIT-tag merking en skånsom merkemethode der bare selve merkeprosedyren er belastende, og eventuelt risikofyllt sett i forhold til infeksjonsfarer (Mattilsynet, u.å.).

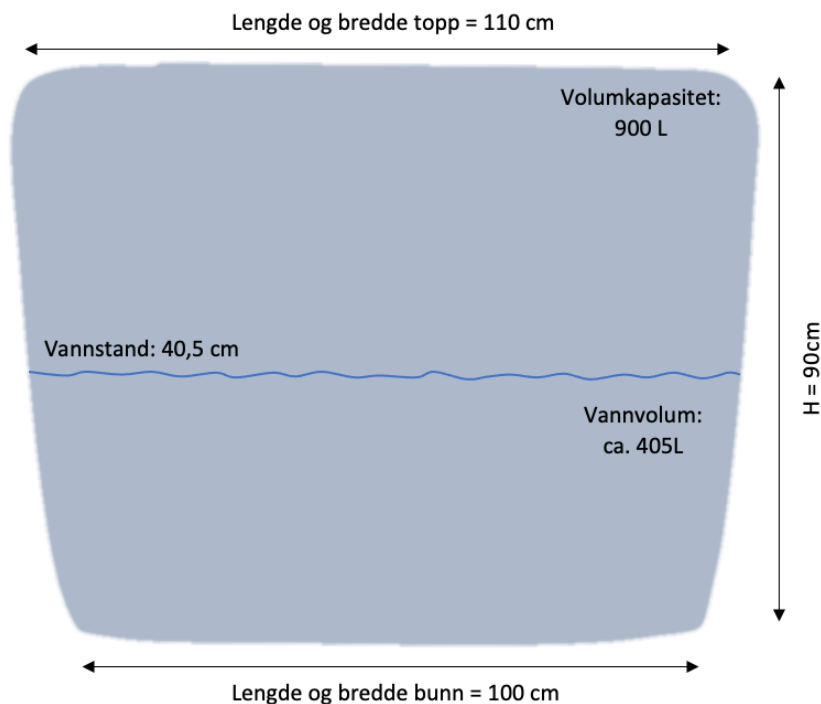
Det er flere fordeler med individuell merking, deriblant lav infeksjonsfare, lav fare for at de blir mistet, påvirker ikke individets adferd eller ytre utseende, påvirkes ikke av at dyret vokser, og fører ikke til økt dødelighet eller redusert vekst. I forsøkssammenheng der fisken ikke skal påvirkes av andre faktorer enn de som dyrene utsettes for i forsøksoppsettet, er det en stor fordel å bruke indre merking. Generelle ulemper er at man ikke kan se hvilke individer som er merket, slik at all fisk må scannes uavhengig om de er merket eller ikke. Og for å få ut merket må dyret ofte avlives.

Etter merking hadde fisken en uke restitusjonstid, før den merkede og umerkede fisken ble flyttet til hvert sitt holdekar på HiT, Fiskehelselaboratoriet, hall Fiskelageret, der forsøket skal gjennomføres.



## 2.2 Forsøksbetingelser

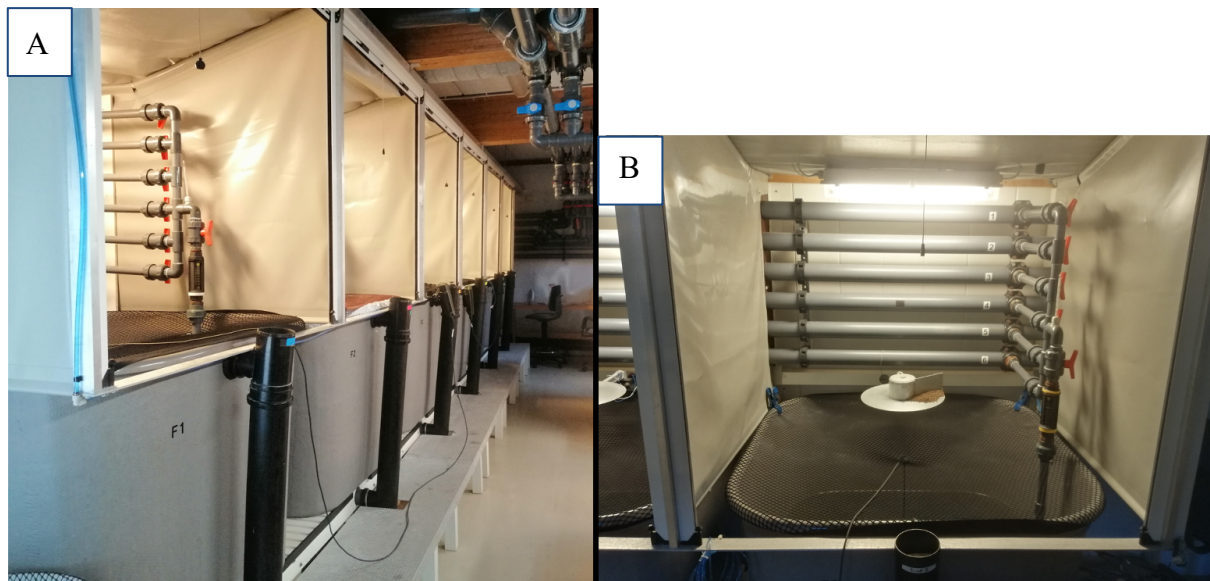
Forsøket gjennomføres i et gjennomstrømningsanlegg. Forsøksfisken er fordelt på seks forsøkskar, med et triplikat forsøksoppsett for å kontrollere for kareffekter. I hvert kar er det 52 individer, derav omtrent halvparten (25-27 stk) er PIT-tagget (vedlegg 8). Ved forsøksstart er gjennomsnittlig vekt for all fisk (vekt i gram +/- S.A.) 64,39g +/- 6,74, gjennomsnittlig biomasse og tetthet per kar er; 3,35 kg og 8,27kg/m<sup>3</sup> (vedlegg 11). Karene er firkantede, laget av glassfiber og dekket med lysegrå toppcoat (figur 8A). Karenes utforming med mål er vist i figur 7.



Figur 7. Karene er firkantede med forskjellig innvendige mål på lengde/bredde ved bunn og topp. Vannstanden i forsøkskarene holdes til 40,5 cm. Illustrasjon: Kristina Finden Tronsen

Karene står på rekke inntil en vegg, med skillevegg mellom hver enhet og i hver ende (Figur 8A og 8B). Kar 1 er nærmest hallens entré, og kar 6 er lengst unna (figur 8A). Over karet er det trukket et grovmasket hoppenett, med et større hull i senter over utløpet, tilegnet O<sub>2</sub>- og temperatursensoren (se svart ledning i figur 8B). Arbeid kan bare gjennomføres fra en side (fra hallen). Temperaturen holdes rundt 12°C og oksygenmetningen over 80%.

Temperatur (0,1°C) og oksygenmetning (%) ble målt daglig omtrent 5 cm over senteravløp mellom klokken 08:00 og 09:00 i alle forsøkskar (YSI, Pro Solo Digital Professional Series, USA). Verdiene fra forsøksperioden er vist i vedlegg 2.



Figur 8. (A) forsøkskarene er oppstilt inntil en vegg med skillevegger mellom alle kar. (B) alle innløpsrør er til høyre i karet, og over karene er det hoppenett, skiveautomat og lyslampe. Arbeid kan kun gjennomføres fra en side. Foto: Kristina Finden Tronsen

Over hvert kar henger en lampe og fôrautomat (skiveautomat) (se figur 8B). Lysregimet er satt til kontinuerlig lys (LD24:0) siden lys er den vekststimulerende faktoren som har størst innvirkning på vekst, og sees i sammenheng med fenomenet endogene biologiske rytmer (Stefansson & Nortvedt, 2001). Vekststimuli trigger appetitten, og slik er formålet med lysregimet å maksimere fôrintak og vekst hos fisken. Fisken fôres automatisk fra skiveautomaten (Aqua Produkter AS, Sunndalsøra, Norge). Fôringsstrategien er å overskuddsfôre fisken, med formål om at mattilgang ikke er en begrensende faktor for matinntak og tilvekst, samt redusere konkurranse og aggresjon rundt maten. Fôringen forekommer kontinuerlig gjennom hele døgnet med 20 sekunders fôringsintervaller. Estimert fôrmengde per døgn (se vedlegg 3), legges manuelt oppå skiveautomaten hver dag, og utføres i løpet av 24 timer.

Vannstanden i karet kan justeres, og eventuelt tappes, ved bruk av utvendig munk. Helt oppe på karkanten nærmest hallen, er det et rundt overløp med sil framfor med funksjon å lede avløpsvann ned i munken.

Vannvolumet i karene er 405L (se figur 7) og vanntilførselen er satt til 10 L per minutt. Innløpsvannet er oppvarmet ferskvann. Innløpet er et perforert vertikalt strålerør, 32 mm i diameter, plassert nærmest høyre karvegg (se figur 7B). Alle innløp er forskjellige. Se tabell 2 for informasjon om innløp i hvert kar. Over utløpet, i senter av karbunnen, er en firkantet sil. Silen er 21 cm bred, 24 cm lang, perforert med hull med 1 cm i diameter.

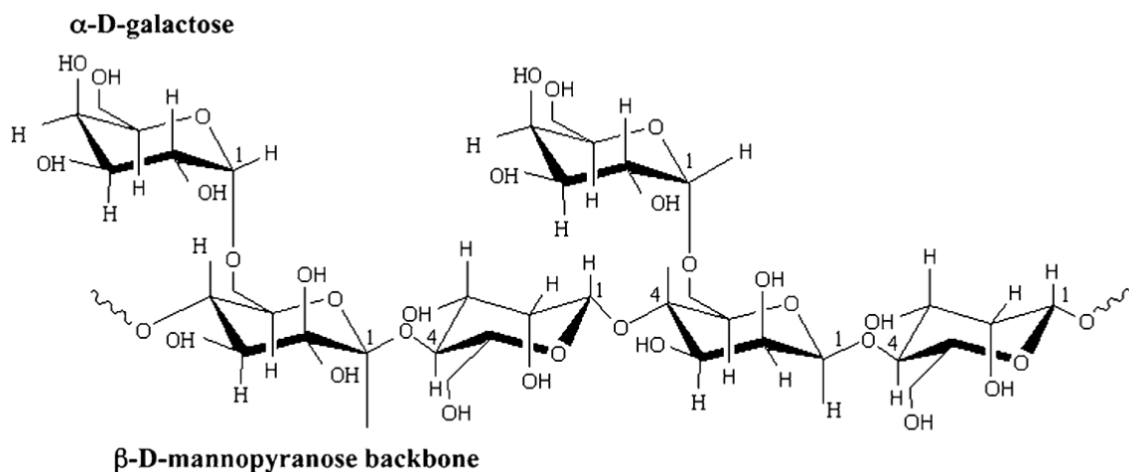
Tabell 2. Strålerørets posisjon og utforming i alle førsøkskar. \*Større hull.

Kar:	1	2	3	4	5	6
Avstand fra strålerør til høyre karvegg:	9cm	13cm	14cm	7cm	6cm	9cm
Avstand fra strålerør til karveggen nærmest hallen:	48cm	48cm	45cm	44cm	43cm	45cm
Antall hull i strålerør:	4	4	4	4	3*	5
Diameter på hull i strålerør:	6mm	5mm	5mm	5mm	7mm	5mm

## 2.3 Forsøksdiettene

Forsøksfôrene er de kommersielle typene Nutra RC (recirculating), med GG (binderfôr), og Nutra Olympic, uten GG (kontrollfôr), produsert og levert av Skretting AS. Begge fôrtypene er ekstrudert vekstfôr, produsert for laks og ørret i settefiskfasen. I løpet av 24-25 dager ble en diettgruppe fôret på binderfôr, og en annen på kontrollfôr. Diettene er basert på samme resept, der veiledende informasjon om råvareinnhold og produktegenskaper (protein, fett, energi, osv.) er den samme (vedlegg 4 og 5). Forskjellen mellom fôrtypene er at Nutra RC er tilsatt GG og Nutra Olympic er tilsatt en vekstfremmende mineralmiks (S. Tømmerås, Fagsjef Landbasert i Skretting AS Norge, personlig kommunikasjon, 10. oktober 2020).

Det er effekten GG har til å gjøre en masse mer viskøs (Mudgil m.fl., 2014) som er ønskelig å tilegne avføringen ved tilsetning i fiskefôr. Guar gum utvinnes fra endospermen til Indisk klyngebønne (*Cyamopsis tetragonolobus*). Den kjemiske strukturen består av en lineær ryggrad av  $\beta(1-4)$ -bundet D-mannose med  $\alpha(1-6)$ -D-galactose sidekjedder (Brinker 2007; Mudgil m.fl., 2014; Sethy m.fl., 2015) (figur 9). Guar gum er et vannløselig, ufordøyelig NSP. I følge Krogdahl m.fl. (2005) er det ingen karnivore fiskearter som kan nytte seg av NSP, og GG er ufordøyelig for de fleste monogastriske dyr, da de ikke har enzymer i mage-tarm kanalen som kan bryte  $\beta(1-4)$ -bindingene i molekylet (Hansen & Storebakken, 2007; Sinha m.fl., 2011).



Figur 9. Molekylær struktur av guar gum. Kilde: Mudgil m.fl., 2014.

I følge en review om GG av Mudgil m.fl. (2014) kan lengden på molekylet og mengden forgreininger variere og påvirke mengden hydroksylgrupper som kan interagere med vannmolekyler, og avgjøre hvor viskøst GG'et er (Mudgil m.fl., 2014; Sethy m.fl., 2015; Storebakken, 1985). Brinker (2007) kom frem til at høy-viskøs GG gav en signifikant høyere stabilitet på feces hos regnbueørret sammenlignet med mellom-viskøs GG.

Den ønskelige egenskapen GG har til gjøre flytende masse mer viskøs kan i følge Smits & Annison (1996) føre til redusert diffusjon og transport av lipase og miceller (referert i Sethy m.fl, 2015, s. 21) og hindre fordelingen av enzymer i kymet (Tran-Tu m.fl., 2018) som reduserer hydrolysegrad av næringsstoffer.

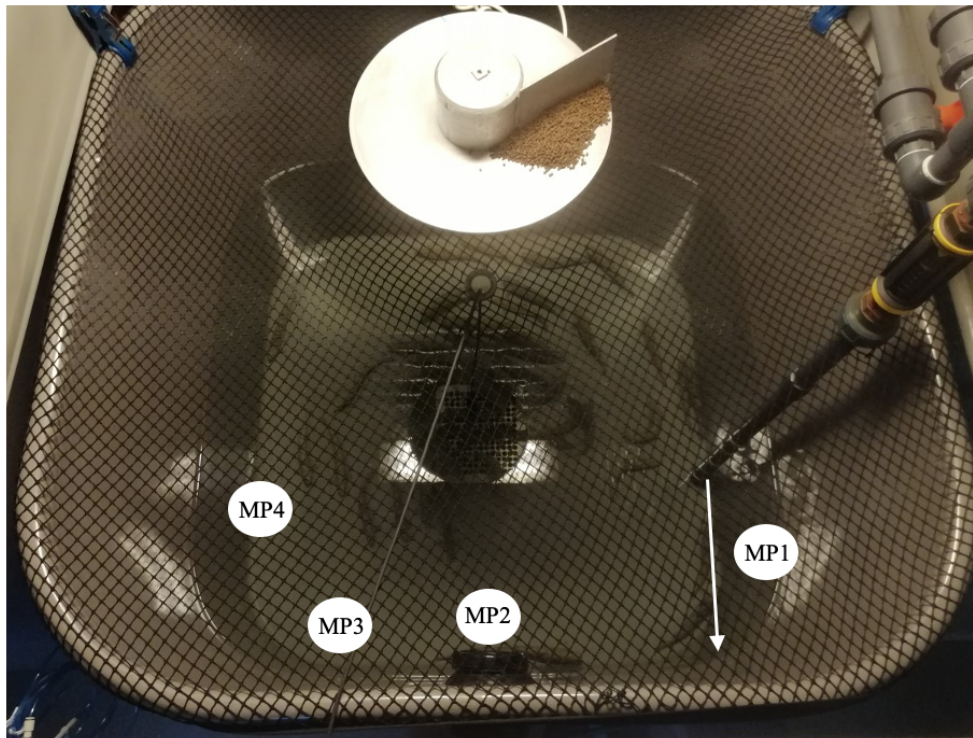
## 2.4 Vannstrømmåling

For å redusere vannstrøm i karene som potensiell variabel, ble innløpsrørene i alle kar justert for å få mest mulig lik vannstrømhastigheten på samme plass i karene.

Samme dag hver uke ble vannstrømhastigheten (cm/sekund) (se vedlegg 6) målt ved bruk av en propellstrømmåler av typen Vane – Wheel sensor type: md3/20829, produsert av HÖNTZSCH GmbH. Verdien oppgis på et håndholdt apparat med to målefunksjoner; kontinuerlig måling, og gjennomsnittsmåling over en tidsperiode på 20 sekunder. Sistnevnte ble brukt for å foreta målingene.

Det ble tatt 2-4 målinger på fire forskjellige målepunkter (MP) i karet (figur 10). Vannstanden i karene er 40,5 cm og strømmen ble målt ved omtrent 17 cm dyp, 2-3 cm fra karkanten. Som følge av forskjellig plassering av strålerøret i karene (se tabell 2 i kapittel 2.2), måles MP1 halvveges fra innløp til karkanten nærmest hallen (pil i figur 10).

Gjennomsnittlig vannstrømhastighet (cm/s) med standardavvik (+/- S.A.) ved MP 1, 2, 3 og 4 er henholdsvis 15,42 cm/s +/- 2,24; 8,82 cm/s +/- 1,65; 8,25 cm/s +/- 1,24; 8,42 cm/s +/- 1,23.



Figur 10. Vannstrømhastigheten (cm/s) ble målt på fire punkter (MP1-MP4) ved 17 cm dyp, 2-3 cm fra karveggen. Som følge av ulik posisjon av innløpet ble MP1 målt omtrent midt mellom innløpet og karkanten nærmest hallen (se pil ved MP1). Foto: Kristina Finden Tronsen

## 2.5 Fordeling av fisk til forsøkskar (21.09.2020)

Den merkede og umerkede fisken i hvert sitt holdekar var sultet i et døgn i forkant av håndteringen. Fisken ble lengdemålt (0,1cm) og veid (0,5 g) og fordelt sekvensielt i grupper på 5, til de 6 forsøkskarene. Dette sikret jevn fordeling (vekt) av forsøksfisk på forsøkskarene. Målingene utført ved dette tidspunktet omtales heretter som måletidspunkt 0 (T0).

Merket fisk ble fordelt først. Fisken ble bedøvet, scannet og registrert i et excelark (Microsoft Excel Versjon 16.45, © 2021 Microsoft Corporation) med tilhørende mål for lengde, vekt og tildelt forsøkskar. Lengdemål, vekt og kartilhørighet for umerket fisk ble plottet inn i samme excelark som den merkede fisken.

Lengde- og vektmålingene utføres av to personer; en som hover, håndterer og måler fisken; og en som registrerer i excel. Omtrent 10-15 fisk ble bedøvet om gangen med Benzoak Vet 200mg/ml (Virkestoff: Bezokain) (ACD Pharmaceuticals AS) i forholdet 0,15 ml/l vann (for oversikt over alle kjemikalier se vedlegg 13). Dette gir en lett bedøv fisk etter omtrent 3 minutter. Hvert individ kontrolleres for PIT-tag ved å scanne de med PIT-tag avleseren Biomark HPR+ (Biomark). Scanneren er koblet til en datamaskin med programmet TWedge

(TEC-IT Dataenverarbeitung GmbH), et konverteringsprogram som omgjør input fra scanneren til tastaturinput i excelarket. Etter scanning ble individet veid (Valor 3000 Xtreme Ohaus Modell: V31XH2, Ohaus Corporation) og gaffellengden målt ved bruk av et holdebrett. På holdebrettet skyves fiskens nesetipp inntil en plate i front (0 cm), for så å lese av gaffellengden. Deretter ble fisken overført til en bøtte med rent vann for kontrollert oppvåkning. Når de var ute av anestesien ble de overført til sitt respektive kar.

Som forberedende arbeid for best mulig utgangspunkt for vekstforsøket ble størrelsesfordelingen (vekt) per kar undersøkt ved bruk av histogram, for vurdering av behov for justering av størrelse i karene.

Etter fordelingen av fisk til forsøkskar, sto fisken under miljøbetingelsene satt for forsøksperioden (se kapittel 2.2) og ble overført på standardfôr (Nutra Olympic 3mm fra Skretting AS) i 2 uker for akklimatisering.

## **2.6 Forsøksstart (05.10.2020)**

Laksen ble sultet i et døgn før forsøksstart. Forsøkskarene ble fordelt sekvensielt på hver sin diett, der kar 1, 3 og 5 fikk binderfôr og kar 2, 4 og 6 fikk kontrollfôr. Antall fisk i forsøkskarene ble justert til samme antall, mål av lengde og vekt ble foretatt av alle individer (se beskrivelse i kapittel 2.5), og det ble gjennomført tarmprøveuttak til histologi (0-prøver). Målingene tatt ved forsøksstart omtales heretter som måletidspunkt 1 (T1).

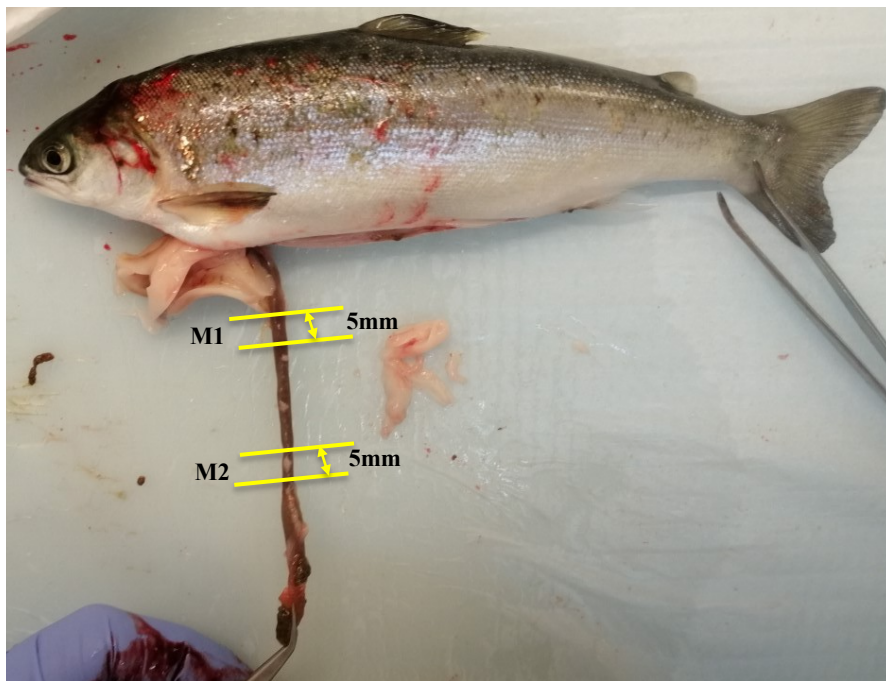
Ved reduksjon av antall fisk per kar til 52 individer, var det stort sett ønskelig å ta ut individer i øvre eller nedre størrelsessjikt (umerkede individer) basert på histogram av størrelsesfordelingen. Uttatt fisk ble avlivet med slag mot hodet ved bruk av en «prest».

Det ble tatt tarmprøver fra to individer per kar. Etter lengde- og vektmåling av all fisk per forsøkskar, gjennomførtes tarmprøveuttaket. Utvalget av 0-prøvene representerer hele størrelsesspekteret blant forsøksfisken slik at lengde eller vekt kan benyttes som kovariabel i analyser for å ha mulighet til å avsløre mulige forskjeller i utgangspunktet, som delvis kan forklares av størrelse. Minste og største fisk tatt ut for tarmprøve var 46,0 g og 92 g. Minste og største forsøksfisk ved forsøksstart var henholdsvis 49,0 g og 92,5 g.

### **2.6.1 Tarmprøveuttak**

Den bedøvede fisken ble avlivet ved slag mot hodet og lagt på is. Tarmprøveuttakene ble utført etter fremgangsmåten beskrevet av Johnsen (u.å.) i "Protocol for intestinal histology (Feed'n`Treat)" (upublisert).

Ved prøveuttak av tarm ble fisken først dekapitert, buken klippet opp og tarmkanalen eksponert ved å knipe den av ved gattet og strekke den ut. Uten å skifte grep med pinsetten ble fettvev rundt tarmen fjernet helt frem til pylorusblindsekkene, og denne delen av tarmen klippet opp på langs. Vevsprøve fra bakre del av midttarmen (M2, figur 11) ble tatt først ved å skjære av et segment (ca. 5mm) foran den lett synlige overgangen mellom midttarm og baktarm. Tilsvarende ble den fremste vevsprøven (M1) tatt ut ved å kutte tarmen like bak siste blindsekk (figur 11). Det er viktig å påse at en ikke klemmer eller skader vevet i prøvene, slik at dette bevares mest mulig intakt. Vevsprøvene ble skyllet med 10% fosfatbufret saltvannløsning (PBS) (Biowest) som var kjølt på is, før de ble overført til hver sin histologikassett (Cassettes, Q Path MicroStar II, VWR) for formalinfiksering (Merck) (37% formalin 1:10 PBS). Skyllingen førte til at tarmen vregnte seg med innsiden ut, noe som letter senere histologisk arbeid ved snitting. For god fiksering er det viktig at vevsprøvene er mellom 0.5 og 1 cm, og volumforholdet prøve:formalin er mindre enn 1:20.



Figur 11. Tarmprøveuttak. Tarmsegment M1 tas ved å kutte tarmen like bak siste pylorusblindsekk og 5mm bak. Tarmsegment M2 tas ved å kutte like fremfor den synlige overgangen til tjukktarmen og 5mm frem. Foto: Kristina Finden Tronsen

## 2.7 Forsøkslutt (29-30.10.2020)

Avslutningen av forsøket foregikk over to dager. Første dag (29.10.20) ble kar 1-3 tatt ut, andre dag (30.10.20) kar 4-6. Fisken var ikke sultet før forsøkslutt. All fisk per kar ble avlivet samtidig med overdose Benzoak (0,4ml/L).

Lengde og vektmålinger ble foretatt av all fisk (beskrivelse i kapittel 2.5), og tarmprøver ble bare tatt av merkede individer (beskrivelse i kapittel 2.6.1). Målingene tatt ved forsøkslutt omtales heretter som måletidspunkt 2 (T2).

