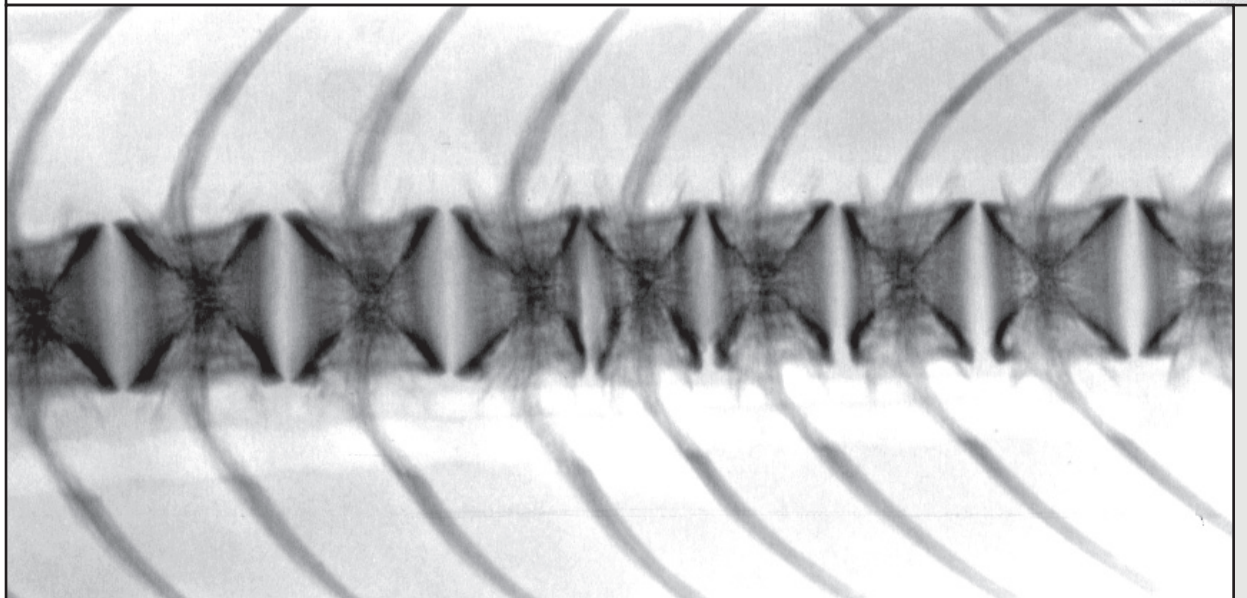
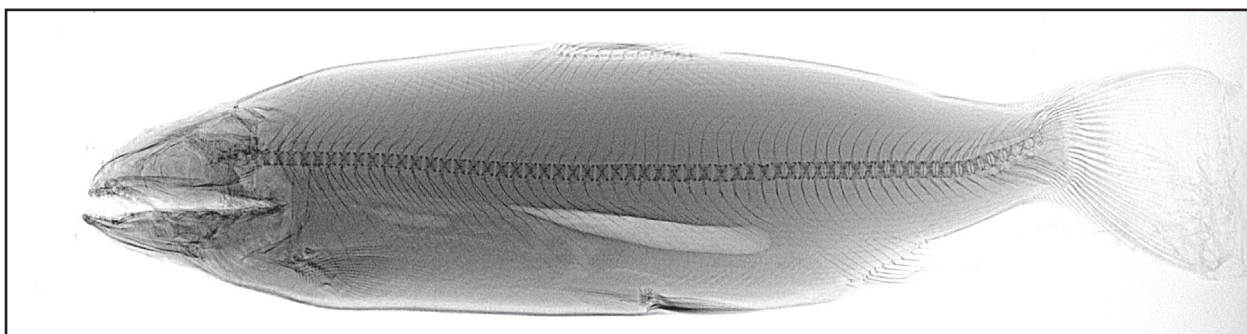


Beinhelse og fosforbehov i laks: Sluttrapport

Per Gunnar Fjelldal¹, Sissel Albrektsen², Eckhard Witten³, Ramon Fontanillas⁴,
Leo Nankervis⁴, Tårn Helgøy Thomsen⁴ og Olav Breck⁵
¹Havforskningsinstituttet; ²NOFIMA; ³Universitetet i Ghent; ⁴Skretting AS;
⁵Marine Harvest



HAVFORSKNINGSINSTITUTTET
INSTITUTE OF MARINE RESEARCH

FHF prosjektnummer 900798

Rapporten er utarbeidet november 2014

1. Sammendrag

Dette prosjektet hadde som hovedmål å undersøke hvordan diettnivå av fosfor (P) i ferskvann og sjøvann påvirket beinohelse hos oppdrettslaks, med hovedfokus på kombinasjonseffekter mellom nivå i fersk- og sjøvann samt effekt av temperatur i sjøvann. For å studere dette ble 3 grams laks gitt lav (LP), medium (MP) og høy (HP) diett ved 13 °C frem til sjøvannsoverføring (100 g), og deretter gitt samme nivåer i sjøvann med full "crossover" (ni grupper: LP-LP, LP-MP, LP-HP, MP-LP, MP-MP, MP-HP, HP-LP, HP-MP, HP-HP, representert som "ferskvannsdiett" – "sjøvannsdiett") i sjøvann ved 16 °C. I tillegg ble det holdt fisk ved 10 °C sjøvann som gikk fra LP til LP (LP-LP) og HP til HP (HP-HP).

Fôringsperioden gikk fram til 500 gram. Deretter ble fisken holdt ved 8 °C frem til 4 kg. Ved avslutning av fôringsperioden (500 g) var fisken som var holdt i sjøvann ved 16 °C, større enn fisken som ble holdt ved 10 °C. Da forsøket ble avsluttet (4 kg), var imidlertid fisken holdt ved 10 °C frem til 500 g størst. Dette kan settes i sammenheng med at fisk holdt ved 16 °C utviklet mer katarakt enn fisk holdt ved 10 °C. Det var sammenheng mellom økende diett P-nivå i ferskvann og mineralinnhold i bein ved avslutning av fôringsperioden, mens diettnivå i sjøvann og temperatur hadde liten effekt. Forsøket viser at P-behovet for normal mineralisering av laks i ferskvann er dekket ved 0,75 % løselig P, mens diettnivå på 0,45 % løselig P er utilstrekkelig.