Ved scanning og måling ble umerket fisk kontrollert avlivet ved slag mot hodet, og lagt i bøtte for dødfisk. Den merkede fisken ble lagt systematisk på is og gitt et løpenummer i excelarket, som følger individet resten av forsøket. Samme løpenummer er oppgitt på histologikassetene. Tarmprøveuttakene ble gjennomført i tre puljer per kar, det vil si at når omtrent 8 merkede individer var oppsamlet på is, ble prøveuttak til histologi gjennomført, for så å fortsette vekt-lengdemålingene. Gjennomførelse av et kar tok vanligvis 1 time og 40-50 minutter.

## **2.8 Histologi**

Histologi er læren om vevets normale oppbygging på mikroskopisk nivå (Holck, 2020). I dette forsøket er formålet å avdekke eventuelle avvik fra den normale mikroskopiske anatomi. Histologiprosessen omfatter følgende trinn; fiksering av prøvemateriale, dehydrering og parafinfiltrering, støyping, snitting, farging og mikroskopering.

### **2.8.1 Kriterier for valg av individ til histologianalyse**

Alle prøvene fra forsøksstart (0-prøvene) ble histologisk analysert, mens prøver fra forsøkslutt ble i første omgang valgt ut basert på individers spesifikke vekstrate (SGR), og deretter vektfordeling mellom gruppene. Fra hvert kar ble individet med minst og størst SGR valgt ut. Individer som har vokst raskest (høy SGR) har spist mer og vært mest eksponert for binderen, enn de som har vokst tregest. Slik kan det være større negativ effekt i tarmen til rasktvoksende individer. Dårlig vekst (lav SGR) blant individer kan komme av større slitasje i tarm, til tross for at man da trolig ville sett dårlig vekst blant hele fiskegruppen. Videre ble det valgt ut et tilfeldig individ med SGR nærme gjennomsnittlig SGR for respektivt kar.

Individene valgt ut basert på SGR ble sortert etter vekt på diettgruppenivå, for deretter å supplementære gruppene med ekstra individer fra alle kar for en sammenlignbar vekstrange i gruppene.

### **2.8.2 Fremføringsmaskin; dehydrering og parafinfiltrering av vev**

En liten uke før tarmprøvene skulle behandles i fremføringsmaskinen ble formalinet som histologikassetene lå i, erstattet med 70% etanol (EtOH) for å starte dehydrering av vevet.



For å få 70% etanol blandes 730 ml 96% etanol (AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals) og 270 ml destillert vann (MilliQ). Selve bytte av væskene forekommer i avtrekksskap.

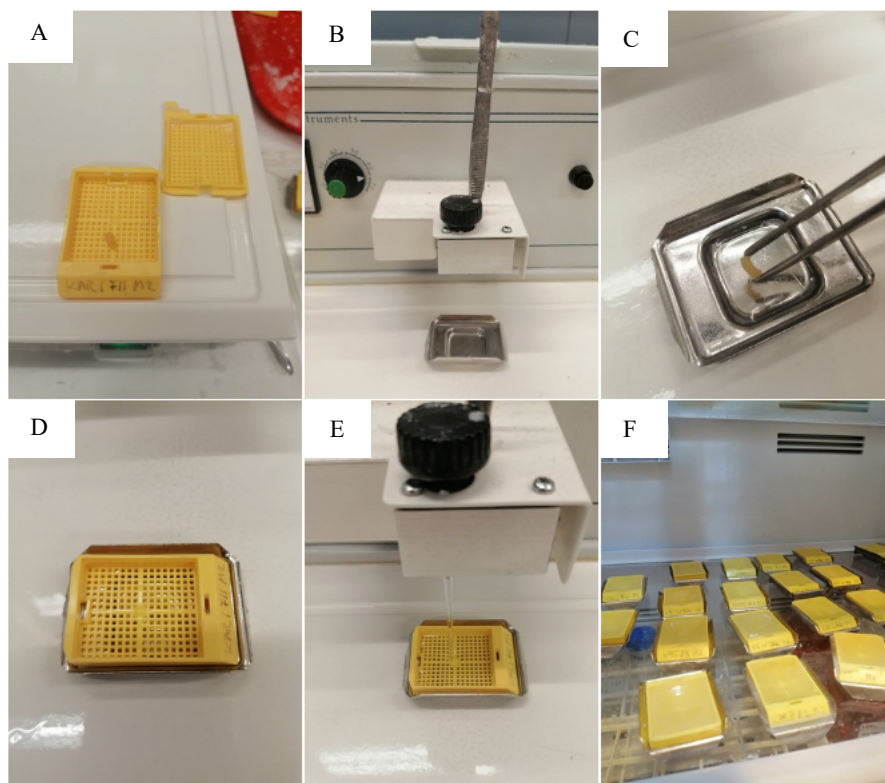
Dehydrering av vevet forekommer også i fremføringsmaskinen, og er et essensielt steg for at waxen skal kunne trekke inn i vevet, da vann og wax frastøter hverandre (Mumford m.fl., 2007).

I fremføringsmaskinen Citadel 2000 Wax Bath (Thermo Scientific™) dehydrerer alkoholen vevet slik at vannet i vevsbitene erstattes med etanol. Histo-Clear (National diagnostics) klarer vevet og fjerner alkoholen slik at Histowax (Histolab Products AB), heretter omtalt som parafinwax, kan infiltrere og avstive vevet (Mumford m.fl., 2007). Prøvene bades i kjemikalier etter følgende program; 2 x 2 timer i 96% EtOH, 2 x 2 timer i 100% EtOH (AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals), 1 x 1 time i 1:1-blanding 100% EtOH:Histo-Clear, 3 x 1 timer i Histo-Clear, 1 x 1 time i 1:1-blanding Histo-Clear:Parafinwax, 1 x 2 timer i Paraffinwax (minimum to timer).

### **2.8.3 Innstøpning i parafinwax**

Etter parafininfiltrering av vevsbitene, støpes vevet inn i blokker med parafinwax (figur 12A-F) ved bruk av Wax Dispenser WD-4 (Kunz, Hogbloms AB). Tarmvevet er skjært ut fra tarmkanalen med et krossnitt, og åpnet med et lengdesnitt. Prøvene støpes inn langsgående med mucosa utover. Parafinwaxen smeltes ved 60°C, 2°C over smeltepunktet (56-58°C), som anbefalt av produsenten Histolab Products AB (Histolab Products AB, u.å.).

Histologikassetten med vevsprøvene i, og innstøpningsbrønnene, legges oppå den varme arbeidsplaten på Wax Dispenseren (omtrent 60°C), slik at overflødig wax fra vevsprøvene smelter bort, og brønnene blir oppvarmet. Først tilsettes litt wax i bunn av brønnen før vevsprøven overføres til senter ved bruk av en oppvarmet pinsett. Kassetten (uten lokk) legges oppå brønnen, og kassetten og brønn fylles med wax. For å unngå at vevsprøven i brønnen flytter på seg ved oppfylling, lar man wax-strålen treffe senter av kassetten. Waxblokkene settes til side for nedkjøling og i kjøleskap (4°C) over natt.

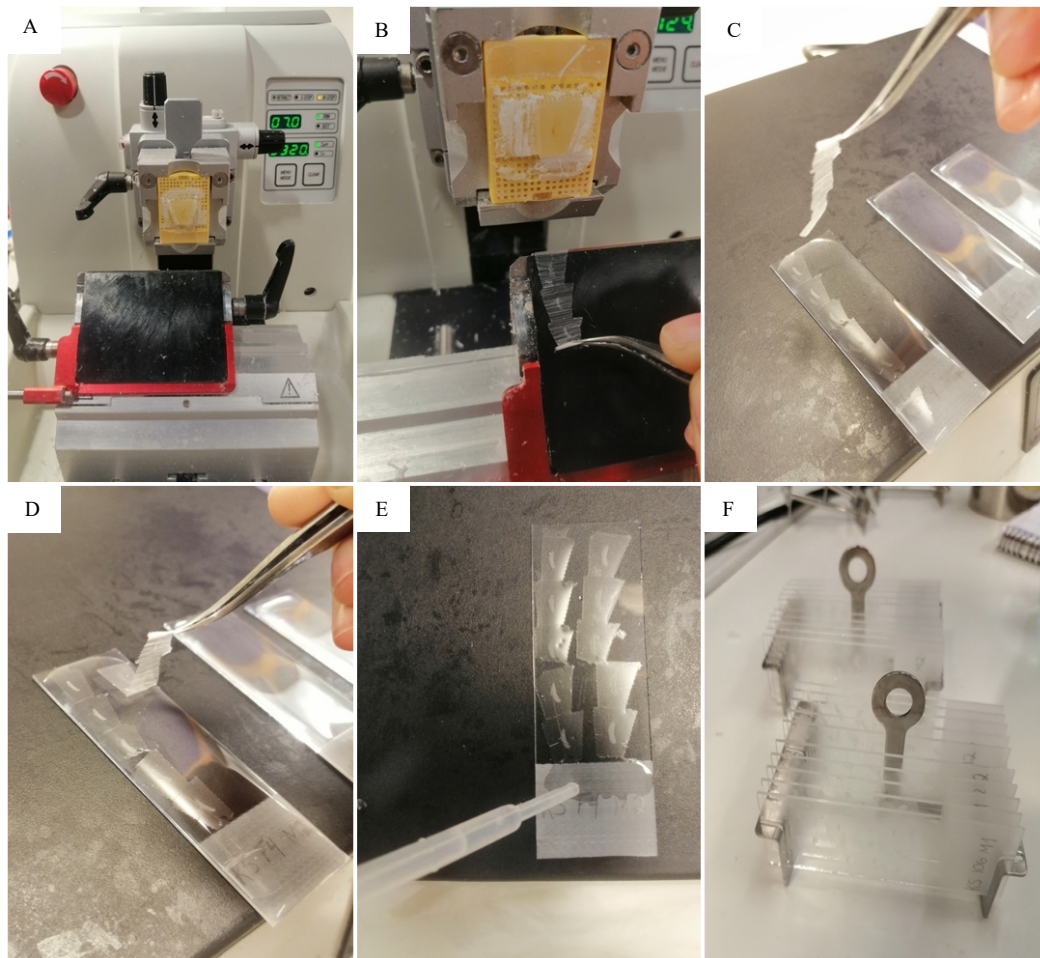


Figur 12. (A) Ved innstøping av vevsprøver knekkes lokket på histologikassetten av og kastes, overflødig wax på vevsbiten smeltes bort ved oppbevaring på varmeplaten Wax Dispenser WD-4 (Kunz, Hogbloms AB). (B) En liten dråpe wax helles i brønnen, (C) vevsbiten overføres til brønnen ved bruk av oppvarmet pinsett, (D) deretter legges kassetten over, (E) og enheten fylles opp med wax til kassettsens rand. (F) Kassetten settes til side for nedkjøling, og videre avkjøling i kjøleskap (4°C) over natt. Foto: Kristina Finden Tronsen.

#### 2.8.4 Snitting av prøvene

Waxblokkene snittes ved bruk av mikrotomet Leica RM 2255 (Leica Microsystems Nussloch GmbH) (figur 13A-F) til 5µm tjukke skiver. For å komme inn til vevet, trimmes waxblokken med høyere kutthastighet og tjukkere snitt (7µm). Når man nærmer seg vevet, justeres tjukkkelsen ned til 5µm og ønsket snitthastighet. Objektglass (Mikroskopglass med frostet ende, Menzel-Gläser, 76\*26mm) legges oppå en varmeplate (Slides Warmer XH-2002, HECO, laboratorieutstyr AS) som holder 38°C, og dekkes med destillert vann.

Snittskivene overføres fra knivflaten (se svart flate i figur 13A/B) til det vannbelagte objektglasset, ved hjelp av pinsett og pirkenål. Når man har fått ønsket mengde snitt på objektglasset, fjernes noe av vannet ved bruk av 1 ml plastpipette og resterende vann fordampes mens det ligger på varmeplaten. Tørre objektglass settes i objektglass-stativ og oppbevares i romtemperatur.



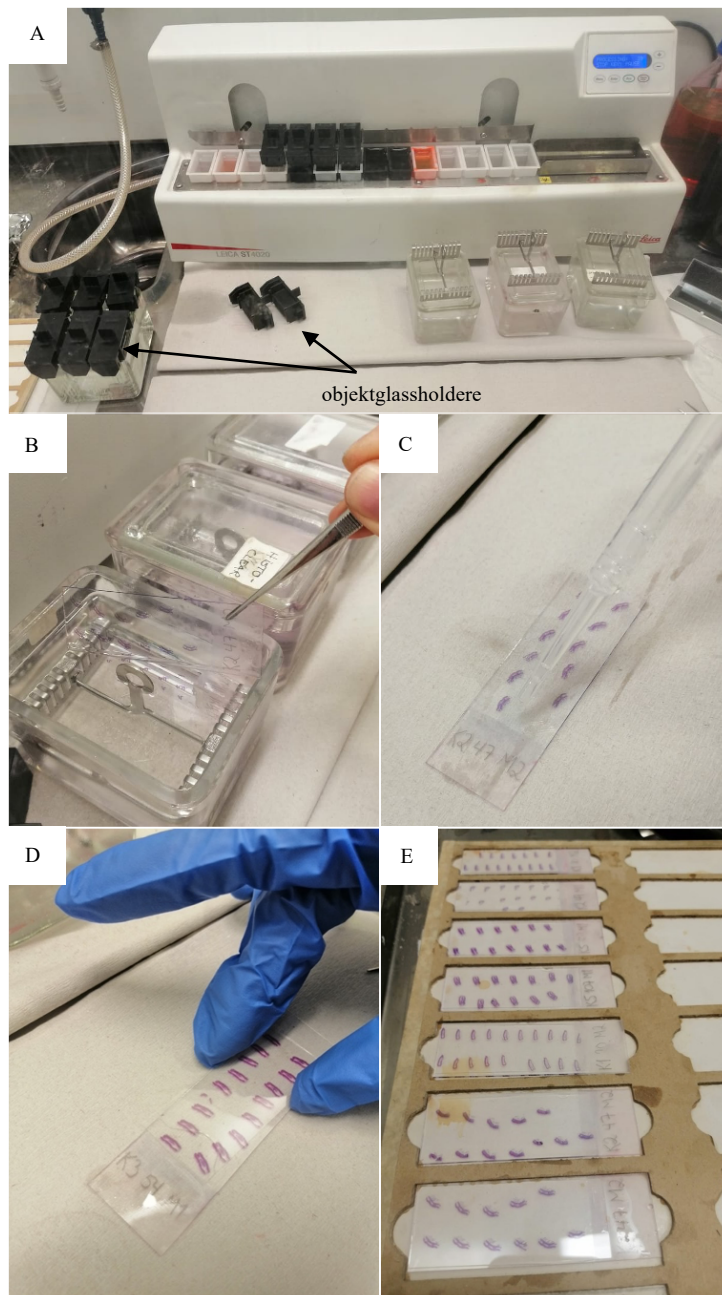
Figur 13. (A) Ved snitting av waxblokkene (Leica RM 2255) justeres mikrotomets posisjon av knivbladet på knivflaten (svart område) i forhold til waxblokken. (B) De 5 mikrometer tjukke snittskivene overføres fra knivflaten til (C/D) vannbelagte objektglass oppå en varmeplate (Slides Warmer XH-2002) som holder 38°C. (E) Overflødig vann pipetteres bort. (F) Når resterende vann er fordampet settes objektglassene i objektglasstativ for trygg bevaring. Foto: Kristina Finden Tronsen

### 2.8.5 HE-farging av snitt

Snittene farges med Hematoxylin og Eosin-Y (HE-farging). Fargen Instant Hematoxylin fremstilles ved å blande Hematoxylin del A- og Hematoxylin del B (Thermo Shandon Limited, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific) med 1 L destillert vann i en erlendmeyerkolbe. Ved bruk av en magnet og magnetrører (Heidolph MR 3000, Heidolph) blandes fargestoffet i omtrent en time (700 rpm), til fargepulveret er godt oppløst. Deretter ble fargeløsningen filtrert gjennom et foldefilter (Whatman 597 ½ folde filter, diameter 150mm, Whatman GmbH) til en 1L glassflaske med skrukork. Fargepulveret Instant Eosin-Y (Thermo Shandon Limited, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific) blandes ut i en glassflaske med 1L 70% etanol, fremstilt med 700 ml EtOH absolutt og 300 ml destillert vann. Fargestoffet løses opp ved å riste og vende flasken.

Dagen før farging settes objektglass-stativer med vevssnitt inn i varmeskap (Memmert, modell 100, Memmert GmbH + Co.) ved 62-63°C over natt slik at overflødig wax fordampes. Fargingen foregår i avtrekksskap. Brønnene i fargemaskinen Leica ST4020 fylles med Histo-Clear, EtOH absolutt, 96% EtOH, Eosin og Hematoxylin. Samt fylles ekstra glassbeholdere med Histo-Clear, til bruk før og etter farging (figur 14A). Fire og fire objektglass settes inn i objektglassholdere (engelsk; «slide carriers») (se figur 14A) og overføres til en glassbeholder med Histo-Clear, hvor de skal stå i minst 10 minutter for å fjerne gjenværende parafinwax og rehydrere vevssnittene slik at de kan farges (F. Tønning, overingeniør ved institutt for arktisk og marin biologi, personlig kommunikasjon, 19. mars 2021). Etter 10 minutter (eller mer) i Histo-Clear settes objektglassene inn i fargemaskinen der de gjennomgår følgende program med 90 sekunders eksponeringstid i hver brønn: Histo-Clear, 100% EtOH, 2 x 96% EtOH, vann, 2 x Hematoxylin, 2 x vann, Eosin, 2 x 96% EtOH, 2 x 100% EtOH, Histo-Clear.

De fargede objektglassene overføres til objektglass-stativ og settes i glassbeholdere med Histo-Clear, der total tid i Histo-Clear skal være minst 10 minutter. Herfra tas et og et objektglass opp ved bruk av pinsett, for å lime på dekkglass. En plastpipette, oppbevart i en petriskål, fylles med Eukitt (Sigma-Aldrich). Eukitt påføres ene enden av objektglasset og et dekkglass limes over. Her er det viktig å unngå luftbobler. Deretter legges objektglassene til tork på et objektglassbrett i avtrekksskap over natt (figur 14 B-E).



Figur 14. (A) Etter farging av vevsprøvene i fargemaskinen Leica ST4020, overføres objektglassene fra objektglassholdere (se bilde A) til objektglass-stativ i Histo-Clear, der de oppbevares i minst 10 minutter. (B) Derfra tas et og et objektglass ut, (C) en-to dråper Eukitt (Sigma-Aldrich) dryppes på ene siden av glasset, (D) et dekkglass legges varsomt over fra siden med lim, (E) og tørkes på objektglassbrett i avtrekkskap over natt. Foto: Kristina Finden Tronsen

## 2.8.6 Mikroskopi

De HE-fargede snittene ble evaluert og analysert ved bruk av Lysmikroskopet Leica DM 2000 LED (Leica Microsystems CMS GmbH). Mikrografi ble tatt med kameraet Leica DFC295 (Leica Microsystems Ltd) og bildeprogramvaren Leica Applications Suite, Version 4.7.1 (Leica Microsystems CMS GmbH).

### 2.8.7 Scoring

Evaluering av GG sin effekt på tarmvevet baseres på et scoringssystem utarbeidet av Knudsen m.fl. (2007) ved undersøkelse av hvilke komponenter i soyabønner som inducerer inflammasjonsreaksjoner i baktarm hos laks. Knudsen m.fl. (2007) sitt scoresystem er tilpasset et forsøk av Urán m.fl. (2004) (referert i Knudsen m.fl., 2007) og er blitt modifisert av Hanne Johnsen fra Nofima, som utviklet tilsvarende scoresystem for pylorusblindsekkene og midttarm (B.-S. Sæther, professor ved UiT-Norges arktiske universitet, personlig kommunikasjon, 2. september 2020; Johansson, 2014). Scoresystemet er brukt i tilsvarende undersøkelser, deriblant Feed'n'Treat, der det ble sett på hvordan GG påvirket tarmepitelet i flere tarmsegmenter (B.-S. Sæther, professor ved UiT-Norges arktiske universitet, personlig kommunikasjon, 2. september 2020).

Vurdering av histologiske snitt er subjektiv, men ved bruk av et scoresystem kan en ellers kvalitativ vurdering gjøres semikvantitativt, og dermed mulig å analysere ved bruk av statistikk. Ved hjelp av scoresystemet vurderes grad av inflammasjonsreaksjon i tarmvevet basert på følgende fire kriterier; kriterie 1 - mengde supranukleære vakuoler (engelsk: supranuclear vacuoles), kriterie 2 - grad av utvidet lamina propria, kriterie 3 - mengde bindevev mellom basen av mucosafoldene og stratum compactum, og kriterie 4 - mucosafoldenes lengde og tykkelse. For hvert kriterie oppgis en score fra 1-5, der 1 er ingen endring og 5 er alvorlige endringer. For å sette score er det oppgitt en beskrivelse av morfologisk endring (grad av inflammasjon) for hvert nivå. Score 1-2 vil si ingen til mild endring, og betraktes som normal morfologi, score 3 vil si moderate endringer, 4; distinkte endringer og 5; alvorlige endringer (Knudsen m.fl., 2007).

Prøvene ble randomisert før scoring. Ved vurdering, ble hele snittet tatt i betraktning. Scoringen ble gjennomført tre ganger av samme person. Endelig resultat per snitt ble satt etter følgende strategi; for de prøvene der 2 av 3 vurderinger hadde samme score, ble denne scoren videreført som endelig resultat. Ved tre ulike score, eller to like score og en score som skilte seg ut, ble disse snittene kontrollert på nytt for å fastslå score.

Etterfølgende kapitler beskriver kriteriene. Det ble benyttet samme scorebeskrivelse som Johansson (2014) brukte i sin masteroppgave om effekt av funksjonelt fôr på mage-tarmkanalen ved smoltifisering, og mottakelighet for infeksiøs pankreas nekrose virus. Siden samme beskrivelse er benyttet presenteres skjermbilder av scoresystemet for ryddighetens orden.

### 2.8.7.1 Kriterie 1: Supranukleære vakuoler i enterocytter

Normalt er det et lavt nivå supranukleære vakuoler (SV) i enterocytene i midttarmen til laks (Johansson, 2014, s. 26-27). Det er vanlig å finne noen få, små vakuoler i noen få enterocytter, men vanligvis kan ikke disse sees. Økt mengde supranukleære vakuoler representeres med økt score. Se tabell 3 for scorebeskrivelsen hentet fra Johansson (2014, s. 26-27). Omfatter aktuell halvdel av tabellen med PC (pylorusblindsekkene) og MI (midttarm), ikke baktarm.

Tabell 3. Scoresystem for vurdering av kriterie 1: Supranukleære vakuoler i enterocytter. PC = pyloric caeca (norsk: pylorusblindsekker), MI = mid intestine (norsk: midttarm). Kilde: Johansson, 2014, s. 26-27.

Criteria 1 - Vacuolization				
PC and MI	Level of vacuolisation	Score	Changes	Appearance
		1	No	No to very little vacuolization of the enterocytes
		2	Mild	A slight increase in vacuolization of the enterocytes
		3	Moderate	A clear increase in vacuolization of the enterocytes
		4	Distinct	A clear increase in vacuolization that affects most of the enterocytes
		5	Severe	A clear increase in vacuolization that affects all of the enterocytes

### 2.8.7.2 Kriterie 2: Lamina propria i mucosafoldene

Bindevevet lamina propria er normalt et tynt bindevev (Kryvi & Totland, 1997). Men som reaksjon på inflammasjon utvides LP som følge av tilstrømming av immunceller (Bæverfjord og Krogdahl, 1996; Krogdahl m.fl., 2010). Unormalt stor LP kategoriseres fra 3-5. Se tabell 4 for scorebeskrivelsen hentet fra Johansson (2014, s. 27-28). Samme kriterier for PC, MI og DI.

Tabell 4. Scoresystem for vurdering av kriterie 2: Lamina propria i mucosafoldene. PC = pyloric caeca (norsk: pylorusblindsekker), MI = mid intestine (norsk: midttarm), DI = distal intestine (norsk: baktarm). Kilde: Johansson, 2014, s. 27-28

Criteria 2 - Lamina propria				
PC, MI and DI	Lamina propria of mucosal folds	Score	Changes	Appearance
		1	No	There is a very thin and delicate core of connective tissue in all mucosal folds
		2	Mild	The lamina propria appears slightly more distinct and robust in some of the folds
		3	Moderate	There is a clear increase of lamina propria in most of the mucosal folds
		4	Distinct	There is a thick lamina propria in many folds
		5	Severe	There is a very thick lamina propria in many folds

### 2.8.7.3 Kriterie 3: Bindevev mellom basen av mucosafoldene og stratum compactum

Bindevevet (BV) mellom basen av mucosafoldene og stratum compactum inngår i LP (Løkka m.fl., 2013) og er i normal tilstand et veldig tynt bindevevslag, eller stedvis tjukkere

(Johansson, 2014), som vil tilsi score 1-2. Bindevevet utvides som følge av inflammasjon og tilstrømming av immunceller (Bakke-McKellep 2005B). Økt tjukkelse og utbredelse av tjukkere BV, vil gi økt score fra 3-5. Se tabell 5 for scorebeskrivelsen hentet fra Johansson (2014, s. 28-30). Omfatter aktuell halvdel av tabellen med MI og DI, ikke PC.

Tabell 5. Scoresystem for vurdering av kriterie 3: bindevev mellom basen av mucosafoldene og stratum compactum. MI = mid intestine (norsk: midttarm), DI = distal intestine (norsk: baktarm). Kilde: Johansson, 2014, s. 28-30.

Criteria 3 - Connective tissue and pycnotic cell nuclei				
MI and DI	Connective tissue (between base of folds and stratum compactum)	Score	Changes	Appearance
		1	No	There is a very thin layer of connective tissue between the base of folds and the stratum compactum
		2	Mild	There is a slightly increased amount of connective tissue beneath some of the mucosal folds
		3	Moderate	There is a clear increase of connective tissue beneath most of the mucosal folds
		4	Distinct	A thick layer of connective tissue is beneath many folds
		5	Severe	An extremely thick layer of connective tissue beneath most folds

#### 2.8.7.4 Kriterie 4: Mucosafoldene

Mucosafoldene (MF) i midttarmen er i en uaffisert tilstand lange og tynne (Løkka m.fl., 2013). Ved slitasje blir de kortere og noe tjukkere, og blir videre nedslitt til stumpe/butte mucosafolder som vil gi score 5. Lange og tynne folder, og noe kortere og tjukkere folder tilsier score 1-2. Ytterligere slitasje på foldene representeres med økt score. Se tabell 6 for scorebeskrivelsen hentet fra Johansson (2014, s. 30-31). Omfatter aktuell halvdel av tabellen med PC og MI, ikke baktarm.