Diutforskjellene var mindre tydelig etter overføring til sjø, men resultatene indikerer at fôr til laksesmolt bør inneholde mer enn 0,5 % løselig P for å sikre normal vekst og mineralisering under varierende miljø og oppdrettsbetingelser. Når det gjaldt innslaget av fisk med radiologiske virveldeformasjoner, var det diett P-nivå i ferskvann som hadde størst effekt; økt P gav lavere innslag av deformert fisk. Dette kan skyldes at LP-dietten brukt i sjøvann hadde mer løselig P enn LP-dietten som ble brukt i ferskvann (5,0 vs. 4,5 g kg⁻¹).

Angående temperatur så var det liten effekt på innslaget av fisk med radiologiske virveldeformasjoner. Men temperatur viste en langtidseffekt på hvor alvorlige deformasjonene ble; ved avslutning av forsøket (4 kg) var det betydelig mer fisk med alvorlige deformasjoner blant fisk holdt ved 16 °C enn 10 °C. Dette var også gjenspeilt i innslaget av fisk med ytre synlige ryggradsdeformasjoner ved 4 kg (LP-LP 10 °C: 20 % vs. LP-LP 16 °C: 59 %, HP-HP 10 °C: 13 % vs. HP-HP 16 °C: 24 %). Det var generelt mye fisk med bindevevsvekst rundt ryggraden som gav problemer med bindevev i filet ved filetering. Det var en klar positiv sammenheng mellom andel fisk med filetskade og alvorlige radiologiske virveldeformasjoner, unntatt for LP-LP 16 °C-gruppen, som hadde relativt mindre filetskader i forhold til alvorlige deformasjoner sammenlignet med de andre gruppene. Histopatologiske analyser viste at det ble dannet ektopisk brusk ved vekstsonene i virvler med lavt mineralinnhold. Med tiden kunne dette føre til at alt vevet mellom virvelen (normalt notochord vev) ble erstattet med brusk, og en påfølgende påvekst av bindevev som trengte inn i muskulaturen rundt virvelsøylen og skadet denne.

Ved 16 °C gav HP i sjøvann redusert innslag av modne hanner ved avslutning av forsøket (4 kg), dersom fisken var gitt LP (LP-LP 26,4 % vs. LP-HP 7,6 %) eller MP (MP-LP 23,2 % vs. MP-HP 3,5 %) i ferskvann. HP i sjøvann viste ikke denne effekten dersom fisken var gitt HP i ferskvann. Det var ingen modne fisk ved slutt blant fisk holdt ved 10 °C.

Som et tillegg i prosjektet undersøkte vi innslaget av radiologiske virveldeformasjoner hos villaks fanget i Figgjoelva, en elv som renner ut i samme region som fosforforsøket ble gjennomført. Undersøkelsen viste at innslaget av fisk med én eller flere deformerte ryggvirvler var omtrent likt hos villaksen som hos gruppen med minst deformasjoner i P-forsøket (HP-HP 10 °C), men at deformasjonene var mye mer alvorlige hos forsøksfisken sammenlignet med villfiskene. Blant fisk med radiologiske deformasjoner var gjennomsnittlig antall deformerte virvler 1,7 hos villaksen, mens det var 9,0 hos gruppen med minste deformasjoner (HP-HP 10 °C) og 18,9 hos gruppen med mest deformasjoner (LP-LP 16 °C) i forsøket.

Resultatene fra prosjektet viser tydelig at diett P-nivå påvirker viktige velferds-, nedklassings- og reklamasjonsrelaterte faktorer som virvelsøyledeformasjoner, bindevevsvekst i muskulatur og kjønnsmodning hos oppdrettslaks. Dette betyr at fokus på optimal fosforernæring vil være formålstjenlig for en positiv utvikling i norsk lakseoppdrett. Forsøket viser at det er særlig viktig å sikre god P-forsyning til laks i ferskvann. Det bør nevnes at nivået av deformasjoner var relativt høyt i alle gruppene, og at økt temperatur i sjøvann gav mer alvorlige deformasjoner og mer kjønnsmodning.

Dette prosjektet var et samarbeid mellom Havforskningsinstituttet, Nofima, Universitetet i Ghent, Skretting og Marine Harvest, og fôringsforsøket ble utført ved Lerang Forskningsstasjon i Skretting ARC. Prosjektet ble finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF).

2. Innledning

Ryggradsdeformasjoner er et betydelig problem i norsk lakseoppdrett (Fjelldal mfl. 2012a). Disse deformasjonene gir i alvorlige tilfeller nedsatt vekst og velferd (Hansen mfl. 2010), nedklassing ved slakt (Mitchie 2001) og problemer ved filetering (Sullivan mfl. 2007a). I tillegg har en del av laksen som når høyeste kvalitetsgrad under slakting, så alvorlige ryggradsdeformasjoner at det gir nedklassing av filet eller problemer med reklamasjon fra kunden. Dette skyldes bindevev rundt den deformerte ryggraden som infiltrerer muskulaturen (Haugarvoll mfl. 2010) og følger med fileten ved filetering (Sullivan mfl. 2007a). Til tross for at forekomsten av alvorlige tilfeller med ytre synlige ryggradsforandringer opptrer mer sjeldent de senere år, opplever en tilfeller med kundeklager relatert til bruskpåleiringer på fileten, mest sannsynlig pga. forandringer i ryggspylen.

Ved røntgenologiske undersøkelser av slik fisk, der ytre synlige forandringer kan ligge på rundt 10 %, finner en at > 95 % av populasjonen kan ha forandringer, hvorav > 65 % av alvorlig karakter. I andre tilfeller, der tilfeldige fiskegrupper med lav forekomst av ytre forandringer (1-3 %) undersøkes vha. røntgen, har en observert forandringer i 10-80 % av fisken. Dette indikerer en labil situasjon. Beinhelse hos oppdrettslaks kan ikke karakteriseres som god eller tilstrekkelig under kontroll, og næringen er nødt til å sette inn ressurser for å avklare årsaksforhold og treffe forebyggende tiltak (pers. komm., Olav Breck).

Tidligere forsøk har vist at diettnivå av fosfor (Bæverfjord mfl. 1998; Fjelldal mfl. 2009), temperatur (Ytteborg mfl. 2010; Grini mfl. 2011), vaksinasjon (Berg mfl. 2006; Aunsmo mfl. 2008), veksthastighet (Fjelldal mfl. 2006) og fotoperiode (Fjelldal mfl. 2005; 2012b; Wargelius mfl. 2009) er viktige elementer i forståelsen av hvorfor og når deformasjoner oppstår hos oppdrettslaks. Det er mye som tyder på at bildet kan være sammensatt, og at flere risikofaktorer må være til stede for at deformasjoner skal oppstå (Fjelldal mfl. 2012a; 2012b). Fosforernæring ser ut til å være en svært viktig faktor (Bæverfjord mfl. 2012). Fosforbehovet hos atlantehavslaks er rapportert til å ligge mellom 0,6 % og 0,9 % biotilgjengelig fosfor (Ketola 1975; Åsgård and Shearer 1997; NRC 1993). Fôrprodusenter beregner biotilgjengelig fosfor (P) ut fra egenproduserte tabellverk.

Utvikling av egnet metodikk som kan gi et bedre mål på biotilgjengelig fosfor i fôret er etterspurt basert på at P i beinfraksjon av marine råvarer (fiskemel, biprodukter) og phytat i planteprotein (60–80 %) i liten grad er biotilgjengelig for laks. Fordøyelighet av P viser stor variasjon mellom ulike ingredienser, og interaksjoner mellom ulike komponenter i fôringredienser kan også hemme opptaket av både P og andre mineraler. Det er derfor et stort behov for å utvikle en standardisert metode for måling av biotilgjengelig P. NOFIMA har i flere år jobbet med å utvikle en metodikk for kjemisk måling av løselig (ikke beinbundet) P som i større grad enn total P kan reflektere biotilgjengelig P. I forsøk med laks er det vist at vekst er godt korrelert til løselig P, men ikke til total P (Albrektsen et al. 2012).

Hovedmålet med dette prosjektet er å sette de kunnskapshullene som eksisterer angående utvikling av ryggradsdeformasjoner hos oppdrettslaks på en vitenskapelig måte, og å videreutvikle NOFIMAs metode for måling av løselig P. De planlagte forsøkene er utformet for å undersøke P-behovet hos hurtigvoksende oppdrettslaks i fersk- og sjøvann, mulige kombinasjonseffekter av P-ernæring i fersk- og sjøvann, og hvordan temperatur og veksthastighet påvirker P-behovet i sjøvann.

Partnerne i dette prosjektet var Havforskningsinstituttet, NOFIMA, Universitetet i Ghent, Skretting og Marine Harvest.

Prosjektgruppen:

Per Gunnar Fjelldal, pergf@imr.no
Olav Breck, Breck, Olav.Breck@marineharvest.com
Sissel Albrektsen, sissel.albrektsen@nofima.no
Eckhard Witten, PEckhardWitten@aol.com
Ramon Fontanillas, Ramon.Fontanillas@skretting.com

Styringsgruppen:

Olav Breck, Olav.Breck@marineharvest.com
Wolfgang Koppe, Wolfgang.Koppe@skretting.com
Eldar Åsgård Bendiksen, eldar.asgard.bendiksen@salmar.no
Merete Bjørgan Schrøder, merete.schroder@fhf.no (observatør)

3. Problemstilling og formål

Realisering av innovasjonen i dette prosjektet vil bidra til at fôrprodusenter som Skretting kan utvikle diettrecepter med livsstadie- og sesongspesifikke biotilgjengelige P-nivåer, samt høyfosfordietter som er spesifikt tilpasset fiskegrupper som har høy risiko for å utvikle deformasjoner. Hovedmålet med sistnevnte vil være å hindre eller stoppe videre utvikling av ryggradsdeformasjoner. Dette vil sikre en god beinhold og velferd hos oppdrettslaks. Disse diettene vil kunne føre til at oppdrettselskaper som Marine Harvest får ned innslaget av deformasjoner og redusert problemet knyttet til bindevev i filet, samtidig som selskapets totale P-utslepp til miljøet ikke overstiger dagens nivå. Dersom innovasjonsprosjektet ikke gjennomføres vil oppdrettslaks med skjelettlidelser også i fremtiden selges i et marked med stadig økende fokus på en velferdsmessig akseptabel produksjon. Det er ikke uvanlig at oppdrettslaks med skjelettskader havner i markedet. Dette prosjektet vil forhindre slike scenarier, og vil på den måten kunne bidra til å styrke omdømmet til den norske laksenæringen.

4. Prosjektgjennomføring

Å definere diettnivåene av P som sikrer en sunn skjelettutvikling for oppdrettslaks er fremdeles en utfordring for industrien. Nyere forskning har vist at kombinasjon av kontinuerlig lys, lavt P og økt temperatur gir virvelkompresjoner hos laks (Fjelldal mfl. 2012b), og at lavt P-nivå i diett på yngelstadiet kan predisponere laks for å utvikle virvelkompresjoner seinere i livssyklusen (Fjelldal mfl. 2012c). Hos triploid laks som vokser raskt i ferskvann (Fjelldal og Hansen 2010) kan økt P-nivå i diett forhindre utvikling av skjelettdeformasjoner i denne fasen (Fjelldal mfl. 2011). Diettnivået av P påvirker beinets mineralinnhold hos laks (Ketola 1975; Helland mfl. 2005).

Dårlig beinmineralisering er assosiert med utvikling av virvelkompresjoner hos oppdrettslaks (Fjellidal mfl. 2007; Fjellidal mfl. 2009), og mange former for virvelkompresjoner og fusjoner karakteriseres ved at det dannes bruskvev mellom ryggvirvlene (Kvellestad mfl. 2000; Witten mfl. 2005; 2006). De potensielle fordelene høyfosfordietter har på skjelettutvikling motvirkes av at disse diettene vil øke P-utslippene fra oppdrettsvirksomhet (Phillips mfl. 1993; Sugiura mfl. 2000; Coloso mfl. 2003). Derfor må P-behovet hos laks ved ulike vekstforhold undersøkes for å holde P-utslippene på et minimum samtidig som utvikling av skjelettdeformasjoner hindres eller holdes i sjakk.

I dette prosjektet undersøkte vi P-behovet hos hurtigvoksende oppdrettslaks i fersk- og sjøvann, og kombinasjonseffekten mellom P-ernæring i fersk- og sjøvann og om P-behovet i sjøvann var påvirket av temperatur.