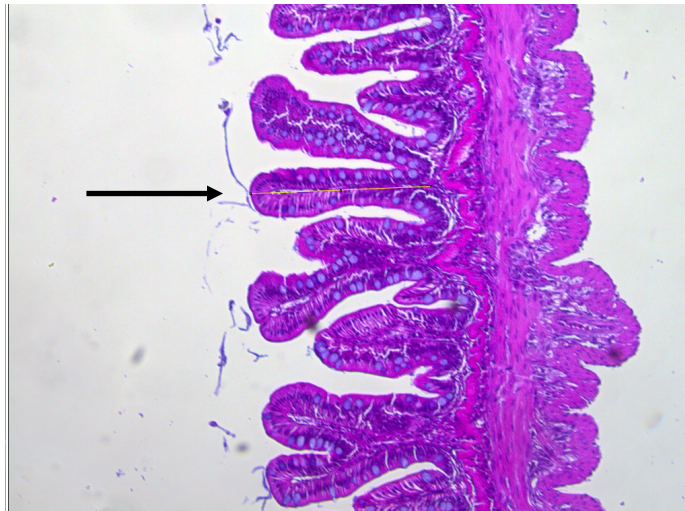
Tabell 6. Scoresystem for vurdering av kriterie 4: mucosafoldene. PC = pyloric caeca (norsk: pylorusblindsekker), MI = mid intestine (norsk: midttarm). Kilde: Johansson, 2014, s. 30-31.

Criteria 4 - Mucosal folds				
PC and MI	Mucosal folds	Score	Changes	Appearance
		1	No	Mucosal folds appear long and thin
		2	Mild	Mucosal folds appear long to medium and are slightly thicker
		3	Moderate	Mucosal folds have short to medium length
		4	Distinct	Mucosal folds are short
		5	Severe	Mucosal folds appear very stubby

#### 2.8.8 Lengdemåling av mucosafoldene

Ved mål av lengden på mucosafoldene ble bildeanalyseprogrammet Fiji ImageJ 1.53c (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) brukt. Programmet er av offentlig eiendom. Fire til ni mucosafolder ble lengdemålt i et mikrofotografi av snittet/prøven med 10 ganger forstørrelse (obj. x10). Lengdemålingen ble utført etter samme metode som Løkka m.fl. (2013) gjennomførte i sin forskning på tarmkanalens morfologi hos villaks; fra ytterst av folden mot lumen, til bunnen. Se gul linje i mucosafolden som pilen peker på i figur 15.





Figur 15. Skjerm bilde tatt ved lengdemåling av en mucosafold ved bruk av bildeanalyseprogrammet Fiji ImageJ 1.53c. Pilen peker på en gul linje som settes manuelt og oppgir lengden på mucosafolden. Snittet er HE-farget i forstørrelse obj. x10.

De målte verdiene ble plottet inn i excel og gjennomsnittlig foldlengde per prøve ble regnet ut. Disse verdiene ble vurdert opp mot angitt score for å kontrollere sammenheng mellom faktisk målt foldlengde og vurdert morfologiendring.

## 2.9 Dataanalyse

Beregninger av SGR, kondisjonsfaktor og førfaktor gjennomføres ved bruk av excel. Resterende dataanalyser gjennomføres ved bruk av SYSTAT Version 13.2.01 (Systat Software, Inc). Signifikansnivået, p-verdien (engelsk; probability value) er satt til 0,05. P-verdien kan oppgis fra 0-1, eller i prosent (0-100%). P-verdien sier noe om usikkerheten i å generalisere utvalget man har, til en hel populasjon. P-verdien knyttes opp mot nullhypotesen, som sier at «noe» har ingen effekt, for å avgjøre om den er sann eller ikke. Er p-verdien større enn 0,05, forkastes nullhypotesen, som tilsier at det er en signifikant effekt med 5% usikkerhet (Lind m.fl., 2015).

### 2.9.1 Spesifikk vekstrate

Spesifikk vekstrate beregnes ut fra vektdata for hvert merkede individ, for å finne gjennomsnitt per kar og per gruppe.

Spesifikk vekstrate er en betegnelse på prosentvis daglig vekst mellom to måletidspunkter, og beregnes ved bruk av følgende formel (formel 1):

$$SGR = \frac{\ln(W1) - \ln(W0)}{\Delta d} * 100$$

$\ln(W1)$  og  $\ln(W0)$  er den naturlige logaritmen til målt vekt ved første ( $W0$ ) og andre ( $W1$ ) måletidspunkt. Delta  $d$  ( $\Delta d$ ) er antall dager mellom måletidspunktene (Einen 2001).

### 2.9.2 Kondisjonsfaktor

Kondisjonsfaktor (k-faktor) for fisk beregnes ut fra forholdet mellom lengde og vekt, og brukes som et parameter på fiskens ernæringsstatus (Barnham og Baxter, 1998; Nash m.fl., 2006). Kondisjonsfaktoren sier noe om hvor rund («tjukk») fisken er i forhold til lengden, der en høy k-faktor indikerer en fisk i god stand.

Laksens kondisjonsfaktor ble beregnet etter Fulton's kondisjonsfaktor ( $K$ ) (Nash m.fl., 2006) som er følgende (formel 2):

$$K = \frac{W * 100}{L^3}$$

Der  $W$  står for vekt i gram,  $L$  står for lengde i cm (Nash m.fl., 2006).

### 2.9.3 Variasjonskoeffisient

Variasjonskoeffisienten ( $CV$ ) beskriver variasjonen i fiskegruppen med hensyn til størrelsen på fisken og gir det relative standardavviket. Variasjonskoeffisienten beregnes ut fra følgende formel (formel 3):

$$CV = \left( \frac{S.A.}{\text{gjennomsnittsvekt}} \right) * 100$$

Der  $S.A.$  er standardavviket (Jobling, 2001).

### 2.9.4 Fôrfaktor og biomasseøkning

Fôrfaktor ( $FF$ ) er et mål for fôrutnyttelse (Einen, 2001). Hvor godt fisken utnytter fôret er blant annet avhengig av fôrsammensetning, balansen av hovednæringsstoffene, og kvaliteten på råvarene. Fôrfaktor beregnes på vektbasis og er et forhold mellom hvor mye fôr fisken må innta for å oppnå en enhet vektøkning. Fôrfaktor kan beregnes på individ- og gruppenivå (biomasse). Formelen er som følger (formel 4) (Nortvedt og Krogdahl, 2001):

$$FF = \frac{\text{utfôret mengde (g)}}{\text{biomasseøkning (g)}}$$

En FF på 1,0 viser til at fisken har spist en enhet fôr og lagt på seg en enhet vekt. Høy FF blant frisk fisk under gode miljøforhold kan vise til dårlig utnyttelse, dårlig fôr, overskuddsfôring, eller en kombinasjon av disse.

For å beregne FF må utfôret mengde per periode divideres på biomasseøkningen for samme periode.

Utfôret mengde per periode beregnes ut fra utfôret fôrmengde per døgn per uke (tabell 7/vedlegg 3). Hvert forsøkskar får samme mengde fôr hver dag i en uke.

Tabell 7. Mengde fôr og antall fôringsdager per uke. Bemerk at kar 4, 5 og 6 har en fôringsdag mer ved forsøksslutt enn kar 1, 2 og 3. Omregningsfaktor fra ml til g er: 1,4.

	Uke	ml utfôret per døgn	g utfôret per døgn (ml/1,4)	Ant. fôrings-dager per uke
Fordeling av fisk til kar	39	120	86	7
	40	142	101	6
Forsøksstart	41	150	107	7
	42	180	129	7
	43	210	150	7
Forsøksslutt (kar 1, 2, 3)	44	250	179	4
Forsøksslutt (kar 4, 5, 6)	44	250	179	5

Faktisk biomasse per kar er kjent ved individmålinger foretatt ved T0, T1 og T2. Gjennomsnittlig daglig biomasseøkning per kar (all fisk) beregnes ut fra karetts gjennomsnittlige SGR. Formelen brukt for å beregne daglig biomasseøkning for all fisk per kar er som følger (formel 5):

$$B_2 = B_1 + \frac{(B_1 * SGR_k)}{100}$$

Der  $B_1$  er dagens biomassevekt,  $B_2$  er biomassevekt neste dag,  $SGR_k$  er gjennomsnittlig spesifikk vekstrate beregnet per kar. Biomasseøkning per kar per periode finner man ved å summere daglig biomasseøkning.

### **2.9.5 Korrelasjonsanalyse**

Korrelasjonsanalyser avdekker sammenheng/korrelasjon mellom to variabler. Ved vurdering av sammenheng mellom målt gjennomsnittlig mucosafoldlengde og score, ble det utført korrelasjonsanalyse. Korrelasjonskoeffisienten,  $R^2$ , beskriver hvor stor andel av variansen i den ene variabelen (Y1) som kan forklares av variasjonen i den andre variabelen (Y2) (Quinn & Keough, 2002).

### **2.9.6 ANOVA**

Analyse av varians (ANOVA; engelsk: The analysis of variance) analyserer variasjonen i en kontinuerlig responsvariabel, og tester gjennomsnittlig responsvariabel mellom grupper/behandlinger (Quinn & Keough, 2002). Behandlingene i denne sammenheng er diettgruppene. Responsvariablene er vekt, lengde, SGR og k-faktor. Formålet med ANOVA er å teste nullhypotesen; det er ingen forskjell i responsvariabelen mellom diettgruppen som har fått fôr med ufordøyelig binder sammenlignet med gruppen som fikk kontrollfôr. Om nullhypotesen er sann ( $p > 0,05$ ) beholdes nullhypotesen.

Krav for gjennomførelse av ANOVA-analyse er at variabelen(e) er/er tilnærmet lik normalfordelt, det burde være homogenitet i varians, og hver observasjon burde være uavhengige av hverandre innad i gruppene og mellom gruppene (Quinn & Keough, 2002). For å sikre en god analyse med hensyn til normalfordeling ble «resampling» metoden benyttet for å generere standardavvik (Quinn & Keough, 2002). Ved analyse av responsvariablene ble gjennomsnittsverdiene fra hvert replikat per gruppe brukt som en observasjon siden individene i et kar ikke er uavhengige av hverandre. Dette lar seg gjøre med begrunnelse i sentralgrenseteoremet som argumenterer for at ved mange nok utvalg fra en populasjon, vil gjennomsnittet av målt parameter, fordele seg som en normalfordeling (Quinn & Keough, 2002).

### **2.9.7 ANCOVA**

Analyse av kovarians (ANCOVA; engelsk: Analyses of covariance) virker på samme måte som ANOVA, forskjellen er at man inkluderer en kovariat, for å teste gjennomsnittlig forskjell mellom faktorene, justert for effekten av kovariatet (Quinn & Keough, 2002). Slik kan man avdekke om en kovariat har innvirkning på variasjonen i responsvariabelen, og eventuelt redusere andelen uforklarlig variasjon. I denne sammenheng settes lengde som

kovariat for å undersøke om fiskelengde har effekt på mucosafoldenes lengde, ettersom man antar at stor fisk har lengre mucosafolder enn liten fisk.

Ved utførelse av ANCOVA lagres residualene fra analysen i egen fane. Residualene er differansen/forskjellen mellom hver observerte Y-verdier og forventet Y-verdier (Quinn & Keough, 2002). Hvis residualene i et boksplo er jevnt fordelt og har en homogen varians rundt 0 standardavvik, er dataen normalfordelt som viser til at utgangsdataen er normalfordelt. De studentiserte residualene analyseres for normalfordeling ved bruk av Kolmogorov-Smirnov-test (Lilliefors-test).

### 2.9.8 Pearson Chi square

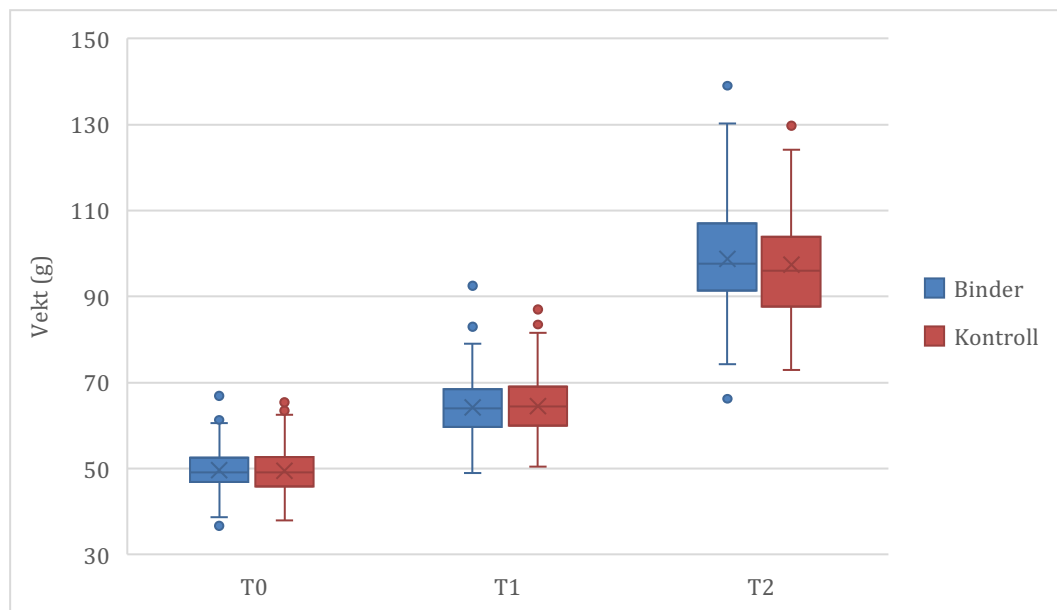
Pearson chi square test ( $\chi^2$  test) brukes for å sammenligne frekvens av score mellom grupper, og frekvens av score mellom tarmsegment M1 og M2. Chi square test brukes til å undersøke frekvensproporsjoner i to eller flere ulike utvalg med kategorisk variabel. Fordelingen av prøvene er  $\chi^2$  fordelt når nullhypotesen er sann. Chi square test måler i hovedsak differansen mellom observerte og forventede verdier. Forventede verdier beregnes teoretisk av modellen og er basert på antall observasjoner og fordelingen av disse i rad og kolonne i kontingenstabellen (Quinn & Keough, 2002). Forhåndsreglene for å utføre en  $\chi^2$ -analyse er at observasjonene i kategoriene er uavhengige av hverandre. Og at ikke flere enn 20% av cellene i kontingenstabellen har lavere frekvens enn 5 (Quinn & Keough, 2002).

Som følge av få vurderte prøver og/eller lavt antall av de høyeste scorene i flere av cellene i kontingenstabellen ble scoreklassene (1-5) slått sammen til to kategorier ved analyse av frekvens av score mellom grupper og tarmsegment. Kategori 1 inkluderer score 1-2 da de betraktes som normal morfologi (Knudsen m.fl., 2007). Kategori 2 inkluderer score 3-5 og indikerer unormal morfologi. Slik ble antall celler med frekvens mindre enn fem redusert, som er et tiltak for å gjøre analysen mer robust (Quinn & Keough, 2002).

## 3 Resultat

### 3.1 Vekt- og lengdeutvikling

Vektdataen med S.A. for hver gruppe ved hvert måletidspunkt (T) er vist i figur 16. Begge grupper har hatt signifikant vektøkning gjennom forsøksperioden ( $F_{2,8}= 979,764$ ,  $p= 0,000$ ), og det er ingen signifikant forskjell i gjennomsnittsvekt mellom gruppene ved noen av måletidspunktene ( $F_{2,8}=0,113$ ,  $p= 0,894$ ).



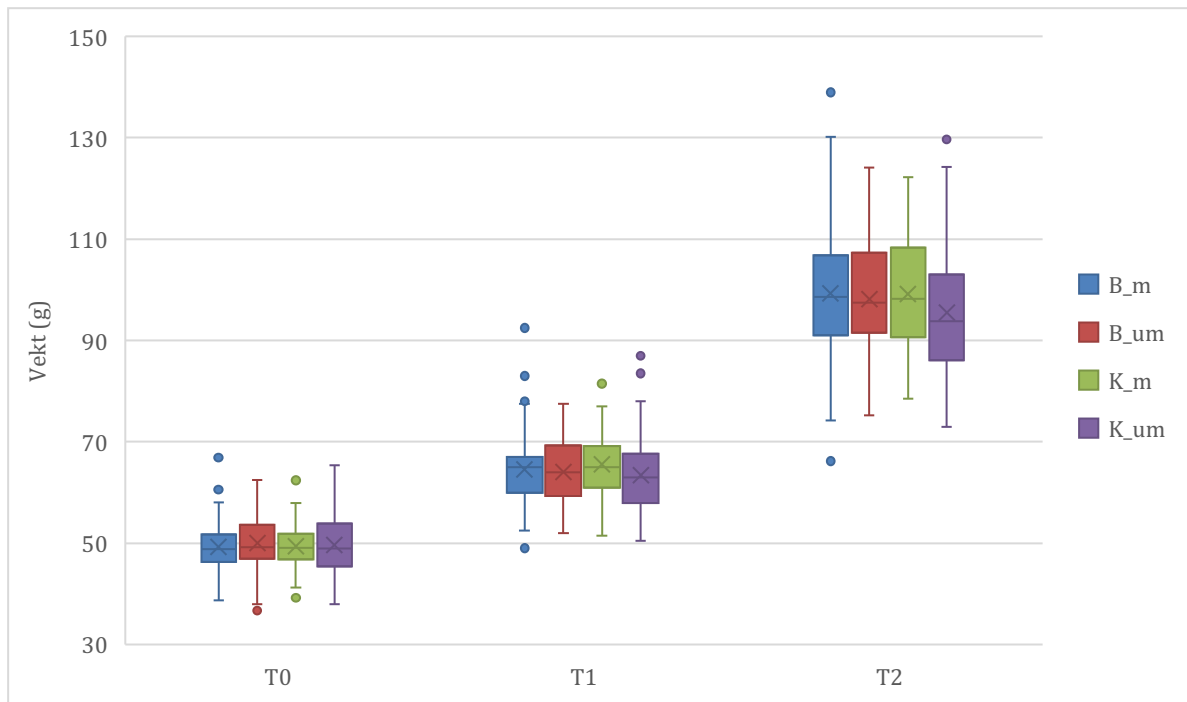
Figur 16. Vektdata (g) med S.A. for all fisk per gruppe per måletidspunkt (T). T0= fordeling av fisk til forsøkskar, T1= forsøksstart, T2= forsøkslutt. Merk at x-aksen ikke viser reell tid mellom måletidspunktene.

Variasjonen mellom diettgruppene er tilsvarende identisk. Standardavviket øker for hvert måletidspunkt, det gjør også CV (tabell 8), men i mindre grad. Fra T1 til T2 er S.A. nesten doblet i begge grupper, fra ca. 6% til ca. 12%, mens CV økte med 2% (se vedlegg 10 for mere detaljer).

Tabell 8. Variasjonskoeffisient ved alle måletidspunkt (T) for begge diettgruppene.

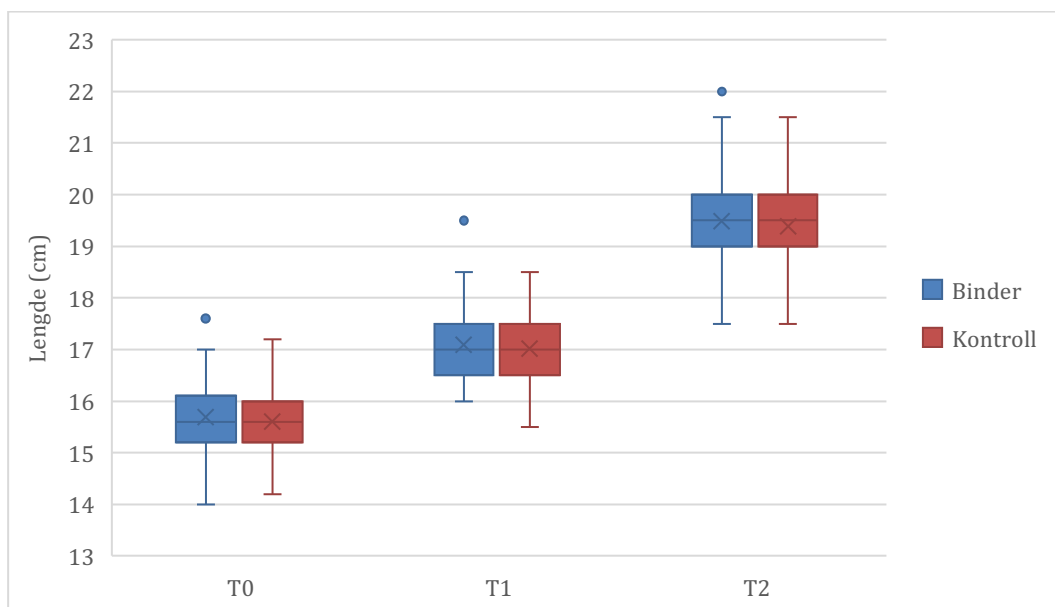
	T 0		T 1		T 2	
Diettgruppe:	Binder	Kontroll	Binder	Kontroll	Binder	Kontroll
CV	0,099	0,106	0,105	0,105	0,125	0,125

Figur 17 viser vektdata blant merket og umerket fisk i hver gruppe ved hvert måletidspunkt. Det ser ikke ut til å være noen effekt av merkingen.



Figur 17. Vektdata (g) med S.A. for merket (m) og umerket (um) fisk per gruppe per måletidspunkt (T). T0= fordeling av fisk til forsøkskar, T1= forsøksstart, T2= forsøksslutt. B = binder, K = kontroll. Merk at x-aksen ikke viser reell tid mellom måletidspunktene.

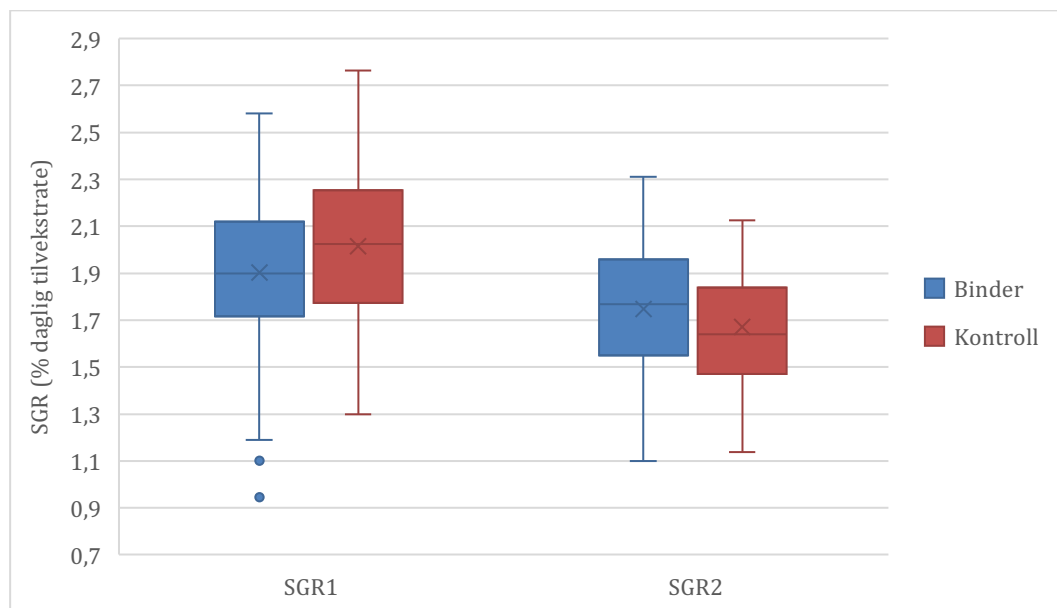
Lengdeutviklingen med S.A. for hver gruppe ved hvert måletidspunkt er vist i figur 18. Fisken ble signifikant lengre gjennom forsøksperioden i begge grupper ( $F_{2,8}=3450,115$ ,  $p=0,000$ ), og det er ingen signifikant forskjell mellom gruppene ved noen av måletidspunktene ( $F_{2,8}=0,106$ ,  $p=0,901$ ).



Figur 18. Lengde (cm) med S.A. for all fisk per gruppe per måletidspunkt (T). T0= fordeling av fisk til forsøkskar, T1= forsøksstart, T2= forsøksslutt. Merk at x-aksen ikke viser reell tid mellom måletidspunktene.

### 3.2 Spesifikk vekstrate

Det er ingen signifikant forskjell i SGR mellom gruppene i tilvekstperiodene ( $F_{1,4}=6,188$ ,  $p=0,068$ ). Den spesifikke vekstraten, samt spredningen i tilvekst, sank fra første til andre vekstperiode; i perioden, T0 til T1 (SGR1) var SGR (+/- S.A.) i bindergruppen 1,902 +/- 0,318 og 2,014 +/- 0,309 i kontrollgruppen. Ved andre vekstperiode, T1 til T2 (SGR2), var SGR 1,75 +/- 0,264 i bindergruppen og 1,67 +/- 0,224 i kontrollgruppen (figur 19). Ved SGR2 er det antydninger til større spredning i tilvekst i binder (0,264) i forhold til kontrollgruppen (0,224). Dette gjenspeiler gjennomsnittlig SGR per replikat (vedlegg 9).

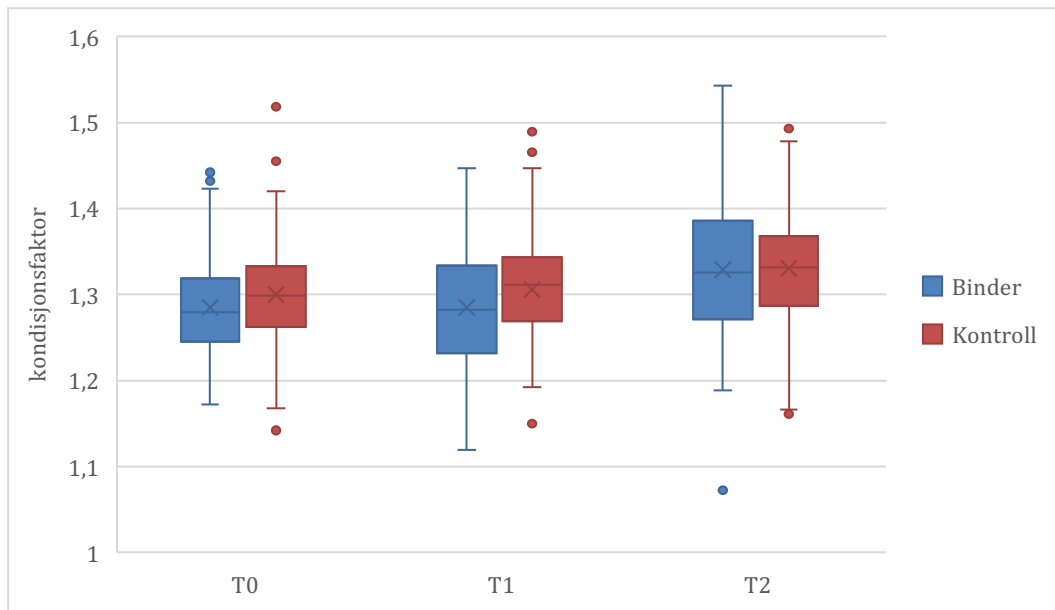


Figur 19. Gjennomsnittlig daglig spesifikk vekstrate beregnet for merkede individer per diettgrupper per tilvekstperiode. SGR1 er perioden fra fordeling av fisk til forsøkskar til forsøksstart. SGR2 er periode fra forsøksstart til forsøksslutt.