Seks replikate kar med laks ble føret dietter med lavt (LP), medium (MP) eller høyt (HP) P-nivå ved 12-14 °C fra 3 gram (april 2012) til sjøvannsoverføring (september 2012, ~100 g); totalt 18 kar. Ved sjøvannsoverføring ble all fisken innad i hver diettgruppe blandet, og LP- og HP-gruppene refordelt på 12 kar per gruppe, mens MP-gruppen ble refordelt på ni kar; totalt 33 kar. I sjøvann ble hver av diettgruppene fra ferskvann føret LP-, MP- eller HP-dietter (full "crossover") frem til 500 g (desember 2012) ved 16 °C i triplikate kar (totalt 27 kar). I tillegg ble triplikate grupper med fisk gitt LP og HP i ferskvann, føret videre på disse diettene ved 10 °C frem til fisken ved 16 °C nådde 500 g (totalt 6 kar). Det var 11 eksperimentelle grupper i denne perioden (9 ved 16 °C og 2 ved 10 °C). Ved 500 g (16 °C) ble all fisk pittingmerket, blandet og overført til 12 stk 3 meter kar med likt antall fisk fra de 11 ulike forsøksgruppene representert i hvert kar. Fra 500 g til slaktestørrelse (4 kg) ble alle gruppene føret en felles standard kommersiell diett fra Skretting med normalt P-nivå ved 8 °C.

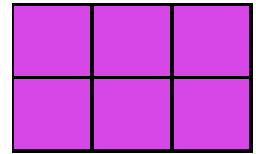
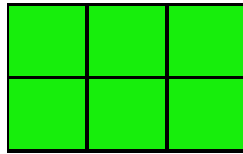
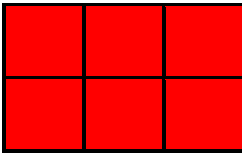
Skjematisk skisse av forsøksdesign:

LP

MP

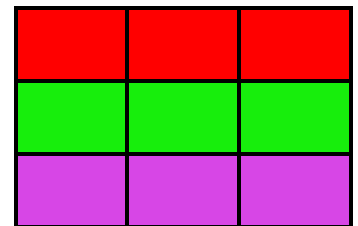
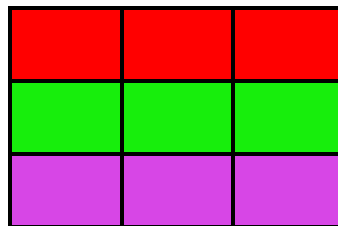
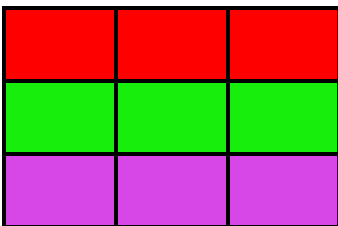
HP

Ferskvann 3-100 g (18 kar)



Sjøvann 100-500 g (33 kar)

16 °C (27kar): _____



10 °C (6 kar): _____



Ved 500 g; pittingmerking og overføring 3 m kar for påvekst til 4 kg

5. Oppnådde resultater, konklusjon

Dietter

Skretting laget forsøksdietter. Total og løselig P er presentert i tabellen under.

Fiskestørrelse	P-nivå	Diett (g kg ⁻¹)		
		LP	MP	HP
3 til 20 g	Total	8,5	11,4	13,9
	Løselig	4,5	7,2	9,9
20 til 100 g	Total	8,6	11,3	13,7
	Løselig	4,4	7,5	9,8
100 til 500 g	Total	9,8	11,7	13,1
	Løselig	5,0	7,1	9,0

Total og løselig P er analysert av NOFIMA. Metoden for analyse av løselig P er kvalitetssikret og noe modifisert (Hovde 2013). Den har høy presisjon og nøyaktighet på linje med analyse av total P. Metoden er godt egnet til å skille beinbundet P fra ikke-beinbundet P og fungerer svært godt for ulike typer fiskemel. Metoden fungerer også godt for kommersielle P-salter med ulik løselighet, som vist i dette forsøket. Metoden skiller ikke mellom fytat-P og ikke fytat-P i planteprotein og analyserer alt P i planteprotein som løselig P. P-bidraget fra planteprotein utgjør normalt 20–25 % av P i fiskefôr, hvorav 60–80 % phytat-P. Noe phytat P er sannsynligvis tilgjengelig i fisk, og dette betyr at nivå av løselig P i fôret overestimerer tilgjengelig P med ca. 10–15 %. Basert på kjent innhold av phytat-P i planteprotein er det fullt mulig å korrigere for dette. Forskningsfaglig er det behov for å verifisere analysemetoden for løselig P opp mot kommersielle fôr med høyt innhold av planteprotein.

Etter at perioden med ulike fôr ble avsluttet ved 500 g, ble alle fiskene fôret med Skretting Spirit Pluss 7 mm med total P 9,1 og løselig P 7,3 g kg⁻¹.

Statistikk

For statistisk analyse av data presentert under, ble følgende statistikk brukt:

Signifikante forskjeller i mineralinnhold i ryggvirvler ved overføring til sjøvann ble testet vha. enveis ANOVA. Signifikante forskjeller for samme parameter ved avslutning av fôringsperioden ble testet vha. toveis ANOVA.

Signifikante forskjeller i vekt, kondisjonsfaktor og katarakt-score ble testet vha. toveis ANOVA. Beregningene er basert på umoden fisk. For å teste effekt av diett i fersk- og sjøvann og interaksjonseffekter mellom disse, ble fisk holdt ved 16 °C testet separat med diett i fersk- og sjøvann som kategoriske faktorer. For å teste effekt av temperatur og diett og interaksjonseffekter mellom disse, ble fisk gitt LP og HP både i fersk- og sjøvann (LP-LP, HP-HP) og holdt ved 10 og 16 °C, testet separat.

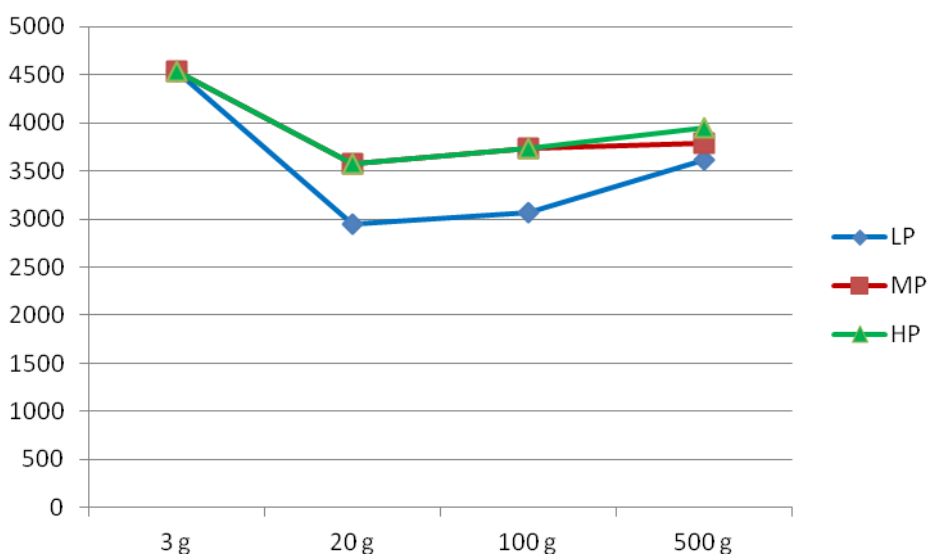
Signifikante ANOVA-er ble etterfulgt av post hoc-tester for å avdekke mulige forskjeller mellom enkeltgrupper.

Resultater

Mineralstatus helfisk

Ferskvann

Mineralstatus i hel fisk ved 20 og 100 g viste at LP diett (0,45 % løselig P) var utilstrekkelig til å gi god mineralisering i laks i ferskvann, mens MP- og HP-diettene (0,75 og 0,98 % løselig P) ga høyere og like god mineralisering (Figur 1). Analyse av både aske, Ca, P og Ca:P ratio i hel fisk viste signifikant lavere status i fisk fôret med LP relativt til MP- og HP-dietter. Tilsvarende ble det funnet signifikant lavere P-retensjon (mg/kg tilvekst) i LP-fisk beregnet for perioden mellom 20 og 100 g. Resultatene viser at P-behovet for normal mineralisering av laks i ferskvann er dekket ved 0,75 % løselig P, mens diettnivå på 0,45 % løselig P er utilstrekkelig.



Figur 1. P status (mg/kg) i hel fisk fôret med henholdsvis lav P (LP), middel P (MP) og høy P (HP) fôr i ferskvann (20 og 70 g) og med samme dietter i sjøvann (500 g).

Sjøvann

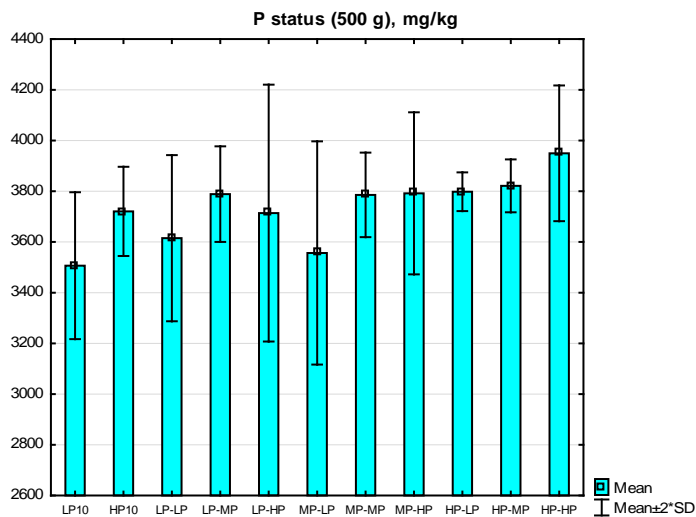
I perioden fra 100 til 500 g ble fisk fôret med de tre basisdiettene (LP, MP, HP) fordelt i et fullt cross-over-design til henholdsvis nye LP, MP og HP ved 16 °C (9 dietter), samtidig som to av de opprinnelige basisdiettene (LP og HP) ble videreført på 10 °C. Etter overføring til sjøvann økte mineralstatus i fisk fôret med LP (Figur 1), mest sannsynlig forklart ved at P-innholdet i LP-fôret økte fra 0,45 til 0,5 % løselig P, noe som medførte mindre tydelige diettforskjeller i sjø. P-status i fisk var best for fisk som tidligere var fôret med HP (0,98 % løselig P) i ferskvann, noe som indikerer at fisken har hatt tilstrekkelig P-forsyning til å bygge opp minerallager utover vanlig P-behov (Figur 2). Det ble ikke påvist signifikante diettforskjeller i P-status ved 500 g på 16 °C selv om LP- og MP-diettene tenderte til å gi litt lavere P-status enn HP. Aske, Ca og Ca:P ratio i hel fisk viste mer sensitive diettresponser, og var signifikant forskjellig for LP-LP relativt til LP-HP, MP-HP og HP-HP, uavhengig av tidligere fôrregimer ($p < 0,05$), som vist for Ca i Figur 3. P-retensjon i hel fisk i perioden fra 100 til 500 g varierte fra 3,5 til 3,9 mg/kg tilvekst og reflekterte P-status i hel fisk ($p > 0,05$). Som ventet var P-utnyttelsen fra fôret mest effektiv hos fisk fôret med lav P-diett (45–50 %) relativt til høy P-diett (35–38 %).

Resultatene er i overensstemmelse med andre smoltforsøk og viser at 0,5 % løselig P kan gi lavere mineralisering, men at forskjellene ikke trenger å være signifikante relativt til fisk som får høyere P-nivå (0,7 % løselig P) i fôret etter overføring til sjøvann (Albrektsen et al. 2014). I andre forsøk med smolt der det er oppnådd bedre vekstbetingelser, er det påvist større forskjeller i P-status og redusert vekst i laks fôret med 0,5 % løselig P (Albrektsen et al. 2013). Det er kjent at P-behovet kan variere med ulike miljø- og vekstbetingelser.