### 3.3 k-faktor

K-faktoren med S.A. for begge grupper ved hvert måletidspunkt er vist i figur 20. Det er ingen signifikant forskjell mellom gruppene ved noen av måletidspunktene ( $F_{2,8}=0,395$ ,  $p=0,686$ ), og fisken har blitt signifikant tjukkere gjennom forsøksperioden ( $F_{2,8}=18,469$ ,  $p=0,001$ ).

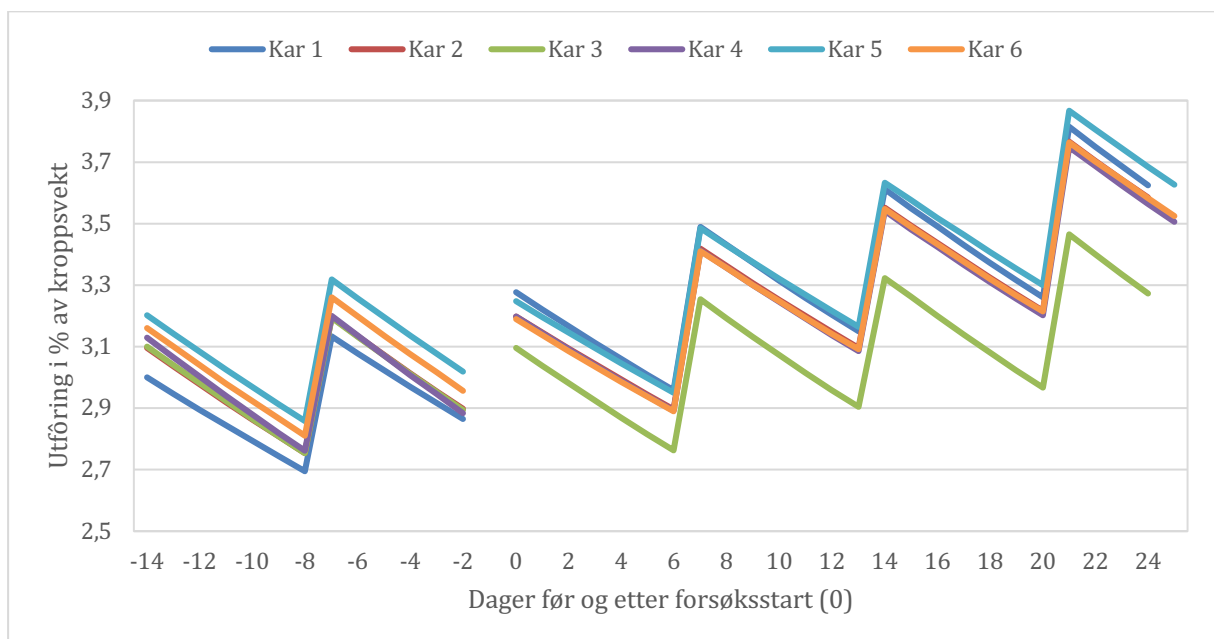




Figur 20. Kondisjonsfaktor for all fisk per gruppe per måletidspunkt (T). T0= fordeling av fisk til forsøkskar, T1= forsøksstart, T2= forsøksslutt. Merk at x-aksen ikke viser reell tid mellom måletidspunktene.

### 3.4 Utfôring

Basert på absolutt utfôret mengde (g) per døgn (se tabell 7 i kapittel 2.9.4), er utfôret mengde i forhold til daglig biomasse per kar illustrert i figur 21. Beregnet forhold varierer fra 2,7% på det minste til nesten 3,9% på det største. I starten av ukene er andelen utfôring i prosent av kroppsvekt størst. Dette forholdet synker utover uken etterhvert som mattilgang er konstant i forhold til beregnet biomasseøkning i karene.



Figur 21. Basert på planlagt utfôring og beregnet biomasse viser grafen mengde daglig utfôring i forhold til biomasse fisk per kar. Dag uten fôring (dag -1) er vist med opphørt linje.

Ansatte ved HiT observerte fôr i bunnen av karene. I alle kar var beregnet fôrfaktor høy, med en gjennomsnittsverdi mellom 1,71 og 2,65 i forsøksperioden (tabell 9). Fisken ble også overført i perioden før forsøksstart.

Tabell 9. Beregnet fôrfaktor (FF) per kar per periode. T0= fordeling av fisk til forsøkskar, T1= forsøksstart, T2= forsøksslutt.

	Periode					
	T0-T1			T1-T2		
Kar:	Utfôret mengde i periode	Biomasseøkning i periode	FF	Utfôret mengde i periode	Biomasseøkning i periode	FF
1	1208,57	747,531	1,62	3414,29	1657,837	2,06
2	1208,57	800,466	1,51	3414,29	1631,936	2,09
3	1208,57	811,396	1,49	3414,29	1994,140	1,71
4	1208,57	850,749	1,42	4307,14	1742,417	2,47
5	1208,57	745,565	1,62	4307,14	1625,098	2,65
6	1208,57	785,243	1,54	4307,14	1706,723	2,52

## 3.5 Histologi

### 3.5.1 Frekvens av score mellom grupper

Ved analyse av frekvens av score mellom gruppene per kriterie per tarmsegment (M1 og M2) ble score fordelt på kategori 1; normal morfologi (score 1-2), og kategori 2; unormal morfologi (score 3-5).

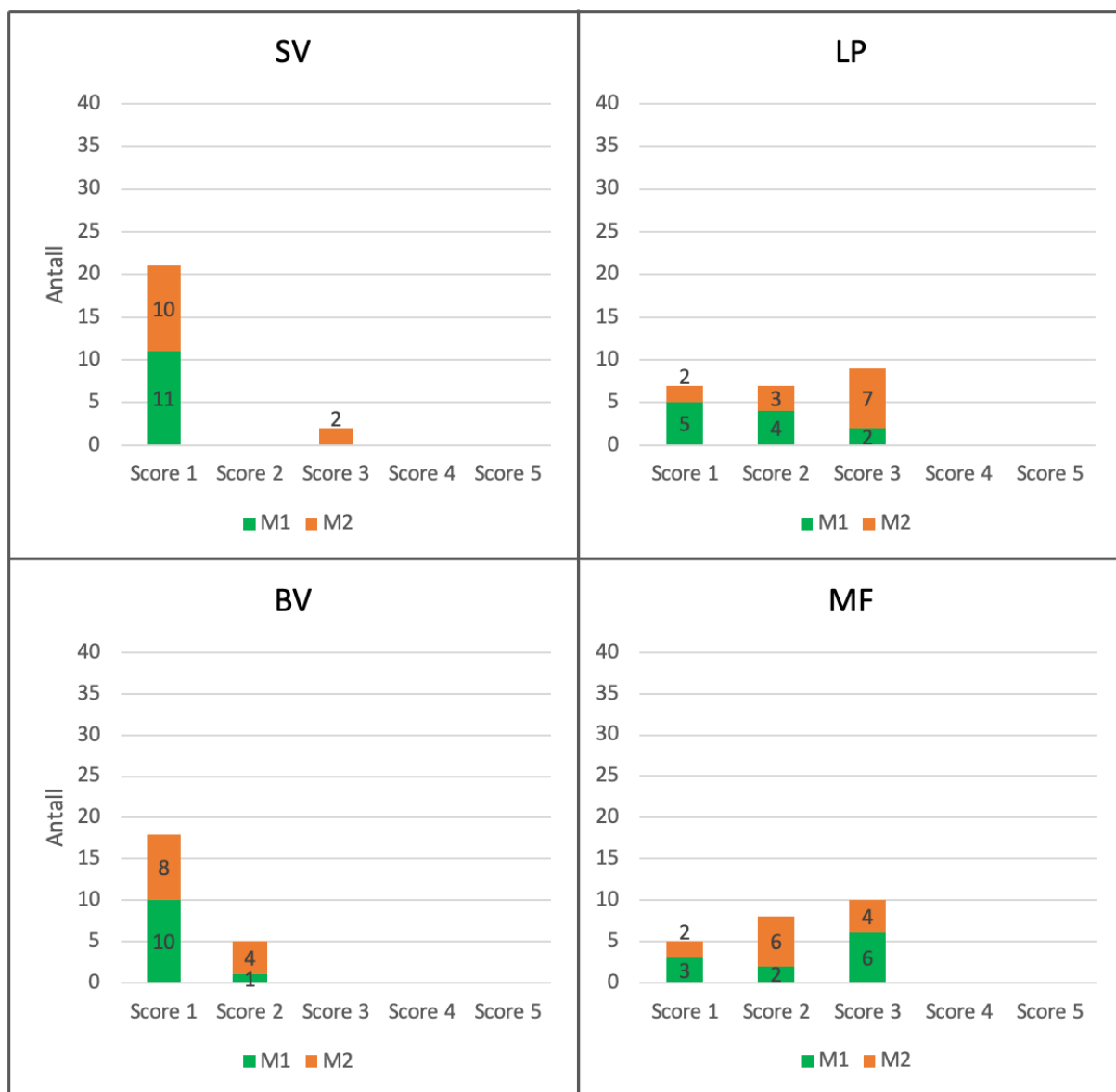
#### 3.5.1.1 0-prøvene

Chi square – testen av 0-prøvene viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene i frekvens av kategori, verken i M1 eller M2.

Av 11 prøver fra segment M1 var de overordnede resultatene i gruppene som følger: M1SV og M1BV hadde identisk fordeling av antall per kategori mellom gruppene, og dermed ingen variasjon. For M1LP er det flest i kategori 1, med en prøve i begge grupper vurdert til kategori 2. For M1MF har bindergruppen flest antall i kategori 2, og kontrollgruppen har flest i kategori 1.

Av 12 prøver fra segment M2 var de overordnede resultatene i gruppene som følger: for M2SV er alle prøver i begge grupper vurdert til kategori 1, bortsett fra to prøver i kontrollgruppen. For M2LP er det jevn fordeling mellom kategori 1 og 2, med noe større antall i kategori 2 i kontrollgruppen. For M2BV var det identisk fordeling av frekvens mellom gruppene, og for M2MF hadde begge grupper 2/3 i kategori 1.

Uten å skille mellom gruppene, viser stolpediagrammene i figur 22 fordelingen av score 1-5 for hvert kriterie. Alle kriterier viser en liten overvekt av unormal morfologi i tarmsegment M2 i forhold til M1 i 0-prøvene. Utførelse av  $\chi^2$ -test viste at LP, som eneste kriterie, hadde statistisk høyere andel kategori 2 i M2 i forhold til M1 ( $p = 0,049$ ).



Figur 22. Fordeling av score (1-5) av 0-prøvene for alle kriteriene; SV = supranukleære vakuoler, LP = Lamina propria, BV = bindevev og MF = mucosafold for tarmsegment M1 (grønn) og M2 (oransje) for all fisk i begge grupper.

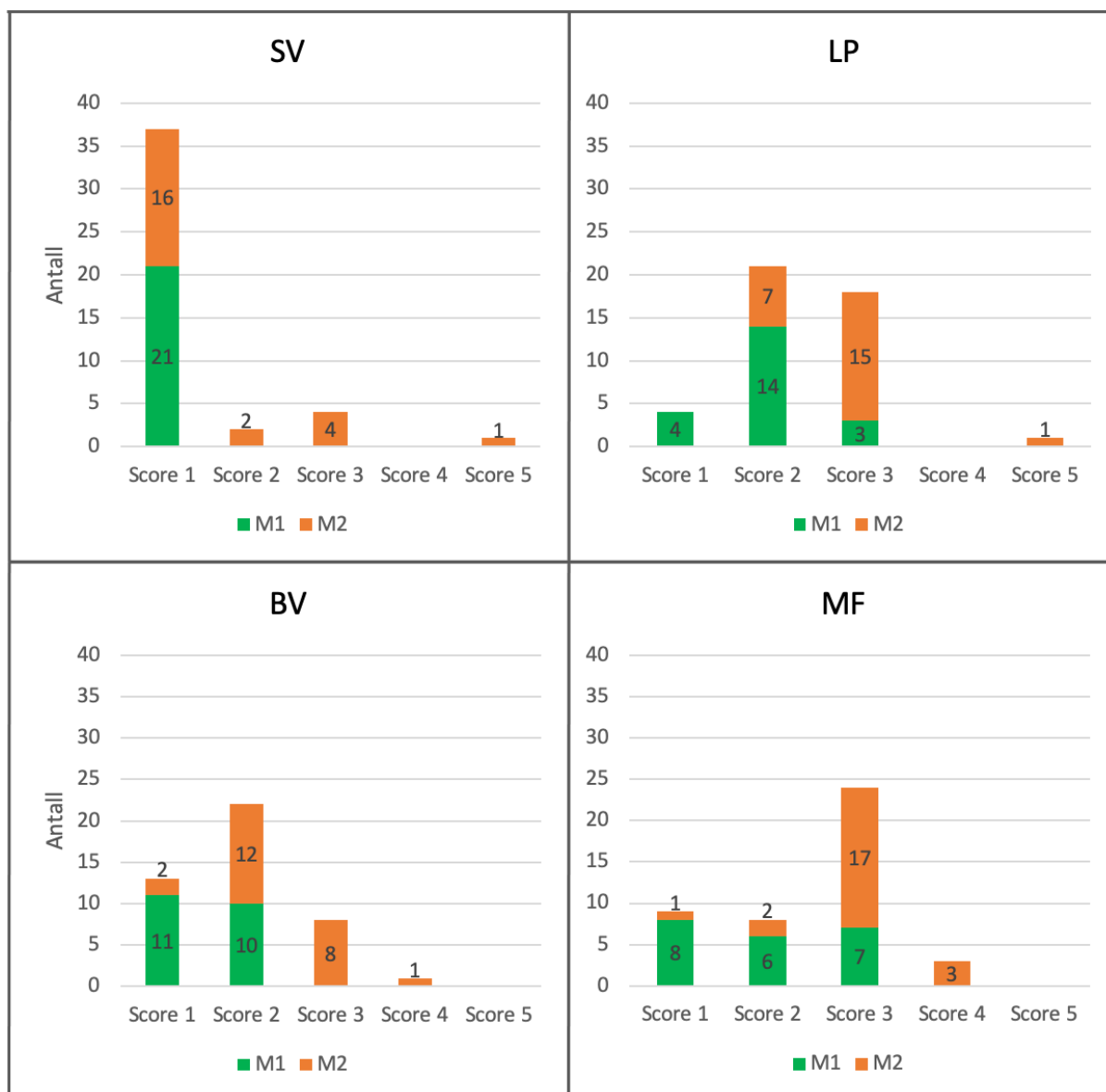
### 3.5.1.2 Sluttprøvene

Chi square – testen av sluttprøvene viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene i frekvens av kategori, verken i M1 eller M2.

Av 21 prøver fra segment M1 var de overordnede resultatene mellom gruppene som følger: for M1SV hadde gruppene identisk fordelingen mellom kategoriene og dermed ingen variasjon. For M1LP hadde begge grupper flest antall i kategori 1. For M1BV var alle prøver kategori 1, bortsett fra en prøve i kontrollgruppen. For M1MF var 2/3 kategori 1 i begge grupper.

Av 23 prøver fra segment M2 var de overordnede resultatene mellom gruppene som følger: for M2SV er det dominerende antall kategori 1 i begge grupper, med noen få flere prøver i kategori 2 for bindergruppen. For M2LP har gruppene flest kategori 2. For M2BV har gruppene en jevn fordeling av kategori 1 og 2. For M2MF har gruppene klart flest kategori 2.

Uten å skille mellom gruppene, viser stolpediagrammene i figur 23 fordelingen av score 1-5 for hvert kriterie. Alle kriterier viser en overvekt av kategori 2 i tarmsegment M2 i forhold til M1. Utførelse av  $\chi^2$ -test viste at det er statistisk høyere andel kategori 2 i M2 for alle kriterier.

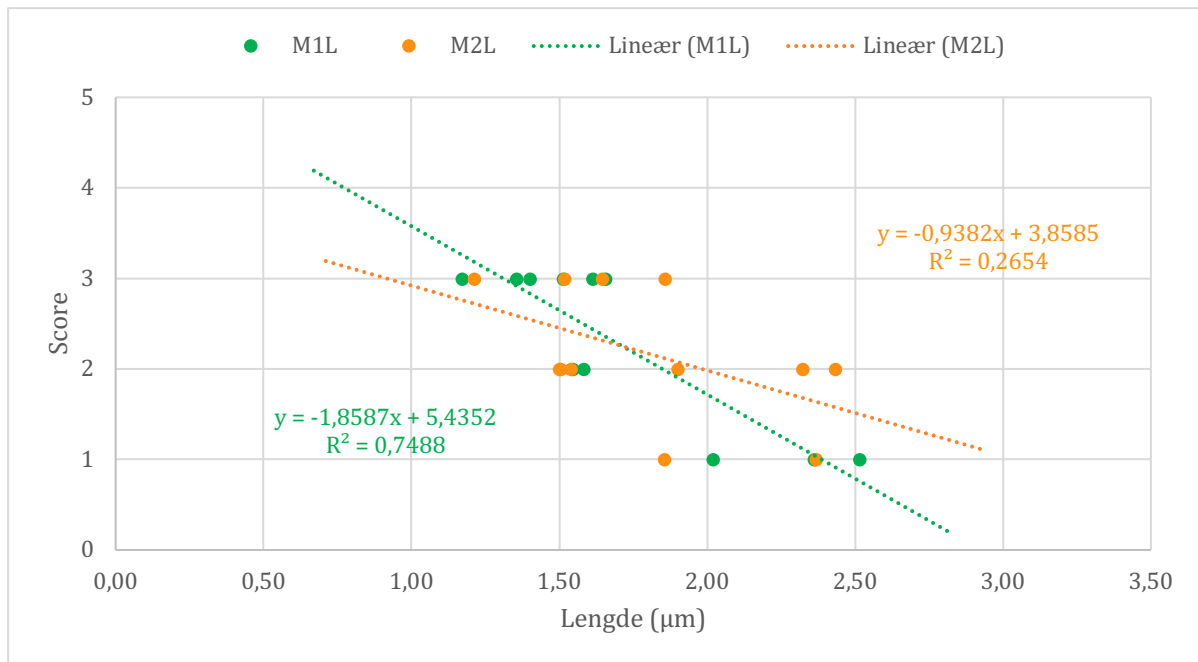


Figur 23. Fordeling av score (1-5) av sluttprøvene for alle kriteriene; SV = supranukleære vakuoler, LP = Lamina propria, BV = bindevev og MF = mucosafold for tarmsegment M1 (grønn) og M2 (oransje) for all fisk i begge grupper.

### 3.5.2 Lengde på mucosafolder og angitt score

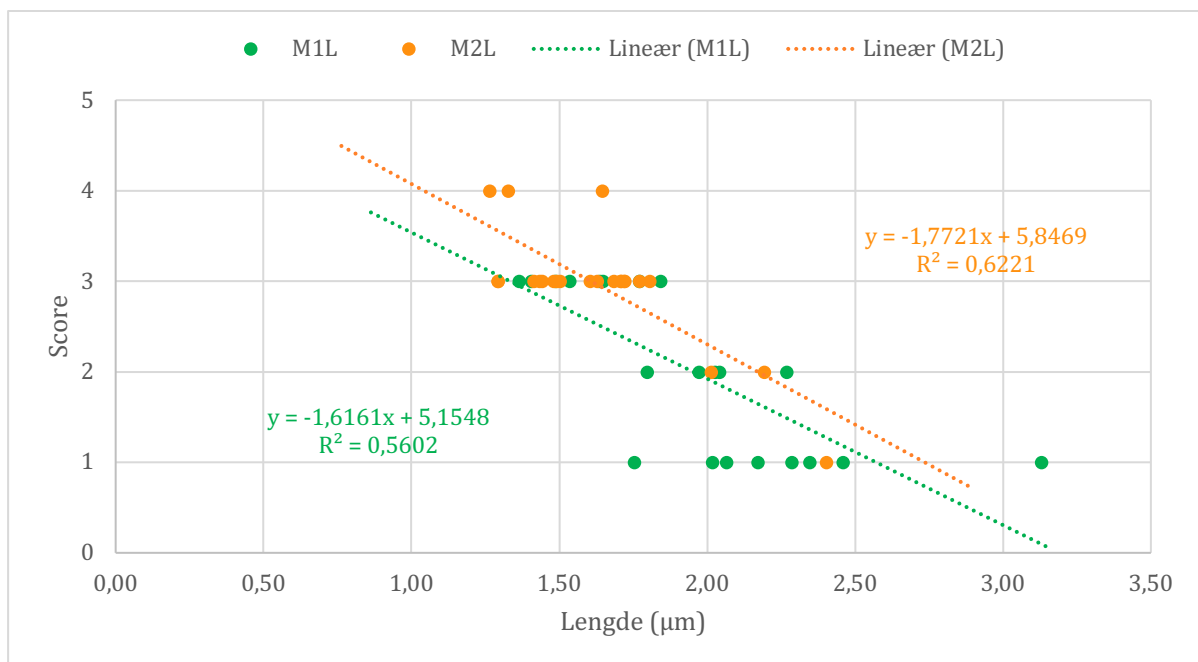
Statistisk analyse bekreftet en signifikant korrelasjon mellom målt lengde, x og score, y ved korrelasjonsanalyse for både 0-prøver (figur 24) og sluttprøver (figur 25). Når x, lengden på mucosafolden øker, synker y, score. Tilhørende regresjonsmodell viser at mye av variasjonen i Y kan forklares av variasjonen i X for både M1 og M2.

For 0-prøvene er gjennomsnittlig målt lengde på mucosafoldene i segment M1 1,7  $\mu\text{m}$ , og 1,8  $\mu\text{m}$  i M2.



Figur 24. Forholdet mellom vurdert score (1-5) og målt lengde på mucosafoldene (µm) av alle analyserte 0-prøver fra begge diettgrupper. Forholdet illustreres av regresjonslinje (lineær striplet linje) med tilhørende regresjonsformel for tarmsegment M1 (grønn) og M2 (oransje).

Ved forsøkslutt er gjennomsnittlig målt lengde på mucosafoldene i segment M1 1,95µm, og 1,63µm i M2.



Figur 25. Forholdet mellom vurdert score (1-5) og målt lengde på mucosafoldene (µm) av alle analyserte sluttprøver fra begge diettgrupper. Forholdet illustreres av regresjonslinje (lineær striplet linje) med tilhørende regresjonsformel for tarmsegment M1 (grønn) og M2 (oransje).

En ANCOVA-analyse av sluttprøvene med lengde som kovariat, viser ingen signifikant forskjell mellom gruppene for målt lengde på mucosafoldene i segment M1

( $F_{1,18}=0,540$ ,  $p=0,472$ ) eller segment M2 ( $F_{1,20}=0,012$ ,  $p=0,915$ ). Samme analyse viser ingen signifikant påvirkning av fiskelengde på foldlengde i M1, mens i M2 er det signifikant effekt ( $F_{1,20}=10,004$ ,  $p=0,005$ ) med koeffisient 0,165. Dette viser at lengden på mucosafoldene i M2 blir større i takt med lengre fisk.

Ved utførelse av ANCOVA-analyse får man opp et residualplot for mucosafoldlengde i M1 og M2. Residualene var fordelt homogent rundt 0, som viser at utgangsdataen er normalfordelt. En Kolmogorov-Smirnov Lilliefors test bekreftet at dataen ikke var forskjellig fra normalfordeling, med  $p=0,501$  i M1 og  $p=0,997$  i M2.

### 3.5.3 Mikrografi av snitt

#### 3.5.3.1 Normalen

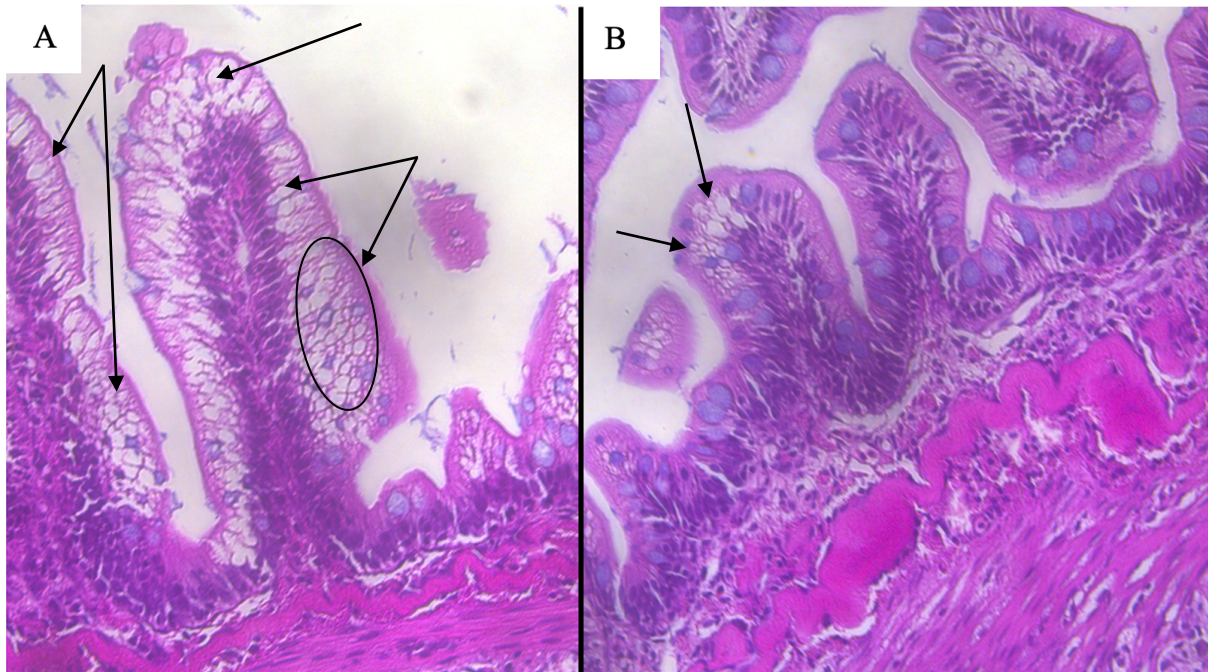
Figur 26 viser snitt med normal morfologi (score 1). Ingen tegn til supranukleære vakuoler i enterocytene, tynn lamina propria i mucosafoldene, tynt bindevevslag mellom bunn av mucosafoldene og stratum compactum, og lange og tynne mucosafolder.



Figur 26. Mikrografiet viser et HE-farget snitt av midttarm til oppdrettslaks med normal morfologi (obj.x10).  
Mikrografi: Kristina Finden Tronsen.

### 3.5.3.2 Supranukleære vakuoler

En av sluttprøvene fikk score 5 på supranukleære vakuoler i den histologiske vurderingen (se figur 23). Bildet i figur 27A viser et eksempel på score 5 (obj.x20), alvorlige endringer. Bildet i figur 27B viser et snitt med score 3 (obj.x20), klar økning, for avbildet område.

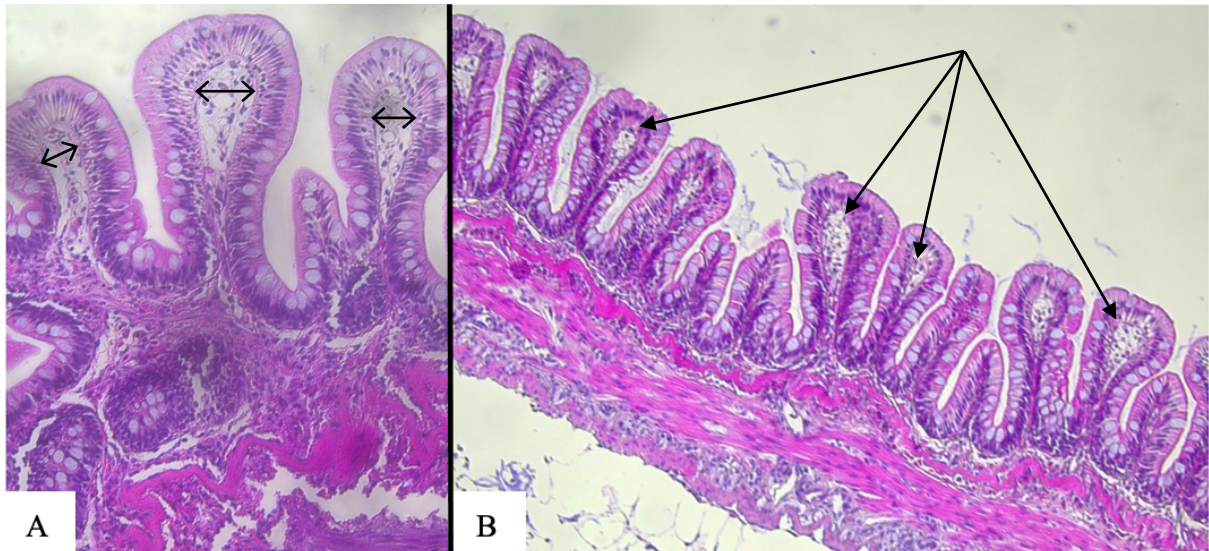


Figur 27. Mikrografi A og B viser HE-fargede histologiske snitt fra midttarm til laks med ulik grad av supranukleære vakuoler (SV) (obj. x20); A er eksempel på score 5, B er eksempel på score 3. Sirkelen i bilde A ringer inn et område med mye SV. Pilene peker på SV. Mikrografi: Kristina Finden Tronsen.

### 3.5.3.3 Lamina propria i mucosafoldene

Større andelen snitt fra M2 fikk høyere score for LP i forhold til M1 (se figur 22 og 23). Figur 28A er et eksempel på utvidet lamina propria, score 4, tjukk lamina propria. Figur 28B er et eksempel på score 3, klar økning i utvidet LP i de fleste mucosafolder.

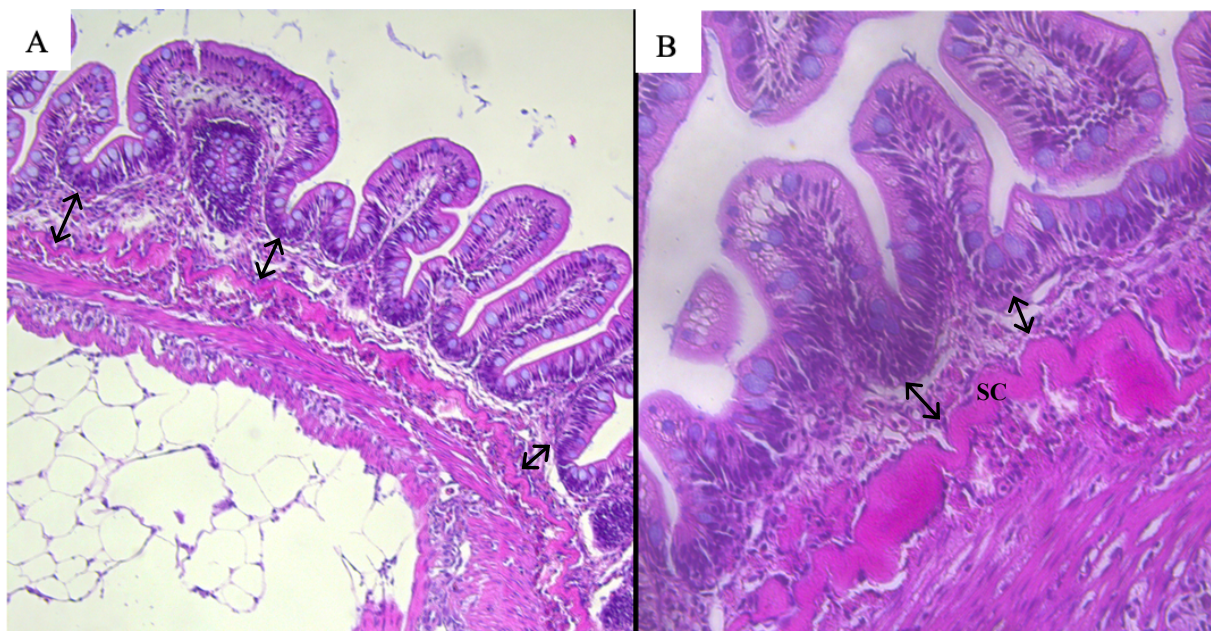




Figur 28. Mikrografi A (obj. x20) og B (obj. x10) viser HE-fargede histologiske snitt fra midttarm til laks med utvidet lamina propria (LP) i mucosafoldene. (A) toveis piler illustrerer utvidelsen av LP. (B) pilene peker på noen av foldene med utvidet LP. Mikrografi: Kristina Finden Tronsen.

### 3.5.3.4 Bindevæv

Ved vurdering av bindevæv mellom basen av mucosafoldene og stratum compactum var det få snitt med score 4 og ingen med score 5 i verken 0-prøvene eller sluttprøvene (se figur 22 og 23). Figur 29A viser score 3; klar økning under samtlige mucosafolder, og figur 29B viser score 4; tjukt bindevæv, for avbildet område.



Figur 29. Mikrografi A (obj. x10) og B (obj. x20) viser HE-fargede histologiske snitt fra midttarm til laks med utvidet bindevæv mellom bunn av mucosafoldene og stratum compactum (SC). Toveis piler viser utvidelsen. Mikrografi: Kristina Finden Tronsen.

### 3.5.3.5 Mucosafolder

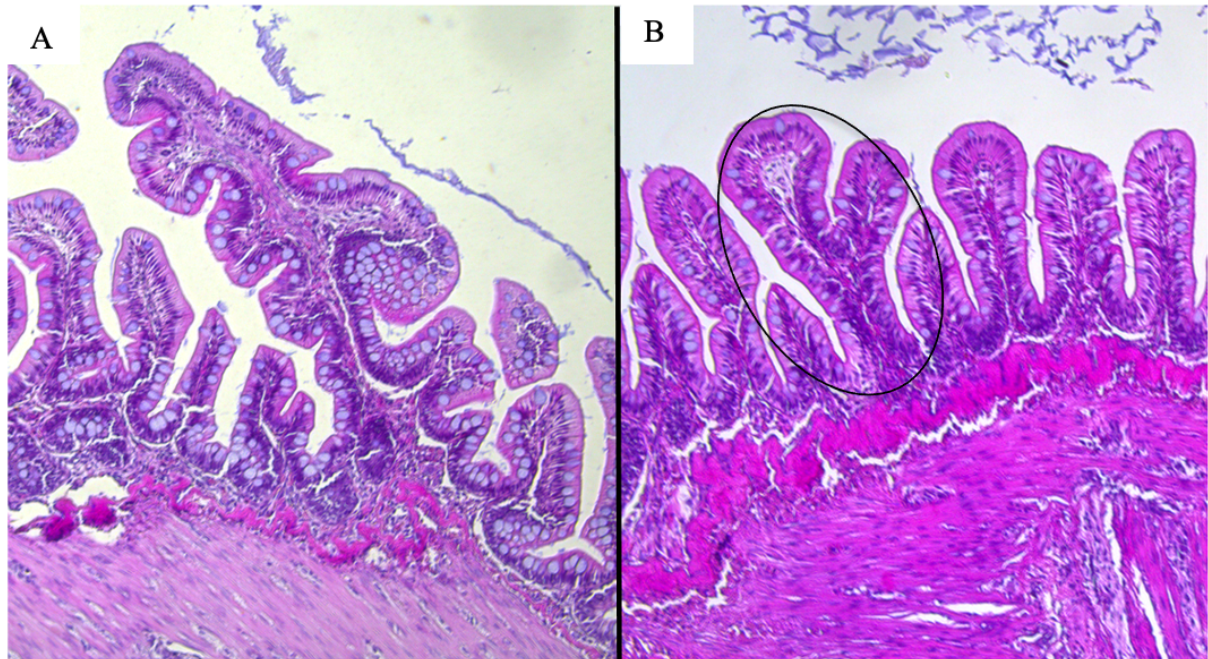
Score for mucosafoldene varierte fra 1 til 4 (figur 22 og 23), ingen snitt ble vurdert til score 5. Figur 30 viser et eksempel på stumpe/butte folder inni mellom folder av medium lengde. Dette snittet vurderes til score 3 da det er dominerende andel medium lange folder.



Figur 30. Mikrografiet viser et HE-farget histologisk snitt fra midttarm til laks (obj. x10) med stumpe/butte mucosafolder (piler). Mikrografi: Kristina Finden Tronsen.

### 3.5.3.6 Komplekse folder

Det ble observert svært få store komplekse folder slik som i figur 31A. De få som ble observert var i hovedsak fra tarmsegment M2. Det var derimot relativt vanlig å se folder med en til to forgreining(er), som vist i figur 31B.



Figur 31. Mikrografi A (obj. x10) og B (obj. x10) viser HE-fargede histologiske snitt fra midttarm til laks med (A) en kompleks muosafold og (B) mucosafold med en forgreining (innringet). Mikrografi: Kristina Finden Tronsen.

### 3.6 Tarminnhold

Ved tarmprøveuttak ble det observert godt med visceralfett rundt tarmkanalen hos de fleste individer. Blant individer i bindergruppen ble det observert tarminnhold med tydelig fastere konsistens. Et eksempel er vist på bildet i figur 32.



Figur 32. Observasjon av fastere feces blant individer som fikk fôr med binder. Foto: Kristina Finden Tronsen.

## 4 Diskusjon

I dette forsøket er det vist at tilsetning av GG i fôr til laks i settefiskstadiet, fôret i en periode på 24-25 dager, ikke har signifikant effekt på noen av de undersøkte parameterne; vekt, lengde, spesifikk vekstrate eller kondisjonsfaktor. Det var heller ikke signifikant effekt på frekvens av histologisk normal og unormal status for midttarmen.

Vektutvikling og SGR kan brukes som indikatorer for velferd (Huntingford & Kadri, 2009; Spaho m.fl., 2013). Vektutviklingen og SGR, samt lengde og kondisjonsfaktor ville blitt påvirket om GG affiserte absorpsjon, appetitt eller tarmstruktur negativt. Ingen negativ effekt på disse parameterne, indikerer at GG ikke fører til redusert velferd.

Tarmen er en innfallsrute for mange patogene mikroorganismer (Løkka & Koppang, 2016; Ringø m.fl., 2007). Mucus består av viktige komponenter som beskytter individet mot mikrober og kjemikalier (Krogdahl m.fl., 2011; Montagne m.fl. 2004). Slitasje av mucosa og mucus er derfor uheldig da det gir en innfallspore for uønskede mikroorganismer, og tarmens immunologiske rolle svekkes. Tilstanden til både cellene og selve vevet er vitalt for å yte et godt motstandsapparat (Ringø m.fl., 2007) som beskytter individet mot sykdom, samt for opptak av de næringsstoffer individet trenger for utvikling og vekst (Noble m.fl., 2018). De alarmerende funnene som ble oppnådd i forsøket Feed'n'Treat er en trussel mot individenes helse og velferd. Det er derfor godt nytt at det ikke kunne avdekkes negative funn i tarm eller tilvekst med binderkonsentrasjonen benyttet i dette forsøket. Dette betyr at GG kan brukes som binder i fôr til laks i settefiskfasen i RAS-anlegg, uten at det går ut over fiskens helse og velferd, eller tilvekst og produksjonsfremgang.

### 4.1 Vekstdata

Det var ingen forskjell mellom gruppene i fiskens størrelse (vekt eller lengde), SGR eller k-faktor ved noen tidspunkt. Fisken i begge diettgrupper har vokst godt i henhold til Skrettings tilvekstmodell (vedlegg 7), som er en pekepinn for forventet tilvekst (S. Tømmerås, Fagsjef Landbasert i Skretting AS Norge, personlig kommunikasjon, 28. januar 2021). Samt var fisken i god stand, i følge Barnham & Baxter (1998), som anser en k-verdi på 1 som fisk med dårlig kondisjon (tynn i forhold til lengden), og en k-verdi lik 1,4 som en fisk i god stand.

I forsøket Feed'n'Treat hadde GG signifikant negativ effekt på tilvekstraten i motsetning til resultatene i dette forsøket. Ved forsøksslutt var SGR i begge diettgrupper litt under forventet i følge Skretting AS sin vekstmodell-tabell (vedlegg 7), som oppgir forventet

SGR på 1,81 for 100g laks i 12 °C ferskvann, men fortsatt har fisken hatt god tilvekst. Noe lavere SGR kan ha sammenheng med kontinuerlig fôring. Ubegrenset tilgang på mat til enhver tid kan totalt føre til større inntak av mat, der det er vist sammenheng mellom større porsjoner og økt passasjehastighet gjennom tarmkanalen (Jobling, 1995). Økt passasjehastighet kan medføre til at næringsstoffer ikke rekker å bli fordøyd/absorbert i den grad det er mulig, og dermed går tilgjengelig næring ut med feces.

Begge diettgrupper hadde en lavere og jevnere SGR (mindre spredning) ved SGR2, sammenlignet med SGR1. Det er forventet nedgang i SGR da vekstraten varierer med størrelsen på fisken (Noble m.fl., 2018), der større fisk har lavere vekstrate. Dette kan også sees i Skretting AS sin tilveksttabell (vedlegg 7). Mindre spredning indikerer at laksen har funnet seg til rette i sin karstruktur og dynamikk, fôringsregimet, og at miljø og omgivelser har vært stabile gjennom forsøksperioden (Adams m.fl., 2000; Jobling, 2001; Måge & Damsgård, 2001; Noble m.fl., 2018). Ved SGR2 er standardavviket i bindergruppen større enn i kontrollgruppen. Dette som følge av variasjon mellom replikatene, kar 1, 3 og 5 (se vedlegg 9). Strømbildet i binderreplikatene kan være en innvirkende variabel til denne variasjonen der det er større differanse i gjennomsnittlig vannstrømhastighet mellom binderreplikatene ved MP 2 og 3, sammenlignet med kontrollreplikatene (vedlegg 6). Dette kan komme av større variasjon i strålerørets posisjon og utforming mellom binderreplikatene, sammenlignet med kontrollreplikatene (se tabell 2 i kapittel 2.2). Forskjellen i strømhastighet er derimot ikke stor og verdiene tilknyttet fôring (vedlegg 3), oksygen og temperatur (vedlegg 2) er ellers samsvarende i alle kar. Større variasjon i SGR2 i binderreplikatene er derfor vanskelig å vurdere bakgrunn for.

Fisken ble lengre, tyngre og tjukkere gjennom forsøksperioden. Forskjell i vekt over tid hos kontrollgruppen er et kriterie i vektstudier der ulike behandlinger sammenlignes. Dette som følge av at det er vesentlig at forsøksfisken har mulighet til å ta ut sitt vekstpotensiale for de gitte forsøksbetingelser, som kontrolleres opp mot kontrollgruppen. Hadde kontrollgruppen vokst dårlig, ville det vært vanskelig å forsvare resultatene i oppgaven. Forsøksoppsettet har lagt til rette for god og uforstyrret vekstutvikling, karoppstillingen har sannsynligvis ikke påvirket utfallet av resultatene til fordel for noen av behandlingene og triplikat forsøksoppsett kontrollerer resultatene per gruppe med hensyn til kareffekter.

Standardavviket til gjennomsnittsvekten øker for hvert måletidspunkt i begge diettgruppene (figur 16/vedlegg 10). Dette er forventet da en populasjon med større fisk (vekt) har større absolutt variasjon i vekt. Ved å korrigere variasjonen med hensyn til vekt, har ikke variasjonen økt mer enn forventet (tabell 8). Ved forsøksslutt er det lite forskjell i CV mellom

replikatene som indikerer at forsøksforholdene og oppsettet har hatt samsvarende effekt på replikatene. Fra T1-T2 økte CV i replikatene med 0,3-2,5% (se vedlegg 8). Årsaken til økt heterogenitet fra T1 til T2 er ikke åpenbar sett i sammenheng med stabile målte parameter (vannstrøm, fôring, oksygen- og temperaturverdier), men kan være resultat av sosiale interaksjoner med dominerende og subdominerende individer (Måge & Damsgård, 2001), behov for større vanntilførsel og strømhastighet på større fisk, eller at fôrtildelingsmetoden er mindre gunstig for større fisk.

Vektdata blant merket og umerket fisk i hver gruppe ved hvert måletidspunkt er vist i figur 17. Merket og umerket fisk har tilsynelatende oppført seg likt, spist og vokst like godt. Dette underbygger at våre tall, basert på merket fisk, er representative for all fisk per kar.

Oppdrettslaks betegnes som feit fisk, som vil si at de lagrer energireserver i muskel og rundt innvollene (Einen, 2001). Ved uttak av tarmprøver ble det observert godt med visceralfett omkring tarmkanalen, ellers var det ikke veldig mye visceralfett i fisken. Hadde forsøksfisken fått mer eller oftere tilgang på fôr, ville fisken sannsynligvis ikke vokst bedre, ettersom den har fått nok tilgang på mat til å lagre fettvev i buken også.

Forholdet mellom planlagt utfôret mengde og beregnet daglig biomasse er relativt høy (figur 21). Dette viser at fôrtildelingen sannsynligvis ikke har begrenset tilveksten, slik at fisken har fått mulighet til å spise seg mett hver dag som underbygger at betingelsene for vekst er oppfylt. Utfôringen er konstant gjennom hele uken, og hver dag blir utfôring i forhold til prosent kroppsvekt lavere ettersom ukentlig utfôring er konstant og beregningene tar hensyn til forventet daglig vektøkning. Kar 3 har lavest forhold mellom daglig utfôring og daglig biomasseøkning og lavest FF. Dette kan sees i sammenheng med at fisken i kar 3 har høyest biomasse, ved forsøksstart og forsøkslutt (vedlegg 11).

Diettene er kommersielt tilgjengelige og så like det er mulig å få de. Begge har utgangspunkt i samme resept – Nutra Olympic, men i tillegg til å mangle binder er kontrollfôret tilsatt hva produsenten omtaler som en vekstfremmende mineralmiks. Denne opplysningen tilfalt forsøkshaver etter at forsøket var igangsatt. Basert på resultatene fra dette forsøket har denne mineralmiksen tilsynelatende liten positiv effekt på tilveksten, og GG i Nutra RC ser, som nevnt, ikke ut til å ha negativ effekt på tilveksten. Dette er derimot et kort forsøk på i underkant av fire uker, og det kan ikke utelates at lengre tids fôring kunne vist effekt av mineralmiksen eller GG. På 24-25 dager burde man likevel sett effekter som følge av kontinuerlig eksponering for mat og god tilvekst. Mineralmiksen tilsatt kontrollfôret kunne ført til at nullhypotesen om at binder i fôret ikke har negativ effekt på vekst, hadde blitt forkastet på feil grunnlag. Dersom mineralmiksen faktisk gav en positiv effekt, ville en kunne

konkludere med at binderen har negativ effekt selv uten at den påvirket tilveksten. På den annen side, om mineralmiksen var tilsatt binderfôret kunne det ha maskert eventuelle negative effekter av GG.

Guar gum er ufordøyelig for laksefisk. Ved hjelp av enzymet  $\alpha$ -glukosidase kan laks hydrolysere  $\alpha$ -(1-6)-glykosidiske bindinger, slik som sidekjedene i GG-molekylet. Men for at  $\alpha$ -glukosidase kan utøve effekt, må molekylene være 7 monomerer eller kortere (Hamre, 2001), som ikke vil forekomme da laks ikke har enzymer som kan hydrolysere  $\beta$ -(1-4)-bindinger mellom mannosemolekylene i «ryggraden» av GG-molekylet (Hansen & Storebakken, 2007). Som følge av at GG er ufordøyelig kan det tilsettes i lave mengder, da konsentrasjonen vil øke bakover fordøyelseskanalen i takt med absorpsjon av vann og næringsstoffer (Brinker m.fl., 2005A). Slik vil GG-konsentrasjonen oppnå nivåer som gir ønsket effekt på selve avføringen i bakerste deler av tarmkanalen. Ved å kunne tilsette lavere konsentrasjoner GG i fôret reduseres risikoen for uheldige bieffekter.

Resultatene i dette forsøket samsvarer med Brinker (2005A) og Brinker (2007) som ikke fant forskjeller i vekstrate hos regnbueørret fôret med 0,3% GG. Det ble heller ikke funnet forskjell i fordøyelighet av næringsstoffer (Brinker, 2005A), eller fôrfaktor (Brinker, 2007). Brinker og Reiter (2011) fôret regnbueørret med fôr der fiskemel var erstattet med ulike mengder planteprotein og GG, og fant ingen effekt av 0,3% GG på tilvekst. Forsøk på Afrikansk ålemalle (*Clarias gariepinus*) med 4 og 8% GG gav ikke redusert tilvekst (Leenhouders m.fl., 2006). Forsøk på Nistripet havkaruss (*Diplodus sargus*) med 4, 8 og 12% GG gav ingen signifikant effekt på vekt eller tilvekst (Enes m.fl., 2012). Storebakken (1985) viste i forsøk på regnbueørret (*Salmo gairdneri*) at 2,5% GG ikke førte til redusert vekstrate eller fôrutnyttelse. På den annen side førte GG-konsentrasjoner på 5 og 8% til signifikant redusert SGR og lavere fôrutnyttelse, som viser til dårligere utnyttelse av fôret og/eller redusert appetitt. I Feed'n'Treat ble det dokumentert lavere SGR hos laks med 0,15 % GG i fôret (B.-S. Sæther, professor ved UiT-Norges arktiske universitet, personlig kommunikasjon, 2. september 2020). Amirkolaie m.fl. (2005) studerte effekten av løselige og uløselige NSP i fôr til Nilmunnruger (*Oreochromis niloticus* L.), deriblant GG, som viste at 8% GG gav redusert matinntak, redusert fordøyelighet og signifikant reduksjon i vekst. Tran-Tu m.fl. (2018) utførte forsøk på Haimalle (*Pangasianodon hypophthalmus*) med 0,3 og 0,6% GG, og fikk redusert vekst. I et todelt forsøk på Haimalle fikk Tu-Tran m.fl. (2019) i forsøksdel 1 ingen redusert vekstutvikling etter 29 dager med følgende GG-konsentrasjoner: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3%. I forsøksdel 2, som varte dobbelt så lenge (60 dager), ble det derimot vist redusert vekst ved 0,3% GG. Stripet slangehodefisk (*Channa striata*) fikk signifikant redusert

SGR med 0,01, 0,02 og 0,03% GG i fôret (Janphirom m.fl., 2010). Damkaruss (*Carassius gibelio*) fikk signifikant redusert SGR med 3 og 5% GG i fôret, men ikke 1% (Gao m.fl., 2019). Brinker (2009) undersøkte effekten av 0,3% GG i fôr til regnbueørret i tre størrelsesklasser; liten (ca. 40g), middels (ca. 150g) og stor (ca. 650g). Der viste resultatene at liten og middels fisk hadde uaffisert SGR i forhold til kontrollgruppene. Mens stor fisk hadde signifikant lavere SGR. Variasjonen i effekt av GG i diett til fisk kan komme av variasjon i toleranse blant arter, størrelsen/alderen på fisken, ulike forsøksbetingelser, fôringsstrategi, ulik forsøksperiode, mengden tilsatt GG og diettens generelle sammensetning. Men tendensen er at høyere konsentrasjoner GG per art øker sannsynligheten for negativ effekt. Derfor bør ikke GG tilsettes i større mengder enn akkurat nødvendig for ønsket effekt.

## 4.2 Histologi

Det var ingen forskjell i frekvens av normal og unormal morfologi mellom diettgruppene for noen av de undersøkte kriteriene (SV, LP, BV, MF), verken i tarmsegment M1 eller M2. Flere forsøk med 0,3% GG i fôr til regnbueørret har heller ikke vist synlige tegn til irritasjon/inflammasjon i tarm; Brinker m.fl. (2005A) og Brinker (2007) fant noen tarmendringer, men dette uavhengig av om det var binder i fôret eller ikke. Forsøk på Nistripet havkaruss med 4, 8 og 12% GG i fôret, avdekket ingen negativ morfologisk effekt (Enes m.fl., 2012). I forsøk på Damkaruss brukte Gao m.fl. (2019) lengde på mucosafolder i baktarmen som indikator på tarmskader, og fikk kortere mucosafolder ved 3 og 5% GG. I forsøket Feed'n'Treat med 0,15% GG i fôr til laks ble det observert slitasje på tarmvev, samt mikroskopiske blødninger i tarmvev (B.-S. Sæther, professor ved UiT-Norges arktiske universitet, personlig kommunikasjon, 2. september 2020; Johnsen, 2012).