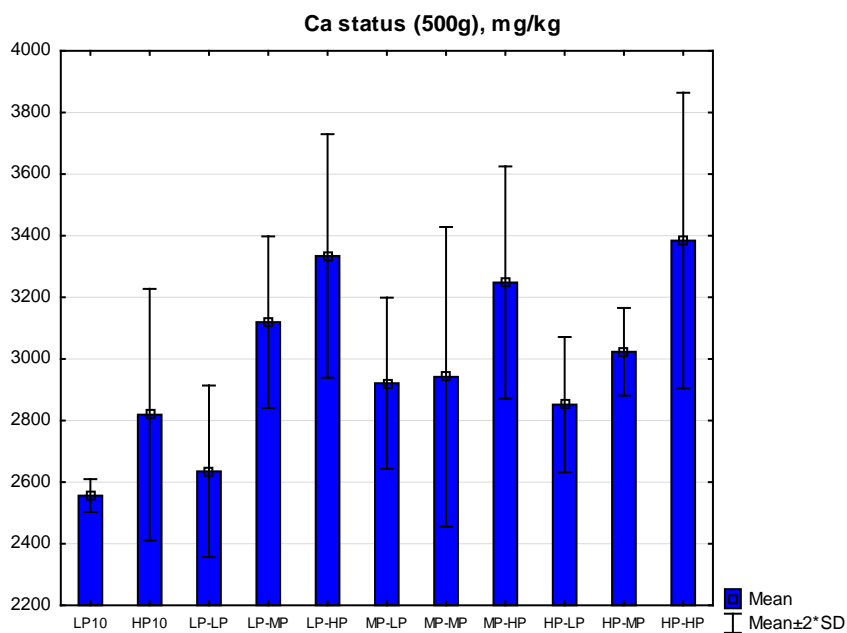
Resultatene totalt sett indikerer at smoltfôr bør inneholde mer enn 0,5 % løselig P for å sikre normal vekst og mineralisering under varierende miljø og oppdrettsbetingelser. Basert på et tilfeldig utvalg av 46 kommersielle smoltfôr analysert i 2012, ble det funnet at omtrent 40 % inneholdt mindre enn 0,5 % løselig P.

Temperatur

Både vekst og mineralstatus i fisk fôret ved 10 °C (HP10) var lavere enn tilsvarende fôrgruppe ved 16 °C (HP-HP). P-status i laks var signifikant forskjellig kun mellom LP10 og HP-HP i dette forsøket (Figur 2).



Figur 2. P-status i hel fisk (mg/kg) fôret ved 10 °C (LP10, HP10), og ved 16 °C med lav P (LP, MP, HP), middel P (LP, MP, HP) og høy P (LP, MP, HP) fôr i et fullt «cross-over» design.

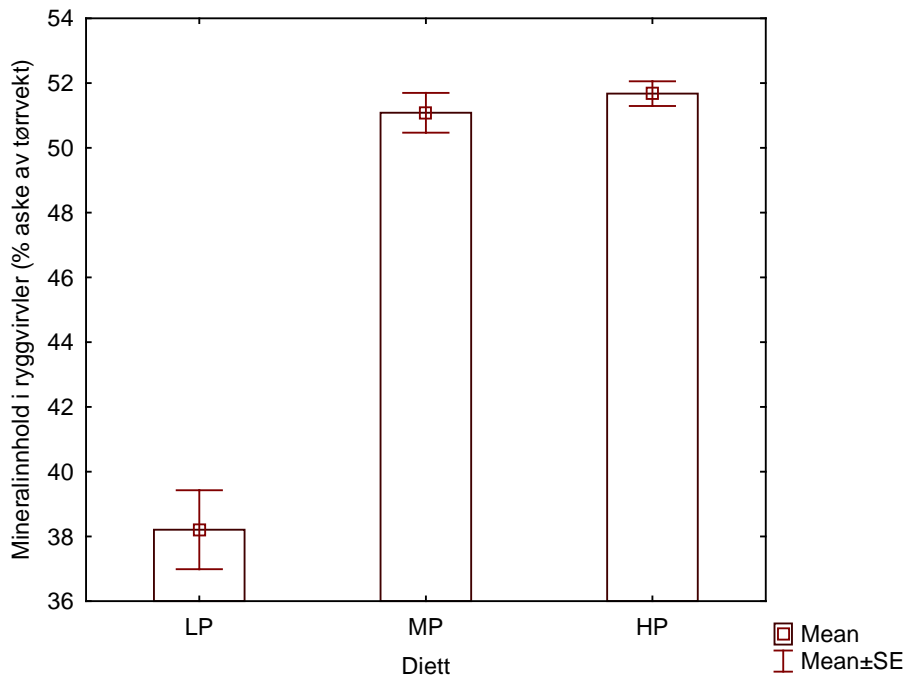


Figur 3. Ca-status i hel fisk (mg/kg) fôret ved 10 °C (LP10, HP10), og ved 16 °C med lav P (LP, MP, HP), middel P (LP, MP, HP) og høy P (LP, MP, HP) fôr i et fullt «cross-over» design.

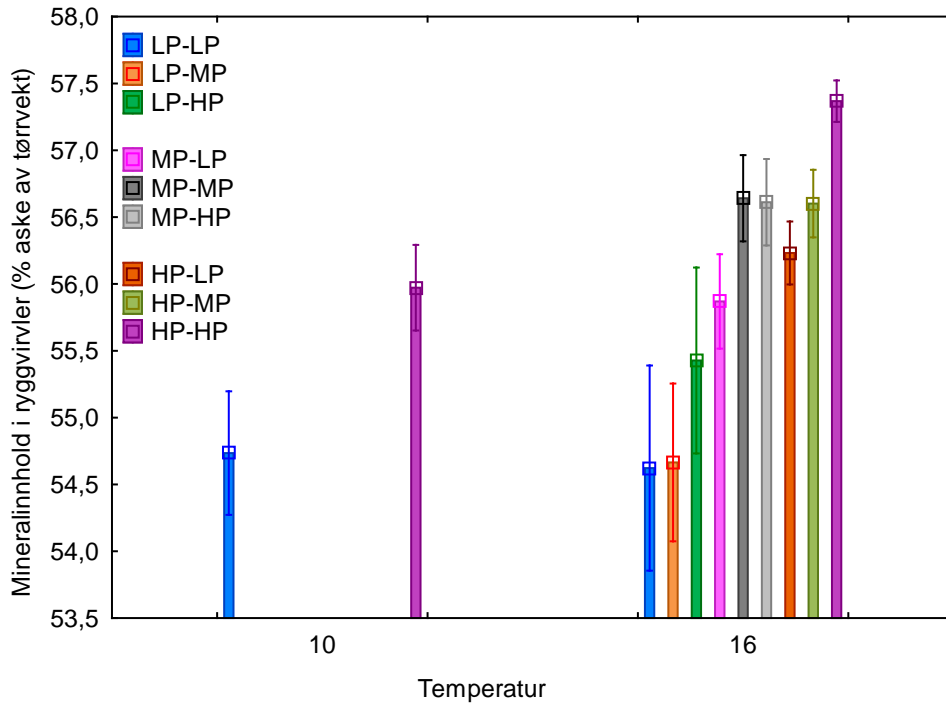
Mineralstatus ryggvirvler

Ved overføring til sjøvann var det en signifikant effekt av diett P-nivå i ferskvann på mineralinnhold i ryggvirvler, og LP-gruppen hadde signifikant lavere verdi enn MP- og HP-gruppene (Figur 4).