Slitasje og inflammasjonssymptomer ble observert ved alle kriterier i begge diettgrupper. Dette var ikke uventet da det var oppgitt at fôrdiettene inneholdt soyaproteinkonsentrat (SPC), og består av vegetabiliske råvarer (vedlegg 4 og 5). Det var derimot ikke forventet signifikant forskjell mellom diettgruppene ettersom det ikke var signifikant forskjell i vekt, lengde, SGR eller k-faktor. Hadde bindergruppen vist redusert vekstdata ville det kunne betydd at tarmen var preget av slitasje eller inflammasjon. Dagens fôr til laksefisk består av størst andel vegetabiliske råvarer (Aas m.fl., 2019; Ytrestøyl m.fl., 2015), og planteråvarer består generelt av en ugunstig aminosyresammensetning, ugunstig mineralsammensetning (Hemre m.fl., 2009), løselige og uløselige fiber, stivelse og antinæringsstoffer (Gatlin m.fl., 2007 referert i Sørensen m.fl., 2011 s. 18; Hemre m.fl., 2009;



Ytrestøyl m.fl., 2014). I følge Gatlin m.fl., 2007 og Turchini m.fl., 2009 (referert i Aas m.fl., 2019) s. 1), samt Hjeltnes m.fl. (2016), kan dette ha negativ innvirkning på tarmhelse, påvirke næringsopptak, redusere vekst og velferd. Forsøksdiettene inneholdt blant annet solsikkemel, hvete gluten, fababønner og SPC som proteinkilder. Det er ikke funnet histologiske endringer i tarm ved bruk av solsikkemel eller hvete gluten hos laks (Hemre m.fl., 2009). Når det gjelder SPC, fremstilles det ved viderebehandling av soyabønnemel (SBM) som har en relativt god aminosyreprofil, men som ved flere forsøk har vist å gi enteritt i baktarm hos laks. De tydelige morfologiske negative effekten som følge av SBM er forkortede primærfolder og mucosafolder, utvidet lamina propria infiltrert av immunceller, nedgang eller tap av supranukleære vakuoler i enterocytter, samt utvidet bindevevslag mellom bunnen av sekundær mucosafold og stratum compactum (Bakke-McKellep m.fl., 2000B; Bæverfjord & Krogdahl, 1996; Chikwati m.fl., 2013; Kraugerud m.fl., 2007; Krogdahl m.fl., 2003; van den Ingh m.fl., 1991). Ved å rense/viderebehandle SBM ved bruk av alkoholekstraksjon, reduseres mengden av de alkohol-løselige komponentene som er mistenkt være assosiert med inflammasjonsresponsene (Knudsen m.fl., 2007), med SPC som resultat.

Soyaproteinkonsentrat inneholder høyere konsentrasjon proteiner, har et lavt innhold av antinæringsstoffer, karbohydrater og fiber (Bureau m.fl., 1998), gir ikke den typiske soyabønne-induserte enteritten i baktarm hos laksefisk (Escaffre m.fl., 2007; van den Ingh m.fl., 1991) og kan tilsettes i større mengder i fôr til karnivor fisk (Sørensen m.fl., 2011). Soyaproteinkonsentrat er den vegetabiliske ingrediensen som brukes mest i fôr til laksefisk i Norge (Aas m.fl., 2019). Hvor mange prosent SPC som er tilsatt forsøksfôr, er ikke kjent. Selv om de enkelte vegetabiliske råvarene ikke fører til endret histologisk morfologi i tarm alene, kan kombinasjonen av diettens mange vegetabiliske råvarer og komponentene i disse, som man generelt vet lite om langtidsvirkningen av (Hemre m.fl., 2009), være bidragene til tegnene til inflammasjonsreaksjon i midttarm.

Fordelingen av score, 1-5, for alle vurderte histologiske kriterier, ser ut til å ha en større andel høyere score i bakre deler av midttarm, sammenlignet med fremre (figur 22 og 23). I denne sammenligningen sees begge diettgruppene under ett da det ikke er signifikant forskjell mellom gruppene i normal og unormal morfologi. Tendensen til høyere slitasje og inflammasjonsgrad i M2 sees ved begge prøveuttak, men er spesielt synlig blant sluttprøvene. For 0-prøvene bekrefter statistisk analyse høyere andel unormal morfologi i M2 kun for LP. For sluttprøvene er det derimot statistisk høyere andel unormal morfologi i M2 for alle kriterier. Siden all forsøksfisk fikk tildelt samme fôr før forsøksstart som kontrollgruppen fikk gjennom forsøket, er denne forskjellen mellom 0-prøvene og sluttprøvene overraskende.

Mulig årsak til høyere slitasje og inflammasjonsreaksjon i M2 kan være et resultat av absorpsjon. Hos laks med stort antall pylorusblindsekker forekommer størstedelen av absorpsjon av glukose, aminosyrer, di- og tripeptider i blindsekkene og fremre deler av midttarm, og kan utgjøre 65-80% av total næringsstoffabsorpsjon (Sundell & Rønnestad, 2011). Samt forekommer det meste av fettabsorpsjon i pylorusblindsekkene hos laks (Krogdahl m.fl., 2011; Røsjø m.fl., 2000). Dette gjør at konsentrasjonen av ufordøyelige komponenter øker bakover midttarm. I tillegg blir kymet tørrere (Kryvi & Totland, 1997) som kan føre til økt sliteskade og muligens trigge inflammasjonsreaksjoner, bakover i tarmkanalen. Forskyvningen av høyere score i M2 kan også komme av forskjell i membrantransportører og egenskapene til disse gjennom tarmkanalen. I følge Krogdahl m.fl. (2005) ser det for eksempel ut til at glukosetransportørens affinitet til glukose øker fra fremre til distale deler av tarm, der det er lavest affinitet til glukose i pylorusblindsekkene. Selve glukoseopptaket er høyest i pylorusblindsekkene som følge av konsentrasjonen (Bakke-McKellep m.fl., 2000A), men glukosetransportørene i bakre deler i tarm fanger glukosemolekyler mer effektivt fra kymet. Man vet lite om tarmens funksjon hos laks, og fisk generelt, på dette nivået, men forskjell i membranproteiner kan være en medvirkende årsak til forskjell i inflammasjonsrespons mellom M1 og M2. En annen mulig forklaring kan være den immunologiske aktiviteten i bakre deler av midttarm, da de siste 2/3 delene av midttarmen har høyere immunologisk aktivitet enn fremre deler (Bjørngen m.fl., 2020). Blant annet har Løkka m.fl. (2014) rapportert høyest transkripsjonsnivå av immunceller i bakre deler av midttarm sammenlignet med resten av midttarmen, og Fuglem m.fl. (2010) har identifisert immunceller i bakre deler av midttarm, med egenskaper lik pattedyrs M-celler (engelsk; microfold cells). Samsvarende med økt immunologisk aktivitet blir paracellulær permeabilitet lavere bakover tarm, i takt med at andelen bakterier i forhold til næringsstoffer øker grunnet absorpsjon (Jutfelt, 2011). Sammenhengen mellom høyere konsentrasjon av bakterier og høyere immunologisk aktivitet, kan være medvirkende til at immunforsvaret i større grad kan gi tegn til inflammasjon i M2. Det er mangelfull kunnskap om mekanismene rundt fordøyelse og absorpsjon i tarmkanalen hos laks (Bjørngen m.fl., 2020; Krogdahl m.fl., 1999) og mye av informasjonen er basert på kunnskap om pattedyr. Ved å tilegne seg mer kunnskap om celler og transportmekanismer, funksjonen i de ulike tarmsegmentene og hvordan ernæring påvirker tarm- og fiskehelse, kan man avdekke årsaken til eventuelle negative effekter av diett og bedre fôr for kommersiell lakseproduksjon.

I de histologiske snittene ble det observert noen få komplekse folder blant vevsprøver fra segment M2 (figur 31A). Ellers kunne man se folder med en eller to stumpe/butte

sidegrener (figur 31B). Få observasjoner av komplekse folder i midttarm er i tråd med Løkka m.fl. (2013) sine observasjoner i villaks. Middtarmen består mest av enkle og noen få komplekse mucosafolder, mens andelen komplekse folder er dominerende i baktarm (Bjørgen m.fl., 2020; Løkka m.fl., 2013).

De aller fleste undersøkte snittene fra midttarm blant både 0-prøver og sluttprøver viste grad av slitte/korte mucosafolder. Kortere mucosafolder fører til redusert totalt overflateareal i tarmen og kan påvirke absorpsjonseffektiviteten av næringsstoffer, som i tur kan påvirke vekst. Erstatning av marine oljer med vegetabiliske, kan føre til kortere mucosafolder. Moldal m.fl. (2014) viste at 80% erstatning av totalt fettinnhold med olivenolje og rapsolje, gav signifikant kortere mucosafolder i midttarm hos laks sammenlignet med en diett med 100% fiskeolje. Forsøksdiettene inneholdt rapsolje og fiskeolje som kilder til fett (se vedlegg 4 og 5), der rapsoljen kan være medvirkende til kortere mucosafolder. Kortere mucosafolder kan også være et resultat av komponenter i fôret som fører til slitasje. Eller være en naturlig tilpasning til fôret som følge av rik mengde lett tilgjengelig energi som reduserer laksens behov for å opprettholde like stor tarmoverflate. Tarmens struktur og funksjon responderer nemlig raskt på mattilgang og sammensetning, med reversible endringer (Buddington m.fl., 1997; Olsson, 2011). Tarmen er et svært energikrevende system, og det vil være en naturlig tilpasning å eventuelt ikke opprettholde og bruke energi på mer tarmvev enn nødvendig. Eksempelvis er det vist at fasting i 2-4 dager reduserer vekten av pylorusblindsekkene med 25% hos laks, og lengre tids fasting kan trolig føre til halvering (Krogdahl, 2001). Bæverfjord & Krogdahl (1996) viste at matrestriksjoner hos laks raskt reduserte den relative vekten av tarmen, samt endringer i strukturen av mucosa som gav redusert absorpsjonsoverflate.

Avføring med fastere konsistens ble observert i bindergruppen (figur 32). I forsøkene til Brinker m.fl. (2005A), Brinker (2007, 2009) og Brinker & Friedrich (2012) ble det også observert en makroskopisk fastere feces, som de bekreftet hadde økt viskøsitet og elastisitet ved rheologiske undersøkelser. Brinker m.fl. (2005A) bekreftet også at feces fra GG-diett hadde høyere stabilitet ved hydromekanisk test.

For å ha noe mer histologisk kvantitativt å knytte resultatene opp mot, ble lengden på mucosafoldene målt. For begge tarmsegmentene er det korrelasjon mellom målt lengde på mucosafoldene og angitt score (figur 24 og 25). Ved lengre mucosafolder synker score. For 0-prøvene har M1 brattere stigning på regresjonslinjen enn M2, som betyr at lengre mucosafolder gir større nedgang i score for M1. Ved helt nedslitte mucosafolder vil skjæringspunktet på y-aksen være over score 5 for M1, men under score 4 for M2. Forholdet

lengde/score stemmer dermed bedre med scoresystemet for M1, dette viser også den relativt høye korrelasjonskoeffisienten. For sluttprøvene er stigningen på regresjonslinjene svært like. Korrelasjonen mellom lengde og score viser at beskrivelsene i det sub-kvantitative scoresystemet av Knudsen m.fl. (2007), modifisert av Hanne Johnsen, er veiledende for kriteriet mucosafold i sånn grad at man får en trend. Som nevnt, viste forsøket Feed'n'Treat økt slitasje på tarmvev som følge av GG (Johnsen, 2012). Resultatene fra ANCOVA-analysen i dette forsøket viser derimot ingen signifikant forskjell i lengde på mucosafoldene i midttarm mellom gruppene. Samme analyse viser heller ingen signifikant påvirkning av fiskelengde på mucosafoldlengde i M1, mens i M2 er det en signifikant positiv effekt som betyr at lengden på mucosafoldene blir lengre i takt med lengre fisk. Dette er forventet, da ingen andre resultater viser at GG fører til slitasje av mucosafoldene. Variabelen lengde ble brukt som kovariat fremfor vekt i ANCOVA-analysen da lengde er et mer stabilt mål på fiskestørrelsen, og ikke påvirket av mengde fôr inntatt siste døgn.

Det er viktig å bemerke at ved måling av lengde på mucosafoldene, er det noen få mucosafolder i et mikrogram fra et lite område fra vevssnittet som måles, og gjennomsnittet av disse målingene oppgis som én verdi per snitt. Det er forøvrig også viktig å nevne at scoren for mucosafoldene oppgis ikke bare basert på lengden, men også bredden (se tabell 6 i kapittel 2.8.7.4).

Det var ønskelig å samle inn 0-prøver til histologianalyse fra hele størrelsesspekteret ved forsøksstart for å ha mulighet til å se tilbake på disse ved eventuelle funn av sammenhenger mellom tarmendringer og fiskestørrelse/tilvekst. Av samme grunn ble det plukket ut individer til histologianalyse basert på SGR. Det ble ikke oppdaget en sammenheng mellom mengde inntatt mat og eksponering for binderen, og endret tarmmorfologi.

Forsøksfisken ble ikke sultet ved forsøksslutt av flere årsaker. For det første ville et døgn sulting føre til tapt fôringsdag. For det andre var det unødvendig å utsette fisken for sulting av velferdsmessige hensyn, siden den skulle avlives. For det tredje var det ukjent hvor mange kar det var mulig å avslutte per dag, da det bare var to personer som gjennomførte det avsluttende arbeidet med hensyn til restriksjonene tilknyttet koronapandemien. Forsøksfisken ble dermed kontinuerlig føret til siste slutt. Tilknyttet prøveuttak av tarm medførte dette til mye tarminnhold som måtte skylles godt bort med PBS, men har trolig ikke affisert de histologiske snittene.

Ved tarmprøveuttak ved forsøksslutt ble alle individene per kar avlivet samtidig som førte til at noen tarmprøver ble tatt av individer som hadde vært død lengre enn andre, omtrent

1 time og 30 minutter på det meste. Av de tarmprøvene som ble histologisk vurdert var det ikke åpenbare tegn til autolyse i tarmvevet. Trolig har ikke forskjellen i tidspunkt for prøveuttak påvirket tarmvevets morfologi.

Det er viktig å bemerke at ved histologisk undersøkelse er det et svært lite areal som legges til grunn for å si noe om tarmhelsen til individene. Hvert snitt representerer 5 $\mu$ m av midttarmens fremre og bakre del. Noen snitt er vanskeligere å vurdere enn andre som følge av kvaliteten på snittet, og noen snitt er delvis preget av håndteringsskader. Vurderingen av de histologiske snittene etter scorebeskrivelsen er subjektiv. Flere dommere ville gitt bedre tiltro til metoden og ytterligere korrigerer for subjektivitet. Ellers hadde det vært gunstig at scorebeskrivelsen utviklet av Knudsen m.fl. (2007), modifisert av Hanne Johnsen, bestod av skildrende mikrografi for hver score, slik at det sub-kvantitative systemet ble enda mer standardisert. Disse mikrografiene burde være fra oppdrettslaks i de sammenhenger scoresystemet nyttes til oppdrettslaks, siden det kan være ulik morfologi på mucosafoldene mellom villaks (Løkka m.fl., 2013) og oppdrettslaks.

### **4.3 Karforhold og fôring**

De seks forsøkskarene ble behandlet identisk med samme rutiner under samme forhold. For alle vekststudier er det viktig at fisken spiser godt og oppnår sitt vekstpotensiale. Fisken har derfor stått under kontinuerlig lys på en relativ høy vanntemperatur (12°C) og blitt overskuddsfôret med høy FF (tabell 9). Fôrfaktor er ikke den mest nøyaktige måleenheten på fôrutnyttelse, da man sammenligner enheter med ulikt vann- og næringsinnhold. Men sammenlignet med seg selv over tid gir det en indikasjon på utnyttelse og er en veletablert målemetode for fôreffektiviteten i oppdrettsnæringen. I denne masteroppgaven er det ønskelig å vise til overskuddsfôring, og i den sammenheng er det tilstrekkelig å benytte fôrfaktor som indikator. Formålet med overfôringen var å sikre at all fisk fikk tilgang til mer fôr enn den klarte å innta, hindre monopolisering, og motvirke dannelse av rangordninger og størrelsesspredning i fiskegruppen (Jobling, 2001; Måge og Damsgård, 2001) slik at fisken trives og vokser. Sett i sammen med høy FF (tabell 9), observasjon av fôr i karbunn av ansatte ved HiT, relativt høy utfôring i prosent av kroppsvekt (figur 21), observasjon som viste at fisken opptrådte rolig ved fôring, og visceralfett i buk, indikerer at fisken ble fôret til tilfredsstillelse med mulighet til å ta ut sitt vekstpotensiale. Som følge av i overkant mye fôrspill ble ukentlig mengde utfôring justert ned underveis i forsøket med hensyn til

vannmiljø (vedlegg 3). Forsøksfisken ble også overført i restitusjonsperioden T0 til T1 for å hindre aggresjon og økt størrelsesspredning i forkant av forsøksstart.

Grunnet koronapandemien kunne ikke forsøket gjennomføres i planlagt forsøkshall. Dette medførte endring av forsøkskar fra mindre, runde kar til større, firkantede kar med forskjellige innløp (se tabell 2 i kapittel 2.2). For å få mest mulig tilsvarende strømhastighet ble strålerørene innstilt og strømhastigheten målt på fire punkter per kar. Ønskelig hadde strømhastigheten i karene vært 1,2 ganger kroppslengden til fisken, da det har vist seg å være gunstig for Atlantisk laks (Hjeltnes m.fl., 2012). Dette lot seg ikke gjøre grunnet karenes form og forhåndsbestemt vanntilførsel på 10 L per minutt. Lavere vannstrømhastighet kan ha vært medvirkende til at fisken brukte mindre energi på å stå imot strømmen (Farrell m.fl., 2001; Hvas m.fl., 2019) og kunne bygge opp bukfett. Tettheten i karene kan påvirke interaksjonen mellom individene. Som tiltak for å redusere sjansene for hierarkidannelse (Måge & Damsgård, 2001) og territoriell adferd, samt bedre strømbildet i karet, ble vannvolumet redusert fra forsøkskarenes totale volumkapasitet på 900 L til omtrent 405 L (se figur 7 og tetthet i vedlegg 11).

Faktiske mål av strålerørenes posisjon og utforming, ble først mulig å kartlegge ved forsøksslutt da forsøkshaver fikk informasjon forskjellig innløp i alle forsøkskar etter at fisken var overført til karene. I ettertid viste det seg at kontrollreplikaten hadde mer like innløp enn binderreplikaten, som er et av argumentene for mulig årsak til større variasjon i SGR2 blant binderreplikaten. Hadde forsøkshaver hatt denne informasjonen på forhånd ville fordelingen av kar på dietter ikke vært sekvensiell.

Fisken i begge gruppene har hatt en god vekstrate gitt betingelsene og er i god stand med høy k-faktor. Det er ingen signifikant forskjell mellom diettgruppene, eller noen tendenser til forskjell mellom gruppene, som tilsier at det er lite størrelseseffekter, kareffekter og lite innvirkende effekter på gruppenivå.

Gjennom forsøket, og ved håndtering ved forsøksslutt, ble det ikke observert skader på finner eller skinn, som kan tyde på lite «sosialt stress», aggresjon og rangordning (Jobling, 2001; Måge & Damsgård, 2001). Med ingen tydelige tegn til negative interaksjoner mellom individene i karene, tyder dette på at fisken ikke har brukt unødvendig energi på «sosialt stress» og hatt mulighet til å oppnå sitt vekstpotensiale.

På grunn av koronapandemien og restriksjoner tilknyttet smittefare ble arbeid i forbindelse med den praktiske delen gjennomført av kun to personer, der det med fordel kunne vært flere, og antall besøk til forsøkslokasjonen gjennom forsøksperioden ble begrenset.

## 5 Konklusjon

Guar gum tilsettes fôr for å påvirke biologien slik at teknologien fungerer best mulig. Fecespartiklene skal bli større og fastere for å øke filtreringseffektiviteten, uten at det påvirker fiskens vekt, tilvekst, tarmhelse, velferd, helse eller produksjonsfremgang. Guar gum hadde ingen signifikant effekt på noen av de vurderte parameterne. Dette til tross for at kontrollgruppen var tilsatt en vekstfremmende mineralmiks. Ut fra resultatene i dette forsøket konkluderes det med at konsentrasjonen av GG (ikke oppgitt), i Skretting AS sitt fôr Nutra RC, ikke har negativ effekt på tilvekst, tarmvev, fiskevelferd eller fiskehelse hos laks (*Salmo salar*) i settefiskstadiet.

## Referanseliste

- Aas, T. S., Ytrestøyl, T. & Åsgård, T. (2019). Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports* 15, 1-10. Doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100216.
- Adams, C., Huntingford, F., Turnbull, J., Arnott, S. & Bell, A. (2000). Size heterogeneity can reduce aggression and promote growth in Atlantic salmon parr. *Aquaculture International* 8, 543–549. Doi: 10.1023/A:1009255612529
- Amirkolaie, A. K., Leenhouders, J. I., Verreth, A. J. & Schrama, J. W. (2005). Type of dietary fibre (soluble versus insoluble) influences digestion, faeces characteristics and faecal waste production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research* 36, 1157-1166. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01330.x
- Axelsson, M. & Seth, H. (2011). The Gastrointestinal Circulation. I A. P. Farrell (red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (s. 1132-1141). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Bakke-McKellep, A. M., Nordrum, S., Krogdahl, Å. & Buddington, R. K. (2000A). Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 33–44. Doi: 10.1023/A:1007872929847
- Bakke-McKellep, A. M., Press, C. McL., Bæverfjord, G., Krogdahl, Å. & Landsverk, T. (2000B). Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases* 23, 115–127. Doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00218.x
- Barnham, C. A., & Baxter, A. F. (1998). Condition factor, K, for salmonid fish. *Fisheries Notes* (sider 3). Department of Primary Industries, Melbourne, Victoria, Australia: Department of Primary Industries.
- Bash, J., Berman, C. & Bolton, S. (2001). *Effects of turbidity and suspended solids on salmonids*. Center for Streamside Studies, University of Washington (sider 74). <http://hdl.handle.net/1773/16382>



- Bjørngen, H., Li, Y., Kortner, T. M., Krogdahl, Å. & Koppang, E.O. (2020). *Fish and Shellfish Immunology* 107, 172–186. Doi: 10.1016/j.fsi.2020.09.032
- Bregnballe, K. (2015). *A Guide to Recirculation Aquaculture: An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and EUROFISH International Organisation, (sider 9-34 ). Hentet 28.11.20 fra:  
<http://www.fao.org/3/i4626e/i4626e.pdf>
- Brinker, A. (2007). Guar gum in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: The influence of quality and dose on stabilisation of faecal solids. *Aquaculture*, 267, 315-327. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.037
- Brinker A. (2009) Improving the mechanical characteristics of faecal waste in rainbow trout: the influence of fish size and treatment with a non-starch polysaccharide (guar gum). *Aquaculture Nutrition* 15, 229-240. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00587.x
- Brinker, A. & Friedrich, C. (2012). Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed. Part II: Effects on faeces stability and rheology. *Biorheology* 49, 27–48. Doi: 10.3233/BIR-2012-0605
- Brinker, A., Koppe, W., Rösch, R. (2005A). Optimised effluent treatment by stabilised trout faeces. *Aquaculture*, 249, 125-144. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.12.029
- Brinker A., Koppe, W. & Rösch, R. (2005B). Optimizing Trout Farm Effluent Treatment by Stabilizing Trout Feces: A Field Trial. *North American Journal of Aquaculture* 67, 244–258. Doi: 10.1577/A04-078.1
- Brinker. A. & Reiter, R. (2011). Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed, Part I: Effects on feed utilization and fish quality. *Aquaculture* 310, 350–360. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.041.
- Buddington, R. K., Krogdahl, Å. & Bakke-McKeppel, A. M. (1997). The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta physiologica Scandinavica* 161, 67-80. Hentet fra:  
[https://www.researchgate.net/publication/13807850\\_The\\_intestines\\_of\\_carnivorous\\_fish\\_Structure\\_and\\_functions\\_and\\_the\\_relations\\_with\\_diet](https://www.researchgate.net/publication/13807850_The_intestines_of_carnivorous_fish_Structure_and_functions_and_the_relations_with_diet)

- Bullock, G. L., Summerfelt, S. T., Noble, A. C., Weber, A. L., Durant, M. D. & Hankins, J. A. (1997). Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system: I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. *Aquaculture* 158, 43-55. Doi: 10.1016/S0044-8486(97)00063-X.
- Bureau, D. P., Harris, A. M. & Cho, C. Y. (1998). The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 161, 27–43. Doi: 10.1016/s0044-8486(97)00254-8
- Bæverfjord, G. & Krogdahl, Å. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases* 19, 375-387. Doi: 10.1046/j.1365-2761.1996.d01-92.x
- Chapman, P. M., Popham, J. D., Griffin, J., Leslie, D. & Michaelson, J. (1987). Differentiation of physical from chemical toxicity in solid waste fish bioassays. *Water, Air, and Soil Pollution* 33, 295-308. Doi: 10.1007/BF00294198
- Chen, S., Timmons, M. B., Aneshansley, D. J. & Bisogni Jr., J. J. (1993). Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112, 143-155. Doi: 10.1016/0044-8486(93)90440-A.
- Chikwati, E. M., Gu, Jinni., Penn, M. H., Bakke, A.M. & Krogdahl, Å. (2013). Intestinal epithelial cell proliferation and migration in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: effects of temperature and inflammation. *Cell Tissue Res* 353, 123-137. Doi: 10.1007/s00441-013-1631-9.
- Cripps, S. J. & Bergheim, A. (2000) Review: Solids management and removal for intensive land-based aquaculture production systems. *Aquacultural Engineering* 22, 33–56. Doi: 10.1016/S0144-8609(00)00031-5
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Brazil, B. & Summerfelt, S. (2009). Heavy metal and waste metabolite accumulation and their potential effect on rainbow trout performance in a replicated water reuse system operated at low or high system flushing rates. *Aquacultural Engineering* 41, 136–145. Doi: 10.1016/j.aquaeng.2009.04.001.

- Davidson, J. & Summerfelt, S. T. (2005). Solids removal from a coldwater recirculating system—comparison of a swirl separator and a radial-flow settler. *Aquacultural Engineering* 33, 47–61. Doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.11.002
- Einen, O. (2001). Vekst og fôrutnyttelse. R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (Eds.), *Fiskeernæring* (s. 205-217). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Enes, P. Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Couto, A., Pousão-Ferreira, P. & Oliva-Teles, A. (2012). Oxidative status and gut morphology of white sea bream, *Diplodus sargus* fed soluble non-starch polysaccharide supplemented diets. *Aquaculture* 358–359, 79–84. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.06.020
- Escaffre, A.-M., Kaushik, S. & Mambrini, M. (2007). Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. *Aquaculture* 273, 127–138. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.028
- FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (sider 1-90). Hentet fra: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>
- Farrell, A. P., Thorarensen, H. Axelsson, M. Crocker, C. E., Gamperl, A. K. & Cech Jr., J. J. (2001). Review: Gut blood flow in fish during exercise and severe hypercapnia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128, 551-563. Doi: 10.1016/s1095-6433(00)00335-4
- Francis, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227. Doi: 10.1016/S0044-8486(01)00526-9
- Fuglem, B., Jirillo, E., Bjerås, I., Kiyono, H., Nochi, T., Yuki, Y., Raida, M., Fischer, U. & Koppang, E. O. (2010). Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Developmental and Comparative Immunology* 34, 768–774. Doi: 10.1016/j.dci.2010.02.007

- Gao, S., Han, D., Zhu, X., Yang, Y., Liu, H., Xie, S. & Jin, J. (2019). Effects of guar gum on the growth performance and intestinal histology of gibel carp (*Carassius gibelio*). *Aquaculture* 501, 90–96. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.009
- Hamre, G.-I. (2001). Karbohydrat i fiskeernæring. I R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (red.), *Fiskeernæring* (s. 77-92). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Hansen, J. Ø. & Storebakken, T. (2007). Effects of dietary cellulose level on pellet quality and nutrient digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 272, 458–465. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.005
- Hansen, L.P. (1987) Viktige fiskearter: Laks. I R. Borgstrøm & L. P. Hansen (red.), *Fisk i ferskvann: økologi og ressursforvaltning* (s. 50-66). Oslo: Landbruksforlaget.
- Hardy, R. W. (2010). Review Article: Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41, 770-776. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x
- Hemre, G-I., Amlund, H., Aurstad, M., Bakke-McKellep, A. M., Olsen, R. E., Ringø, E. & Svihus, B. (2009). *Criteria for safe use of plant ingredients in diets for aquacultured fish* (VKM Report 07/604). Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM), 31 sider. Doi: 10.9734/EJNFS/2018/43861
- Hersoug, B. (2015). The greening of Norwegian salmon production. *Maritime Studies* 14(16), 1-19. Doi: 10.1186/s40152-015-0034-9
- Hilmarsen, Ø. Holte, E. A., Brendeløkken, H., Høyli, R. & Hognes, E. S. (2018). *Konsekvensanalyse av landbasert oppdrett av laks – matfisk og post-smolt*. I *Analyse av landbasert oppdrett av laks: produksjon, økonomi og risiko*. Sluttrapport for FHF prosjekt 901441 (SINTEF Ocean AS OC2018 A-033), 81 sider. Hentet 11.11.20 fra: <http://fisk.no/attachments/article/6572/landbasert-lakseoppdrett-analyse.pdf>
- Hjeltnes, B., Bæverfjord, G., Erikson, U., Mortensen, S., Rosten, T. & Østergård, P. (2012). *Risk Assessment of Recirculation Systems in Salmonid Hatcheries* (VKM Rapport 2012:01). Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM), 110 sider.

<https://vkm.no/english/riskassessments/allpublications/riskassessmentofrecirculationsystemsinsalmonidhatcheries.4.72c3261615e09f2472f46f9b.html>

Hjeltnes, B., Walde, C. S., Jensen, B. B. & Haukaas, A. (2016). *Fiskehelse rapporten 2015* (Veterinærinstituttet Rapport nr. 3 – 2016), (s. 15-17). Hentet fra:

<https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2016/fiskehelse rapporten-2015>

Hovland, E. (2014). Østenfor sol og vestenfor måne: Havbruksnæringen – et eventyr. I Hovland, E., Møller, D., Haaland, A., Kolle, N., Hersoug, B. & Nævdal, G (red.), *Over den leiken ville han rå: Norsk havbruksnærings historie* (s. 13-21). Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.

Hu, H., Kortner, T. M., Gajardo, K., Chikwati, E., Tinsley, J. & Krogdahl, Å. (2016). Intestinal Fluid Permeability in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Affected by Dietary Protein Source. *PloS ONE* 11 (12), 1-18. Doi: 10.1371/journal.pone.0167515

Huntingford, F. A. & Kadri, S. (2009). Taking account of fish welfare: lessons from aquaculture. *Journal of Fish Biology* 75, 2862–2867. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02465.x

Hvas, M., Folkedal, O. & Oppedal, F. (2019). *Havbasert oppdrett – hvor mye vannstrøm tåler laks og rensefisk? Fiskevelferd og grenseverdier* (Rapport nr. 2019-37). Havforskningsinstituttet, (s. 9-14). <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2019-37>

Janphirom, T., Chairasert, P., Thongthieng, T., Suwannathep, S. & Songkasiri, W. (2010). Increasing fish feed stability using guar gum: case study with *Channa striata*. *Asian Journal Food and Agro-Industry* 3(03), 363-370. Hentet fra: <https://www.semanticscholar.org/paper/Increasing-fish-feed-stability-using-guar-gum%3A-case-Janphirom-Chairasert/e62162f2ac0c52abad2fefebc362324234b1eaa8>

Jobling, M. (1995). *Environmental Biology of Fishes* (1. Utgave) (s. 175-210). Chapman & Hall.

- Jobling, M. (2001). Sulting og restriktiv fôring. I R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (red.), *Fiskeernæring* (s. 285-296). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Johansson, G. S. (2014) *Functional feed for Atlantic salmon (Salmo salar L.): Effect on gastrointestinal tract during parr-smolt transformation and susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)*. (Master thesis, UiT-The Arctic University of Norway). Hentet fra <https://munin.uit.no/handle/10037/15517>
- Jutfelt, F. (2011). Barrier Function of the Gut. I A. P. Farrell (red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (s. 1322-1331). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Kittelsen, A., Rosten, T., Ulgenes, Y., Selvik, J. og Alne, H. (2006). *Tilgjengelige ferskvannssressurser til fremtidig produksjon av settefisk av laks og ørret*. (s. 84-90). Hentet fra: <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/523014/>
- Knudsen, D., Urán, P., Arnous, A., Koppe, W., Frøkiær, H. (2007). Saponin-Containing Subfractions of Soybean Molasses Induce Enteritis in the Distal Intestine of Atlantic Salmon. *J. Agric. Food Chem*, 55, 2261–2267. Doi: 10.1021/jf0626967
- Kraugerud, O. F., Penn, M., Storebakken, T., Refstie, S., Krogdahl, Å. & Svihus, B. (2007). Nutrient digestibilities and gut function in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. *Aquaculture* 273, 96–107. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.013.
- Krogdahl, Å. (2001). Fordøyelsessystemet hos kaldtvannsfisk – oppbygging og funksjon. I R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (red.), *Fiskeernæring* (s. 11-35). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A. M. & Bæverfjord, G. (2003). Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 9, 361-371. Doi: 10.1046/j.1365-2095.2003.00264.x

- Krogdahl, Å., Hemre, G.-I. & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11, 103-122. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x
- Krogdahl, Å., Nordrum, S., Sørensen, M., Brudeseth, L. & Røsjø, C. (1999). Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition* 5, 121-133. Doi: 10.1046/j.1365-2095.1999.00095.x
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S. & Bakke, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41, 333-344. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x
- Krogdahl, Å. Sundby, A. & Bakke, A. M. (2011). Gut Secretion and Digestion. I A. P. Farrell (red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (s. 1301-1310). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Kryvi, H. & Totland, G. K. (1997). Fordøyelsessystemet. *Fiskeanatomi* (s. 127-144). Kristiansand: Høyskoleforlaget AS.
- Leenhouwers, J. I., Adjei-Boateng, D., Verreth, J. A. J. & Schrama, J. W. (2006). Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. *Aquaculture Nutrition* 12, 111–116. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2006.00389.x
- Lind, D. A., Marchal, W. G. & Wathen, S. A. (2015). *Statistical Techniques in Business & Economics* (16. Utgave) (s.133-134). New York, USA: McGraw-Hill Educaiton
- Ling, J. & Chen, S. (2005). Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquacultural Engineering* 33, 150–162. Doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.12.002

- Løkka, G., Austbø, L., Falk, K., Bjerkås, I. & Koppang, E. O. (2013). Intestinal morphology of the wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of morphology*, 274(8), 859-876. Doi: 10.1002/jmor.20142
- Løkka, G., Austbø, L., Falk, K., Bromage, E., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Hordvik, I. & Koppang, E. O. (2014). Immune parameters in the intestine of wild and reared unvaccinated and vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 47, 6–16. Doi: 10.1016/j.dci.2014.06.009
- Løkka, G. & Koppang, E. O. (2016). Antigen sampling in the fish intestine. *Developmental and Comparative Immunology* 64, 138–149. Doi: 10.1016/j.dci.2016.02.014
- Michaud, L., Blancheton, J. P., Bruni, V. & Piedrahita, R. (2006). Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering* 34, 224-233. Doi: 10.1016/j.aquaeng.2005.07.005
- Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B. E., Rosenlund, G., Dale, O. B., Kaldhusdal, M., & Koppang, E. O. (2014). Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC veterinary research*, 10(60), 1-13. Doi: 10.1186/1746-6148-10-60.
- Montagne, L., Piel, C. & Lallès, J. P. (2004). Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications. *Nutrition Reviews* 62(3), 105-114. Doi: 10.1301/nr.2004.mar.105–114
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B. S. (2014). Guar gum: processing, properties and food applications – A Review. *J Food Sci Technol* 51(3), 409–418. Doi: 10.1007/s13197-011-0522-x
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B. & Blazer, V. (2007) Fish histology and Histopathology. National Conservation Training Center. Hentet fra: <https://nctc.fws.gov/resources/course-resources/fish-histology/>
- Måge, A. & Damsgård, B. (2001). Miljø og etikk. I R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (red.), *Fiskeernæring* (s. 259-267). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.



- Nash, R. D. M., Valencia, A. H., Geffen, A. J. (2006). The Origin of Fulton's Condition Factor— Setting the Record Straight. *Fisheries*, 31(5), 236-238, Hentet fra: <https://folk.uib.no/nfiag/nfiag/reprints/NashETAL2006Fisheries.pdf>
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburg, R. J., Hua, K. & Nichols P.D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 15103-15110. Doi: 10.1073/pnas.0905235106
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M.H., Kolarevic, J. & Gismervik, K. (2018). *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd* (3.utgave), (s. 9-134). <https://nofima.no/wp-content/uploads/2016/06/Velferdsindikatorer-for-oppdrettslaks-2018.pdf>
- Nortvedt, R. & Krogdahl, Å. (2001). Metoder for ernæringsstudier hos fisk. R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (Eds.), *Fiskeernæring* (s. 187-203). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Olsson, C. (2011). Gut Anatomy. I A. P. Farrell (red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (s. 1268-1275). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Olsson, C. & Holmgren, S. (2011). The Gastrointestinal Tract: An Introduction. I A. P. Farrell (red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (s. 1229-1231). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Patterson, R. N., Watts, K. C. & Timmons, M. B. (1999). The power law in particle size analysis for aquacultural facilities. *Aquacultural Engineering* 19(4), 259–273. Doi: 10.1016/S0144-8609(98)00054-5
- Powell, K. (2003). Eat your veg. *Nature* 426, 378-379. Hentet fra: <https://www.nature.com/articles/426378a>
- Quinn, G. P. & Keough M. J. (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologists* (s. 14-31, 72-110, 173-207, 339-358, 380-400). United States of America: Cambridge University Press.

- Ringø, E., Salinas, I., Olsen, R. E., Nyhaug, A., Myklebust, R. & Mayhew, T. M. (2007). Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell Tissue Res* 328, 109–116. Doi: 10.1007/s00441-006-0323-0
- Røsjø, C., Nordrum, S., Olli, J. J., Krogdahl, Å., Ruyter, B. & Holm, H. (2000). Lipid digestibility and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed medium-chain triglycerides. *Aquaculture* 190, 65–76. Doi: 10.1016/S0044-8486(00)00395-1
- Sethy, K., Mishra, S. K., Mohanty, P. P., Agarawal, J., Meher, P., Satapathy, D., Sahoo, J. K., Panda, S. & Nayak, S. M. (2015). An Overview of Non Starch Polysaccharide. *Journal of Animal Nutrition and Physiology*, 1, 17-22. Hentet fra: [http://jakraya.com/journal/pdf/1-janpArticle\\_3.pdf](http://jakraya.com/journal/pdf/1-janpArticle_3.pdf)
- Sinha, A. K., Kumar, V., Makkar, H. P. S., Boeck, G. D. & Becker, K. (2011). Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. *Food Chemistry* 127, 1409–1426. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.042
- Sommerset, I., Walde, C. S., Jensen, B. B., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. (2020). *Fiskehelsesrapporten 2019* (Veterinærinstituttet Rapport nr. 5a/2020) (s. 12-23). Hentet fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2020/fiskehelsesrapporten-2019>
- Spaho, E., Papa, L., Sallaku, E. & Gjurgji, F. (2013). The assessment of some performance and welfare indicators in rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), reared under two different feeding practices. *Albanian j. agric. sci.* 12(1), 103-109. Hentet fra: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-assessment-of-some-performance-and-welfare-in-.-SPAHO-Papa/24d1ebcd94e2043d4204d67ad77b56cf29b7c2fe>
- Stefansson, S. & Nortvedt, R. (2001). Vekststyring og fôringsstrategi. R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre, & Ø. Lie (Eds.), *Fiskeernæring* (s. 365-382). Dreggen, Bergen: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS.
- Storebakken, T. (1985). Binders in fish feeds: I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture* 47, 11-26. Doi: 10.1016/0044-8486(85)90004-3

- Summerfelt, S. T. 1998. An Integrated Approach to Aquaculture Waste Management in Flowing Water Systems. I G. S. Libey & M. B. Timmons (red.), *Proceedings of the Second International Conference on Recirculating Aquaculture* (s. 87–97). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. Hentet fra:  
[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjg37\\_YrenwAhXPllsKHXXKXDDIQFjAAegQIBBAD&url=https%3A%2F%2Ffreshwater-aquaculture.extension.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F08%2FProceedings\\_2nd\\_International\\_Conference\\_on\\_Recirculating\\_Aq.pdf&usg=AOvVaw1XXNYe205t4AolPtgbUjAG](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjg37_YrenwAhXPllsKHXXKXDDIQFjAAegQIBBAD&url=https%3A%2F%2Ffreshwater-aquaculture.extension.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2019%2F08%2FProceedings_2nd_International_Conference_on_Recirculating_Aq.pdf&usg=AOvVaw1XXNYe205t4AolPtgbUjAG)
- Summerfelt, S. T., Sharrer, M., Gearheart, M., Gillette, K. & Vinci, B. J. (2009). Evaluation of partial water reuse systems used for Atlantic salmon smolt production at the White River National Fish Hatchery. *Aquacultural Engineering* 41, 78–84. Doi: 10.1016/j.aquaeng.2009.06.003
- Sundell, K. S. & Rønnestad, I. (2011). Intestinal Absorption. I A. P. Farrell (red.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (s. 1311-1321). San Diego: Elsevier Science & Technology.
- Sørensen, M., Berge, G. M., Thomassen, M., Ruyter, B., Hatlen, B., Ytrestøyl, T., Aas, T. S. & Åsgård, T. (2011). *Today's and tomorrow's feed ingredients in Norwegian aquaculture* (Nofima Report no. 52). Nofima AS, sider 68. Hentet fra:  
<https://nofima.no/publikasjon/1161977/>
- Tran-Tu, L. C., Hien, T. T. T., Bosma, R. H., Heinsbroek, L. T. N., Varreth, J. A. J. & Schrama, J. W. (2018). Effect of ingredient particle sizes and dietary viscosity on digestion and faecal waste of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture Nutrition* 24, 961–969. Doi: 10.1111/anu.12632
- Tu-Tran, L. C., Nguyen, T.-C., Verreth, J. A. J. & Schrama, J. W. (2019). Doses response of dietary viscosity on digestibility and faecal characteristics of striped catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Aquaculture Research* 51, 595–604. Doi: 10.1111/are.14406
- Van den Ingh, T. S. G. A. M., Krogdahl, Å., Olli, J. J., Hendriks, H. G. C. J. M. & Koninkx, J. G. J. F. (1991). Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine

in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture* 94, 297-305.  
Doi: 10.1016/0044-8486(91)90174-6

Wheaton, F. W. & Singh, S. (1999). 8 Aquacultural Systems. I Bartali, E. H., Jongebreur, A., Moffitt, D. & Wheaton, F. (red.), *CiGR Handbook of Agricultural Engineering: Volume II Animal Production & Aquacultural Engineering* (s. 211-217). The American Society of Agriculture Engineers. Hentet fra: [CIGR Handbook of Agricultural Engineering | CIGR](#)

Ytrestøyl, T., Aas, T. S., Hognes, E. S. & Åsgård, T. (2014). *Ressursregnskap og analyse av fôrråvarer 2012* (Nofima Report no. 51). Nofima AS, sider 13.

Ytrestøyl, T., Aas, T. S. & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* 448, 365–374. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.023.

## Internettkilder

Baklien, A. T. (2020, 29. oktober). *Nok et rekordår i oppdrettsnæringen*. SSB. Hentet 03.01.21 fra: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/nok-et-rekordar-i-oppdrettsnaeringen>

Fishbio. (2010). *PIT-tags: the full story*. Fishbio. Hentet 19.01.2020 fra <https://fishbio.com/field-notes/fish-monitoring/pit-tag-the-full-story>

Fiskeridirektoratet. (2020, 30, 01). *Salg 1994-2019. Akvakulturstatistikk: Matfiskproduksjon av laks, regnbueørret og ørret* [Fiskeridirektoratet]. <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret/Matfiskproduksjon> (hentet: 03.01.21)

Fiskeridirektoratet. (u.å). *Fôrforbruk av fôr fordelt på art 2017-2021 (produksjonsområde) Biomassestatistikk etter produksjonsområde* [Fiskeridirektoratet]. <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Biomassestatistikk/Biomassestatistikk-etter-produksjonsomraade> (hentet: 10.01.21)

Histolab Products AB. (u.å.). *Paraffin Histowax 56-58°C 12 x 1 kg*. HistoLab. Hentet 25.11.20 fra: [http://histolab.e-line.nu/sv/nya\\_e-](http://histolab.e-line.nu/sv/nya_e-)

[%20line/Snittning\\_Fargning/Paraffin/Paraffin\\_Histowax\\_56-58%C2%B0C\\_12\\_x\\_1\\_kg?id=00403](#)

Holck, Per (2020, 26. juni). Histologi. I *Store norske leksikon*. Hentet 03.12.2020 fra <https://sml.snø.no/histologi>

Mattilsynet. (u.å.). *Forsøksdyr: Merking av fisk med Pittag*. Mattilsynet. Hentet 19.01.2020 fra: [https://www.mattilsynet.no/dyr\\_og\\_dyrehold/dyrevelferd/forsoksdyr/forsoksdyrsoknader/merking\\_av\\_fisk\\_med\\_pittag.31362](https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/dyrevelferd/forsoksdyr/forsoksdyrsoknader/merking_av_fisk_med_pittag.31362)

Sterner AS. (u.å.). *Proteinskimmer*. Sterner AS. Hentet 18.01.21 fra: <https://nettbutikk.sterner.no/tmc-proteinskimmer.html>

## **Annet**

### **Kompendium**

Fjellheim, A. J., Hess-Erga, O.-K., Attramadal, K. & Vadstein, O. (2016). *Resirkulering av vann i settefiskproduksjon: Bakgrunnshefte til kurs i resirkuleringsteknologi for settefiskproduksjon*. 2. utgave. [Kompendium, NIVA, SINTEF, Scottish SeaFarms, NTNU, Marine Harvest]. ISBN number: 978-82-577-6862-1. Hentet fra: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUK5enqMnwAhUlXosKHfDhCGAQFjAAegQIBBAD&url=http%3A%2F%2Ffolk.ntnu.no%2Fskoge%2Fdiplom%2Fprosjekt19%2Fmore-info-on-projects%2FRAS%2F7127-2017%2520-%2520RAS%2520guide\\_NO\\_low.pdf&usg=AOvVaw0ML7HTERnX64GRjf1JYzoi](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUK5enqMnwAhUlXosKHfDhCGAQFjAAegQIBBAD&url=http%3A%2F%2Ffolk.ntnu.no%2Fskoge%2Fdiplom%2Fprosjekt19%2Fmore-info-on-projects%2FRAS%2F7127-2017%2520-%2520RAS%2520guide_NO_low.pdf&usg=AOvVaw0ML7HTERnX64GRjf1JYzoi)

### **Upublisert materiale**

Johnsen, H. (2012). Internal report: Histology, Feed`n`Treat (Project leader: Bjørn Steinar Sæther). Upublisert.

Johnsen, H. (u.å.). Protocol for intestinal histology (Feed`n`Treat). Upublisert.

### **Program**

Program brukt til statistiske analyser: SYSTAT 64-bit UNICODE, Version No 13.2 <https://systatsoftware.com/products/systat/>

# Vedlegg 1

Opprinnelsesdokument på forsøksfisken. Tilsendt fra HiT.

## ORIGIN – AND PRODUCTION DATA for fish produced at THE AQUACULTURE RESEARCH STATION IN TROMSØ, land unit.

SPECIES: *Salmo salar L* GENERATION: 2020  
TRIBE: Standard gr. 1 (Aqua Gen Atlantic QTL-innOva PRIME)  
PROVIDER: Aqua Gen Steigen

TANK NO.: C24 og C25  
Receiver: Bjørn Steinar Sæter  
Project no: 20030

### PRODUCTION DATA: 2020

	DATE	TEMPERATURE	Day x temp (celsius)
Admitted	09.01.2020	4-6	397
Eggs	-	8	-
Hatching	23.01.20	8	501
Start of feed	07.03.20	12	850

	2020									20
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	
Light	0:2 4	0:2 4	0:2 4/2 4:0	24: 0	24: 0	24: 0	24: 0	24: 0	24: 0	24:0
TC	8	8	8/1 29	9	9	9/1 2	12	12/ 11	11	
Feed	-	-	S.T	N.S	N.S	N.S	N.S / N.O	N.O	N.O	

Feed: ST=Nutra ST, Skretting. N.S = Nutra Sprint, Skretting. NO = Nutra Olympic, Skretting.

Light: 24:0 = continuous light, 6:18 = 6 h light and 18 hours of darkness, 0:24= continuous darkness

### Status by delivery/notes:

Winter light regime from: None  
Summer light regime from: None  
Date of vaccination: None  
Weight at vaccination: None  
Type of vaccination: None  
Number of fish vaccinated: None  
Total number of fish: 300

Temperature during winter regime: None  
Temperature during summer regime: None  
Disease: None  
Treatment: None  
Pit-tag: 11.09.20

Date of transfer: 18.09.2020  
Weight at transfer: 64,4 g

Fish is received - signature:  
Date:

Provided by:

Enclosure:  
Archived data

Jan Eirik Jensen  
Engineer, Land Unit, section C

## Vedlegg 2

Oksygen- og temperaturmålinger for forsøksperiode per dag (tabell 10) og gjennomsnitt per periode (tabell 11) . Målingene er gjennomført og tilsendt fra HiT, og lagt inn i felles tabell.

Tabell 10. Oksygen (O<sub>2</sub>) og temperatur (°C) målinger per kar per dag. Forsøksdag 0 = forsøksstart.

		Kar1		Kar 2		Kar 3		Kar 4		Kar 5		Kar 6	
Dato:	Forsøksdag	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)
21.09.2020	-14	96	12,4	/	/	/	/	96	12,3	/	/	/	/
22.09.2020	-13	92	12,1	94	12,4	95	12,3	96	12,1	96	12,3	90	12,4
23.09.2020	-12	93	12,1	91	12,1	93	12,1	91	12,1	94	12,1	91	12,1
24.09.2020	-11	91	12,1	91	12,1	93	12,1	93	12,1	94	12,1	93	12,1
25.09.2020	-10	93	12,1	90	12,1	93	12,1	92	12,1	94	12,1	94	12,1
26.09.2020	-9	95	12,1	92	12,1	95	12,1	94	12,1	95	12,2	95	12,1
27.09.2020	-8	94	12,1	92	12,1	95	12,1	92	12,1	93	12,3	94	12,1
28.09.2020	-7	93	12,2	92	12,1	93	12,1	93	12,1	93	12,0	92	12,1
29.09.2020	-6	93	12,3	90	12,2	93	12,1	92	12,2	93	12,1	93	12,2
30.09.2020	-5	93	12,1	91	12,3	93	12,1	92	12,3	93	12,0	92	12,3
01.10.2020	-4	93	12,0	93	12,1	93	12,2	90	12,0	93	12,1	93	12,0
02.10.2020	-3	97	12,1	94	12,0	92	12,3	92	12,0	92	12,0	92	12,1
03.10.2020	-2	97	12,1	94	12,1	94	12,0	93	12,1	94	12,0	94	12,0
04.10.2020	-1	94	12,0	91	12,1	91	12,0	89	12,0	93	12,1	93	12,1
05.10.2020	0	94	12,0	96	12,0	96	12,0	95	12,0	96	12,0	95	12,0
06.10.2020	1	94	12,1	94	12,0	96	12,0	95	12,0	95	12,0	96	12,0
07.10.2020	2	94	12,0	93	12,0	92	12,0	91	12,1	93	12,1	93	12,1
08.10.2020	3	92	12,1	91	12,1	92	12,1	92	12,1	93	12,1	93	12,0
09.10.2020	4	92	12,1	91	12,1	91	12,1	88	12,2	89	12,2	90	12,2
10.10.2020	5	92	12,1	91	12,1	93	12,1	89	12,1	91	12,1	91	12,1

11.10.2020	6	92	12,1	91	12,1	91	12,0	89	12,2	90	12,1	90	12,1
12.10.2020	7	93	12,1	92	12,1	90	12,1	88	12,1	90	12,1	91	12,1
13.10.2020	8	93	12,0	89	12,0	88	12,0	90	12,1	92	12,0	92	12,0
14.10.2020	9	94	12,0	92	12,0	91	12,0	88	12,1	91	12,0	92	12,0
15.10.2020	10	94	12,0	91	12,0	89	12,0	88	12,0	91	12,0	90	12,0
16.10.2020	11	93	12,0	91	12,0	91	12,0	85	12,0	89	12,1	60	12,1
17.10.2020	12	92	12,0	90	12,0	91	11,9	88	12,0	92	12,0	92	12,0
18.10.2020	13	92	12,0	90	12,0	90	11,9	85	12,0	90	12,0	91	12,0
19.10.2020	14	91	12,0	89	12,0	89	12,0	87	12,0	91	12,0	90	12,0
20.10.2020	15	93	12,0	91	12,0	90	12,0	88	12,0	89	12,0	90	12,0
21.10.2020	16	90	12,0	80	12,0	89	12,0	90	12,0	91	12,0	90	12,0
22.10.2020	17	92	11,9	90	11,9	89	11,9	88	12,0	89	11,9	90	12,0
23.10.2020	18	90	12,0	86	12,0	86	12,0	90	12,0	90	12,0	88	12,0
24.10.2020	19	93	12,0	90	12,0	90	12,0	91	12,0	92	12,0	92	11,9
25.10.2020	20	92	12,0	91	12,0	89	12,0	90	12,0	91	12,0	90	12,0
26.10.2020	21	88	12,0	86	12,0	84	12,0	86	12,0	90	12,0	90	12,0
27.10.2020	22	89	12,0	87	12,0	86	12,0	84	12,0	87	12,0	89	12,0
28.10.2020	23	88	12,0	84	12,0	84	12,0	86	12,0	89	12,0	88	12,0
29.10.2020	24	90	12,0	86	12,0	85	12,0	/				88	12,0
30.10.2020	25												

Tabell 11. Gjennomsnittlig oksygen (O<sub>2</sub>) og temperatur (°C) målinger per periode. T0= 21.09.20, T1= 05.10.20, T2= 29-30.10.20.