Ved avslutning av fôringsperioden var det for fisk holdt ved 16 °C en signifikant effekt av diett P-nivå i ferskvann på mineralinnhold i ryggvirvler, og LP-LP- og LP-MP-gruppene hadde signifikant lavere nivå enn HP-MP- og HP-HP-gruppene (Figur 5). For fisk gitt LP og HP i både fersk- og sjøvann (LP-LP og HP-HP) var det en signifikant effekt av diett på mineralinnhold i ryggvirvler, og HP-HP 16 °C-gruppen hadde signifikant høyere verdi enn LP-LP 10 °C og LP-LP 16 °C-gruppene (Figur 5). Ved avslutning av forsøket var det ikke signifikante forskjeller mellom gruppene. Alle gruppene hadde god mineralstatus i ryggvirvelen, og nivået varierte mellom 54 og 56 % askeinnhold.



Figur 4. Mineralinnhold i ryggvirvler (virvel 40-43) ved overføring til sjøvann.



Figur 5. Mineralinnhold i ryggvirvler (virvel 40-43) ved avslutning av fôringsperioden desember 2012.

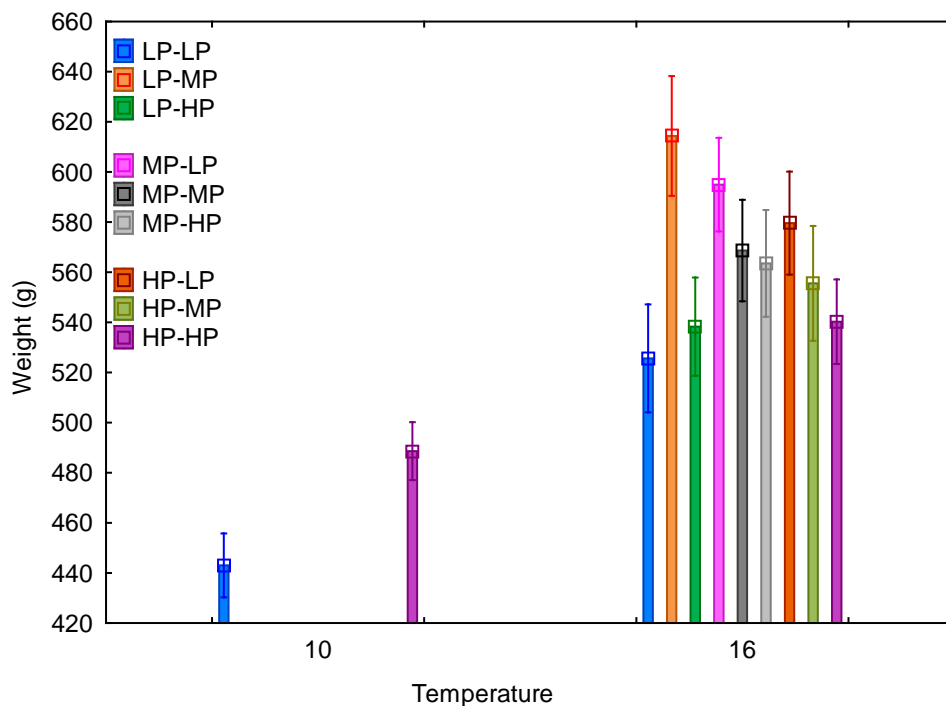
Vekst

Avslutning av fôringsperioden (~500 g)

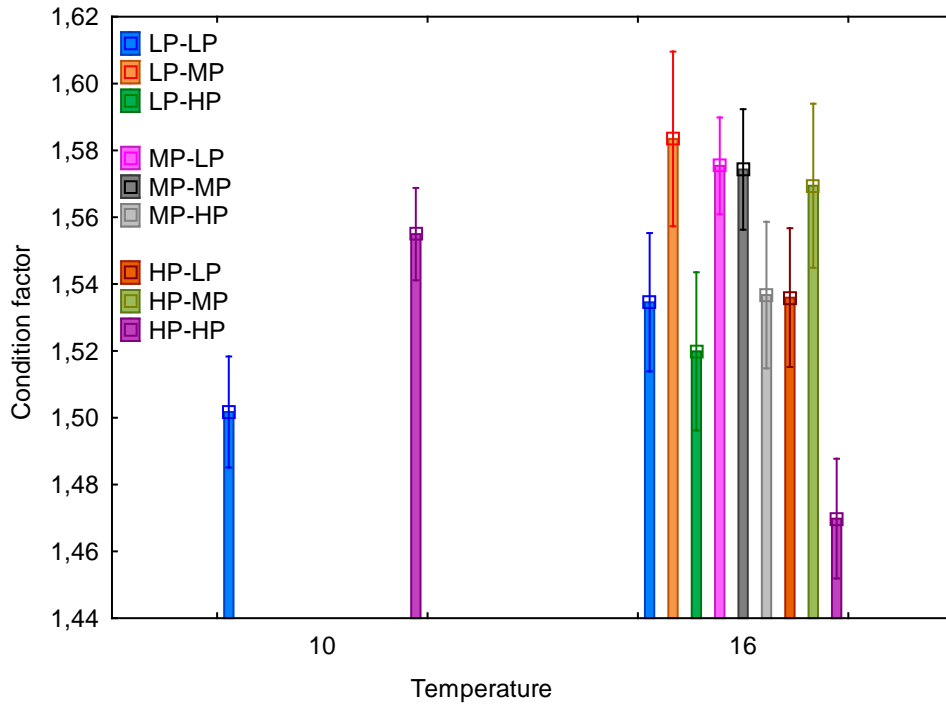
Ved avslutning av fôringsperioden var det for fisk holdt ved 16 °C ingen signifikant effekt av diett P-nivå i fersk- eller sjøvann, men en signifikant interaksjonseffekt mellom P diettnivå i fersk- og sjøvann. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom noen av enkeltgruppene (Figur 6). Det var en signifikant effekt av diett P i sjøvann for kondisjonsfaktor for fisk holdt ved 16 °C, og HP-HP-gruppen hadde signifikant lavere k-faktor enn LP-MP, MP-LP, MP-MP og HP-MP-gruppene (Figur 7).

For fisk gitt LP og HP i både fersk- og sjøvann (LP-LP og HP-HP) var det en signifikant effekt av temperatur på vekt, og LP-LP-gruppen holdt ved 10 °C var signifikant mindre enn de tre andre gruppene (Figur 6). Det var en signifikant interaksjonseffekt for kondisjonsfaktor mellom diett P og temperatur for disse gruppene, og HP-HP 16 °C-gruppen hadde signifikant lavere kondisjonsfaktor enn HP-HP 10 °C og LP-LP 16 °C-gruppene (Figur 7).