Periode	Kar 1		Kar 2		Kar 3		Kar 4		Kar 5		Kar 6	
	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)	O <sub>2</sub>	Temp (°C)
T0-T2	92,59	12,06	90,45	12,06	90,92	12,04	90,16	12,07	91,84	12,06	90,71	12,06
T0-T1	93,86	12,13	91,92	12,14	93,31	12,12	92,50	12,11	93,62	12,11	92,77	12,13
T1-T2	91,88	12,02	89,68	12,02	89,68	12,00	88,79	12,04	90,88	12,03	89,64	12,02



# Vedlegg 3

Planlagt daglig utføring etter forsøksplan. Tilsendt fra HiT.

Havbruksstasjonen i Tromsø AS  
Avd. FHL

H 20030

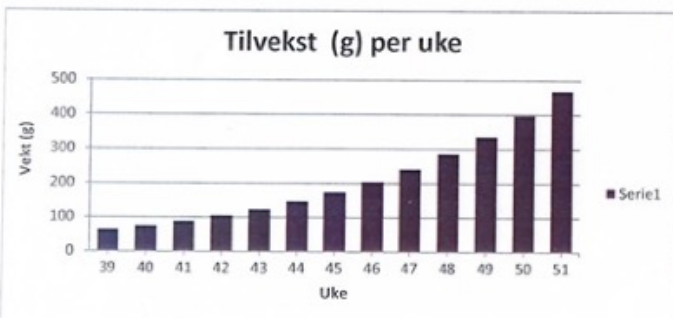
Førtype: Skretting olympic 3mm

Kar nr: F01-F06

Forsøkskaver:

Start uke:	39	Startvekt:	64	Fortfaktor:	1	Kar (m3):	0,4
Vekst(%):	2,4	Antall:	52	Omregn.:	1,4	Temp:	12 gr FV

Prosjekt Uke	Uke	Vekt (US)	For-faktor	Om-regn	Vekt (g)	Antall	Bio-masse (kg/uke)	Tilvekst (kg/uke)	Før (g/f)	Før (ml/2 dg)	Før (ml/uke)	Tetthet (kg/m3)	Kum.far-behov (kg)	Part nr./ prod. dato	Handling	Merknad
0	39	2,4	1,0	1,4	64,0	52	3,3	0,6	86	240	4,6	8,3	0,6			
1	40	2,4	1,0	1,4	75,6	52	3,9	0,7	101	284	5,5	9,8	1,3			
2	41	2,4	1,0	1,4	89,2	52	4,6	0,8	120	335	6,4	11,6	2,1			
3	42	2,4	1,0	1,4	105,3	52	5,5	1,0	141	396	7,6	13,7	3,1			
4	43	2,4	1,0	1,4	124,3	52	6,5	1,2	167	467	9,0	16,2	4,3			
5	44	2,4	1,0	1,4	146,8	52	7,6	1,4	197	551	10,6	19,1	5,7			
6	45	2,4	1,0	1,4	173,3	52	9,0	1,6	232	651	12,5	22,5	7,3			
7	46	2,4	1,0	1,4	204,6	52	10,6	1,9	274	768	14,8	26,6	9,2			
8	47	2,4	1,0	1,4	241,5	52	12,6	2,3	324	907	17,4	31,4	11,5			
9	48	2,4	1,0	1,4	285,2	52	14,8	2,7	383	1071	20,6	37,1	14,2			
10	49	2,4	1,0	1,4	336,6	52	17,5	3,2	452	1265	24,3	43,8	17,4			
11	50	2,4	1,0	1,4	397,4	52	20,7	3,7	533	1493	28,7	51,7	21,1			
12	51	2,4	1,0	1,4	469,2	52	24,4	4,4	629	1763	33,9	61,0	25,6			



C:\Users\mortenn\Havbruksstasjonen i Tromsø\FHL - General\Fish Experiment FHL, LA\Førister FHL\Førister 2020\20030 Førstudie F01- F06

06.10.2020

## Vedlegg 4

Råvareinnholdet og produktdataark for Nutra Olympic. Tilsendt fra Skretting AS.

Godkjent: 28.11.2019



### Nutra Olympic 1,2 - 1,5 - 2 - 3 og 4

Bruksområde: Settefiskfôr til laks og ørret  
Produksjonssted: Averøy  
Produksjonsmetode: Ekstrudert  
Sekkestørrelse: 25 og 500 kg

#### Beskrivelse

Nutra Olympic er et settefiskfôr til laks og ørret i ferskvannsfasen.

#### Produktegenskaper

- Gir rask vekst
- Gir godt karmiljø
- Svevefôr definert med synketid fra 15-20 sek/m og 5-20 % flyt

		Nutra Olympic 1,2	Nutra Olympic 1,5	Nutra Olympic 2	Nutra Olympic 3	Nutra Olympic 4
Fiskestørrelse	g	2 - 7	5 - 20	15 - 60	40 - 200	150 - 350
Protein	%	50 - 53	49 - 52	48 - 51	47 - 50	46 - 49
Fett	%	21	21	22	23	25
NFE*	%	9 - 11	10 - 12	10 - 12	11 - 13	11 - 13
Fiber	%	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5
Aske	%	11 - 12	11 - 12	10 - 11	10 - 11	10 - 11
Brutto energi	MJ/kg	22 - 23	22 - 23	22 - 23	22 - 23	22,5 - 23,5
Pigment**	mg	10	10	10	10, 70	10, 70
Pelletstørrelse	mm	1,2	1,5	2	3	4
Pellet pr.kg		1 mill.	440 000	175 000	70 000	25 000

\*Nitrogenfrie ekstrakter \*\* Pigmentkilde: Astaxanthin. Flere pigmentnivå kan være opprettet.

#### Råvarer

Fiskemel, soyaproteinkonsentrat, hvete, fiskeolje hvetegluten, rapsolje, solsikkemel, fababønner.

Innholdet i dette produktdataarket viser veiledende verdier. Produksjonssertifikatet for det enkelte parti angir nøyaktige verdier.



Skretting AS certifications:  
NS-EN ISO 9001:2015  
NS-EN ISO 14001:2015  
NS-EN ISO 22000:2005  
GlobalGAP CFM



# Vedlegg 5

Råvareinnhold og produktdataark for Nutra RC. Tilsendt fra Skretting AS.

Godkjent: 05.12.2019



## Nutra RC 1,2 - 1,5 - 2 - 3 - 4 - 7

Bruksområde: Settefiskfôr til laks og ørret  
Produksjonssted: Averøy  
Produksjonsmetode: Ekstrudert  
Sekkestørrelse: 25 og 500 kg

### Beskrivelse

Nutra RC er et settefiskfôr til laks og ørret tilpasset resirkuleringsanlegg med både ferskvann og sjøvannsproduksjon. Fôret er også tilpasset bruk i gjennomstrømningsanlegg med utslippsbegrensning for nitrogen og fosfor.

### Produktegenskaper

- Tilpasset resirkulerings- og gjennomstrømningsanlegg
- Rask vekst og godt karmiljø
- Svevefôr definert med synketid fra 15-20 sek/m og 5-20 % flyt.

		Nutra RC 1,2	Nutra RC 1,5	Nutra RC 2	Nutra RC 3	Nutra RC 4	Nutra RC 5	Nutra RC 7
Fiskestørrelse	g	2 - 7	5 - 20	15 - 60	40 - 200	150-300	300- 600	600-1200
Protein	%	50 - 54	49 - 52	49 - 52	47 - 50	46-49	43-46	41 - 44
Fett	%	21	21	22	23	25	28	30
NFE*	%	9 - 11	10 - 12	10- 12	11 - 13	10-12	10-12	14 - 16
Fiber	%	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5	0,6 - 4,5	0,6-4,5	0,6-4,5	0,6 - 4,5
Aske	%	11 - 13	10 - 12	10 - 12	8 - 11	8 - 11	8-11	4 - 6
Brutto energi	MJ/kg	22 - 23	22 - 23	22 - 23	22 - 23	23 - 24	24-25	24 - 25
Pigment**	mg	10	10	10	10, 50, 70	10, 50, 70	10,50, 70	10, 50, 70
Pelletstørrelse	mm	1,2	1,5	2	3	4	5	7
Pellet pr. kg		1 mill.	440 000	175 000	70 000	25 000		

\*Nitrogenfrie ekstrakter \*\* Pigmentkilde: Astaxanthin. Flere pigmentnivå kan være opprettet.

### Råvarer

Fiskemel, soyaprotei konsentrat, hvete, fiskeolje, hvet gluten, rapsolje, solsikkemel, fababønner.

Innholdet i dette produktdataarket viser veiledende verdier. Produksjonssertifikatet for det enkelte parti angir nøyaktige verdier.



Skretting AS certifications:  
NS-EN ISO 9001:2015  
NS-EN ISO 14001:2015  
NS-EN ISO 22000:2005  
GlobalGAP CFM



## Vedlegg 6

Vannstrømhastighet.

Det ble foretatt to til fire målinger per målepunkt. Tabellen viser gjennomsnittlig vannstrømhastighet ved ukentlig måling per målepunkt per kar. Kar 1, 3 og 5 inngår bindergruppen. Kar 2, 4 og 6 inngår kontrollgruppen

Samme dag og dagen etter fordeling av fisk til forsøkskar (21-22.09.20) ble mye tid brukt på å justere innløprørene på en måte som gav samsvarende vannstrømhastighet på samme målepunkt i karene.

Tabell 12. Gjennomsnittlig vannstrømhastighet ved ukentlig måling per MP per kar.

Dato	MP	Kar					
		1	2	3	4	5	6
23.09.2020	MP 1	14,7	12,7	16,5	13	11,7	13,5
30.09.2020	MP 1	16,75	19,75	17,00	18,33	14,33	16,50
07.10.2020	MP 1	15,33	18,00	14,67	13,00	14,67	13,33
14.10.2020	MP 1	16,00	18,00	14,00	11,00	9,00	16,00
21.10.2020	MP 1	17,50	16,00	18,00	16,33	16,67	16,00
28.10.2020	MP 1	16,50	17,00	17,00	15,00	16,00	15,50
<b>Gjennomsnitt MP1</b>		<b>16,13</b>	<b>16,90</b>	<b>16,19</b>	<b>14,44</b>	<b>13,72</b>	<b>15,14</b>
23.09.2020	MP 2	6,3	6	8,5	7,5	8	8
30.09.2020	MP 2	9,00	7,67	8,33	8,33	7,33	8,33
07.10.2020	MP 2	6,50	7,00	9,00	8,33	9,33	7,00
14.10.2020	MP 2	7,67	8,33	8,75	7,67	9,33	8,00
21.10.2020	MP 2	10,50	9,00	10,00	10,00	9,33	10,00
28.10.2020	MP 2	10,00	12,50	13,50	10,00	11,00	11,50
<b>Gjennomsnitt MP2</b>		<b>8,33</b>	<b>8,42</b>	<b>9,68</b>	<b>8,64</b>	<b>9,06</b>	<b>8,81</b>
23.09.2020	MP 3	7	6,5	6,5	7,5	9,5	6,5
30.09.2020	MP 3	7	6,67	6,67	7,33	8,33	8,67
07.10.2020	MP 3	7,00	6,33	8,33	8,75	8,33	8,67
14.10.2020	MP 3	8,67	7,00	9,00	7,00	9,33	8,00
21.10.2020	MP 3	9,50	9,00	10,00	9,50	10,00	7,50
28.10.2020	MP 3	9,50	10,00	10,00	8,00	9,50	10,00
<b>Gjennomsnitt MP3</b>		<b>8,11</b>	<b>7,58</b>	<b>8,42</b>	<b>8,01</b>	<b>9,17</b>	<b>8,22</b>
23.09.2020	MP 4	6	6	7,5	7	8	7
30.09.2020	MP 4	8	6,67	10,33	9,67	9,00	8,25
07.10.2020	MP 4	7,50	7,00	9,00	8,00	7,33	7,67
14.10.2020	MP 4	8,33	7,00	9,00	8,00	9,00	9,67
21.10.2020	MP 4	10,00	9,50	10,00	9,00	9,00	10,00
28.10.2020	MP4	9,50	8,50	10,00	8,00	8,50	10,50
<b>Gjennomsnitt MP4</b>		<b>8,22</b>	<b>7,44</b>	<b>9,31</b>	<b>8,28</b>	<b>8,47</b>	<b>8,85</b>

## Vedlegg 7

Skrettings tilvekstmodell-tabell for laks i ferskvann. Tilsendt fra Skretting AS.

### Vekstmodell landbasert Skretting Norge

	Fiskevekt																		
Temp °C	0,12	1	5	10	20	30	50	60	70	80	90	100	120	140	160	180	200	250	300
2	2,33	1,36	0,90	0,75	0,63	0,57	0,50	0,48	0,46	0,44	0,43	0,42	0,40	0,38	0,37	0,36	0,35	0,33	0,32
3	2,71	1,55	1,01	0,84	0,70	0,63	0,55	0,53	0,51	0,49	0,47	0,46	0,44	0,42	0,41	0,39	0,38	0,36	0,34
4	3,07	1,82	1,22	1,03	0,87	0,79	0,69	0,66	0,64	0,62	0,60	0,58	0,56	0,54	0,52	0,50	0,49	0,47	0,44
5	3,58	2,15	1,46	1,23	1,04	0,95	0,84	0,80	0,77	0,75	0,73	0,71	0,68	0,65	0,63	0,61	0,60	0,57	0,54
6	4,30	2,47	1,62	1,35	1,13	1,01	0,89	0,84	0,81	0,78	0,76	0,74	0,70	0,68	0,65	0,63	0,62	0,58	0,55
7	4,69	2,89	2,00	1,71	1,46	1,33	1,18	1,14	1,10	1,06	1,04	1,01	0,97	0,94	0,91	0,88	0,86	0,82	0,79
8	5,29	3,24	2,23	1,90	1,62	1,47	1,31	1,25	1,21	1,17	1,14	1,11	1,07	1,03	1,00	0,97	0,95	0,90	0,86
9	6,05	3,69	2,54	2,16	1,84	1,67	1,48	1,42	1,37	1,33	1,29	1,26	1,21	1,17	1,13	1,10	1,07	1,02	0,98
10	6,32	3,95	2,77	2,38	2,04	1,86	1,67	1,60	1,55	1,50	1,46	1,43	1,37	1,33	1,29	1,26	1,23	1,17	1,12
11	6,76	4,28	3,03	2,61	2,25	2,06	1,85	1,78	1,72	1,67	1,63	1,59	1,53	1,48	1,44	1,40	1,37	1,31	1,26
12	7,46	4,77	3,40	2,93	2,54	2,33	2,09	2,01	1,95	1,89	1,85	1,81	1,74	1,68	1,63	1,59	1,56	1,49	1,43
13	8,07	5,13	3,64	3,14	2,71	2,49	2,23	2,15	2,08	2,02	1,97	1,93	1,85	1,79	1,74	1,70	1,66	1,58	1,52
14	8,54	5,44	3,86	3,33	2,87	2,64	2,36	2,27	2,20	2,14	2,09	2,04	1,96	1,90	1,85	1,80	1,76	1,68	1,61
15	9,24	5,81	4,08	3,51	3,01	2,76	2,47	2,37	2,29	2,23	2,17	2,12	2,04	1,97	1,91	1,86	1,82	1,73	1,67
16	8,99	5,76	4,11	3,55	3,07	2,82	2,53	2,44	2,36	2,29	2,24	2,19	2,11	2,04	1,98	1,94	1,89	1,81	1,74
17	8,24	5,32	3,82	3,31	2,87	2,64	2,38	2,29	2,22	2,16	2,11	2,06	1,99	1,92	1,87	1,83	1,79	1,71	1,64
18	7,59	4,99	3,63	3,16	2,76	2,54	2,30	2,22	2,15	2,09	2,05	2,00	1,93	1,87	1,83	1,78	1,75	1,67	1,61

## Vedlegg 8

Tabellene viser vektdata per kar per måletidspunkt (T).

<b>All fisk (m+um)</b>	<b>T0</b>						<b>T1</b>						<b>T2</b>						
<b>Kar</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	
Antall individer (n)	58	56	55	56	54	54	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
Minimum vekt (g)	36,7	41,2	42,1	38	38,7	38,2	52	50,5	53,5	50,5	49	53	74,5	73	82,6	79,8	66,2	74	
Maksimum vekt (g)	61,7	62,5	66,9	64	62,5	65,4	79	87	92,5	77,5	77,5	81,5	119,4	129,7	139	124,2	120,7	121,3	
Aritmetisk gjennomsnitt (g)	49,26	49,44	50,26	48,92	49,58	50,23	62,88	64,43	66,56	64,45	63,43	64,62	95,52	96,80	105,79	98,29	94,79	96,94	
Standardavvik (STD)	5,044	4,664	4,866	5,428	4,799	5,607	6,539	7,691	6,771	6,477	6,426	6,129	11,094	13,941	11,161	11,579	11,881	10,827	
Variasjonskoeffisient (CV)	0,102	0,094	0,097	0,111	0,097	0,112	0,104	0,119	0,102	0,1	0,101	0,095	0,116	0,144	0,105	0,118	0,125	0,112	

<b>Merket fisk (m)</b>	<b>T0</b>						<b>T1</b>						<b>T2</b>					
<b>Kar</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Antall individer (n)	27	27	26	26	26	26	27	27	26	25	26	26	25	26	24	24	25	26
Minimum vekt (g)	40,9	41,2	44	39,2	38,7	43,1	53,5	51,5	58,5	54,5	49	55	74,5	78,5	89,1	84	66,2	81
Maksimum vekt (g)	61,7	55,3	66,9	62,4	56,6	62,4	79	75,5	92,5	76,5	77,5	81,5	119,4	122,2	139	118,3	117,2	120,8
Aritmetisk gjennomsnitt (g)	48,96	49,52	50,45	49,01	48,54	49,66	63,20	65,57	67,12	65,84	63,40	65,46	96,50	98,34	106,65	100,25	94,99	99,17
Standardavvik (STD)	4,647	3,54	5,183	4,639	4,423	4,716	6,477	6,043	7,594	5,619	6,536	6,068	10,818	13,436	12,71	9,664	12,856	10,275
Variasjonskoeffisient (CV)	0,095	0,071	0,103	0,095	0,091	0,095	0,102	0,092	0,113	0,085	0,103	0,093	0,112	0,137	0,119	0,096	0,135	0,104

<b>Umerket fisk (um)</b>	<b>T0</b>						<b>T1</b>						<b>T2</b>					
<b>Kar</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Antall individer (n)	31	29	29	30	28	28	25	25	26	27	26	26	27	26	28	28	27	26
Minimum vekt (g)	36,7	41,6	42,1	38	43,1	38,2	52	50,5	53,5	50,5	54	53	76,5	73	82,6	79,8	75,2	74
Maksimum vekt (g)	61,3	62,5	59	64	62,5	65,4	76,5	87	77,5	77,5	76	78	116,5	129,7	124,1	124,2	120,7	121,3
Aritmetisk gjennomsnitt (g)	49,52	49,36	50,09	48,84	50,56	50,75	62,52	63,20	66,00	63,17	63,46	63,77	94,61	95,26	105,05	96,61	94,60	94,72
Standardavvik (STD)	5,429	5,575	4,649	6,108	5,006	6,366	6,721	9,116	5,933	7,041	6,443	6,191	11,473	14,526	9,82	12,936	11,146	11,104
Variasjonskoeffisient (CV)	0,11	0,113	0,093	0,125	0,099	0,125	0,108	0,144	0,09	0,111	0,102	0,097	0,121	0,152	0,093	0,134	0,118	0,117

## Vedlegg 9

Gjennomsnittlig SGR1 og SGR2 per kar, samt tilhørende standardavvik.

Tabell 13. Gjennomsnittlig SGR for vekstperiode 1 (T0-T1, SGR 1) og vekstperiode 2 (T1-T2, SGR2), med tilhørende S.A. (merket fisk). Kar 1, 3, 5 er bindergruppen. Kar 2, 4, 6 er kontrollgruppen.

Kar	Gjennomsnitt av SGR1	Gjennomsnitt av SGR2	Standardavvik av SGR1	Standardavvik av SGR2
1	1,803864043	1,723693995	0,371813315	0,200198223
2	1,972888205	1,667115869	0,328906452	0,236854811
3	1,999579072	1,913921311	0,321924389	0,248395994
4	2,102144871	1,688655357	0,342034911	0,223890991
5	1,907604362	1,615192308	0,22506441	0,257330972
6	1,975192775	1,656584594	0,244392489	0,218349295

## Vedlegg 10

Vekstdata per gruppe per måletidspunkt (T) for all fisk, merket og umerket.

<b>All fisk per gruppe</b>	<b>T0</b>		<b>T1</b>		<b>T2</b>	
<b>Gruppe</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>
Antall (n)	167	166	156	156	156	156
Minimum	36,700	38,000	49,000	50,500	66,200	73,000
Maksimum	66,900	65,400	92,500	87,000	139,000	129,700
Aritmetisk gjennomsnitt	49,693	49,519	64,288	64,500	98,699	97,344
Standardavvik	4,896	5,240	6,737	6,755	12,382	12,128
Variasjonskoeffisient	0,099	0,106	0,105	0,105	0,125	0,125
Shapiro-Wilk Statistic	0,989	0,982	0,976	0,985	0,994	0,977

<b>Merket fisk per gruppe</b>	<b>T0</b>		<b>T1</b>		<b>T2</b>	
<b>Gruppe</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>
Antall (n)	79	79	79	78	74	76
Minimum	38,700	39,200	49,000	51,500	66,200	78,500
Maksimum	66,900	62,400	92,500	81,500	139,000	122,200
Aritmetisk gjennomsnitt	49,310	49,397	64,557	65,622	99,282	99,224
Standardavvik	4,770	4,276	7,030	5,844	13,059	11,163
Variasjonskoeffisient	0,097	0,087	0,109	0,089	0,132	0,113
Shapiro-Wilk Statistic	0,963	0,975	0,944	0,988	0,991	0,973

<b>Umerket fisk per gruppe</b>	<b>T0</b>		<b>T1</b>		<b>T2</b>	
<b>Gruppe</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>	<b>binder</b>	<b>kontroll</b>
Antall (n)	88	87	77	78	82	80
Minimum	36,700	38,000	52,000	50,500	75,200	73,000
Maksimum	62,500	65,400	77,500	87,000	124,100	129,700
Aritmetisk gjennomsnitt	50,037	49,629	64,013	63,378	98,172	95,557
Standardavvik	5,008	6,007	6,457	7,427	11,794	12,792
Variasjonskoeffisient	0,100	0,121	0,101	0,117	0,120	0,134
Shapiro-Wilk Statistic	0,992	0,983	0,976	0,966	0,980	0,962



## Vedlegg 11

Biomasse (tabell 14) og tetthet (tabell 15) per kar per måletidspunkt (T).

Tabell 14. Biomasse per kar per måletidspunkt (T).

Kar	Biomasse (g)		
	T0	T1	T2
1	2857,10	3269,50	4966,80
2	2768,40	3350,50	5033,60
3	2764,20	3461,00	5501,10
4	2739,50	3351,50	5110,90
5	2677,50	3298,50	4929,10
6	2712,20	3360,00	5041,10
Snitt alle replikat:	2753,15	3348,50	5097,10
Snitt Binderreplikat:	2766,27	3343,00	5132,33
Snitt Kontrollreplikat:	2740,03	3354,00	5061,87

Tabell 15. Tetthet (kg/m<sup>3</sup>) beregnet ut fra vannvolum på 405L (0,405 m<sup>3</sup>) per kar per måletidspunkt (T).

Kar	Tetthet (kg biomasse/m <sup>3</sup> vannvolum) Vannvolum = 405L (0,405 m <sup>3</sup> )		
	T0	T1	T2
1	7,05	8,07	12,26
2	6,84	8,27	12,43
3	6,83	8,55	13,58
4	6,76	8,28	12,62
5	6,61	8,14	12,17
6	6,70	8,30	12,45
Snitt alle replikat:	6,80	8,27	12,59
Snitt Binderreplikat:	6,83	8,25	12,67
Snitt Kontrollreplikat:	6,77	8,28	12,50

## Vedlegg 12

Utgåtte merkede individer.

Merkede individer som ble tatt ut eller ikke gjenidentifisert fra T0 til T2.

Ved forsøksstart ble et merket individ fra kar 4 (kontrollgruppe), tatt ut på grunn av skadet øye. Det var følgende individ: 3D6.00185681B6, med en vekt på 47,9 gram og lengde 15,6 cm ved T0 (fordeling av fisk til forsøkskar).

Ved forsøksslutt ble fiskene i tabell 16 ikke gjenfunnet på grunn av trøbbel med scanneren. Dermed kunne det ikke registreres sluttmålinger tilknyttet disse merkede individene, og dermed utgikk disse individene ved beregninger med merket fisk.

*Tabell 16. Merkede individer som ikke ble gjenfunnet ved forsøksslutt (T2). Målingene Vekt 0 og Lengde 0 er foretatt ved T0, og målingene Vekt 1 og Lengde 1 er foretatt ved T1. Gruppe B = binder. Gruppe K= kontroll*

Gruppe:	Kar:	Tag ID	Vekt 0	Lengde 0	Vekt 1	Lengde 1
K	2	3D6.001856816B	45,2	15,7	64,5	17,0
B	3	3D6.001856816F	44,4	15,1	63,0	17,0
B	1	3D6.0018568178	42	15	56,0	16,5
B	1	3D6.001856817F	43,7	14,6	57,5	16,0
K	4	3D6.00185681BE	51,1	15,6	70,0	17,5
B	3	3D6.00185681C4	47,3	15,3	66,0	17,0
B	5	3D6.00185681E1	54,2	16	69,0	17,0

## Vedlegg 13

Liste over kjemikalier brukt i metoden.

Tabell 17. oversikt over kjemikalier/reagenser og dets produsent, brukt i metodene.

<b>Kjemikalie:</b>	<b>Produsent:</b>
Benzoak Vet 20% / 200mg/ml (Virkestoff: Bezokain)	ACD Pharmaceuticals AS, Leknes, Norway.
Formaldehydløsning omtrent 37% (stabilisert med omtrent 10% metanol)	Merck, KGaA, EMD Millipore Corporation Darmstadt, Germany.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Magnesium, w/o Calcium Sterile Filtered (10% Fosfatbufret saltvannsløsning uten Mg og Ca)	Biowest, The Serum Specialist, Nuaille, France
Ethanol 96% (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals, France
Ethanol absolute	AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals, France
Histo-Clear (Histological Clearing Agent)	National diagnostics, Atlanta, USA
HISTOWAX	Histolab Products AB, Södra Långebergsgatan, Gothenburg, Sweden
Hematoxylin del A	Thermo Shandon Limited, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, USA
Hematoxylin del B	Thermo Shandon Limited, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, USA
Instant Eosin-Y	Thermo Shandon Limited, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, USA
Eukitt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MilliQ vann	Milli-Q, Merck Millipore, Darmstadt, Germany