Gruppevis SGR fra 3 til 20 g varierte mellom 3,7 og 3,9; 20 til 40 g mellom 1,9 og 2,2; 40 til 100 g mellom 1,7 og 2,1; 100 til 500 g mellom 1,3 og 1,6 (10C snitt 1,37; 16C snitt 1,52); 500 til 4000 g mellom 0,45 og 0,54 (10C snitt 0,54; 16C snitt 0,47).



Figur 6. Vekt ved avslutning av fôringsperioden (500 g) januar 2012.

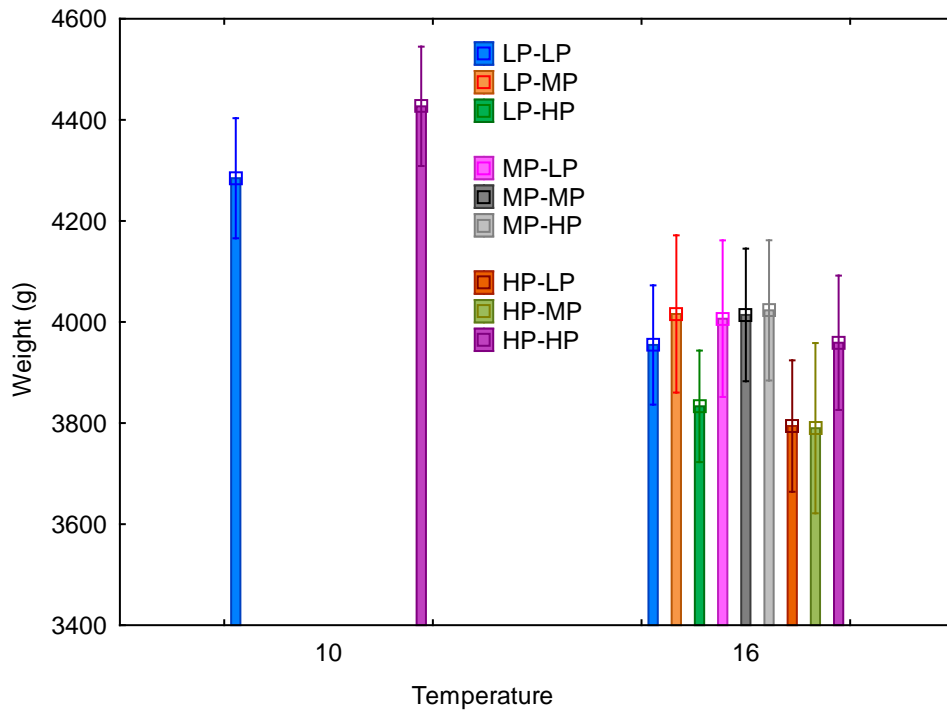


Figur 7. Kondisjonsfaktor ved avslutning av fôringsperioden (500 g) januar 2012.

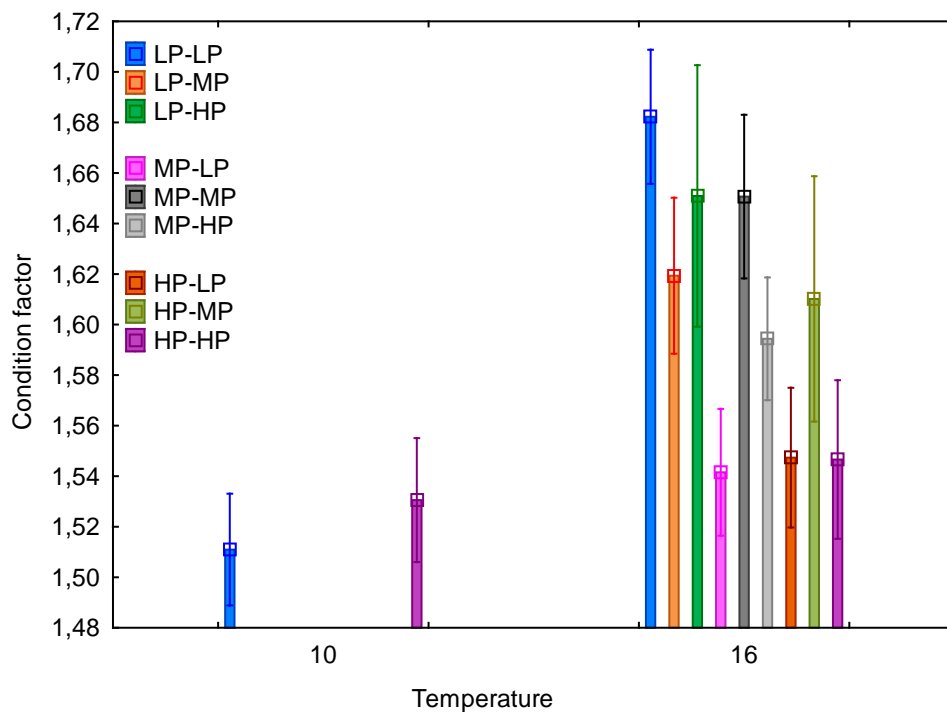
Avslutning av forsøket (~4 kg)

Ved avslutning av forsøket var det for fisk holdt ved 16 °C ingen signifikant effekt av diett P i fersk- eller sjøvann på vekt, og heller ingen signifikant interaksjonseffekt mellom P diettnivå i fersk- og sjøvann (Figur 8). Det var en signifikant effekt av diett P i ferskvann for kondisjonsfaktor for fisk holdt ved 16 °C, men det var ingen signifikant forskjell mellom enkeltgrupper (Figur 9).

For fisk gitt LP og HP i både fersk- og sjøvann (LP-LP og HP-HP) var det en signifikant effekt av temperatur på vekt, og HP-HP 10 °C-gruppen var signifikant tyngre enn LP-LP 16 °C og HP-HP 16 °C-gruppene (Figur 8). Det var en signifikant effekt av både temperatur og diett P, samt interaksjons effekt mellom disse på kondisjonsfaktor for disse gruppene, og LP-LP 16 °C-gruppen hadde signifikant høyere kondisjonsfaktor enn LP-LP 10 °C, HP-HP 10 °C og HP-HP 16°C-gruppene (Figur 9).



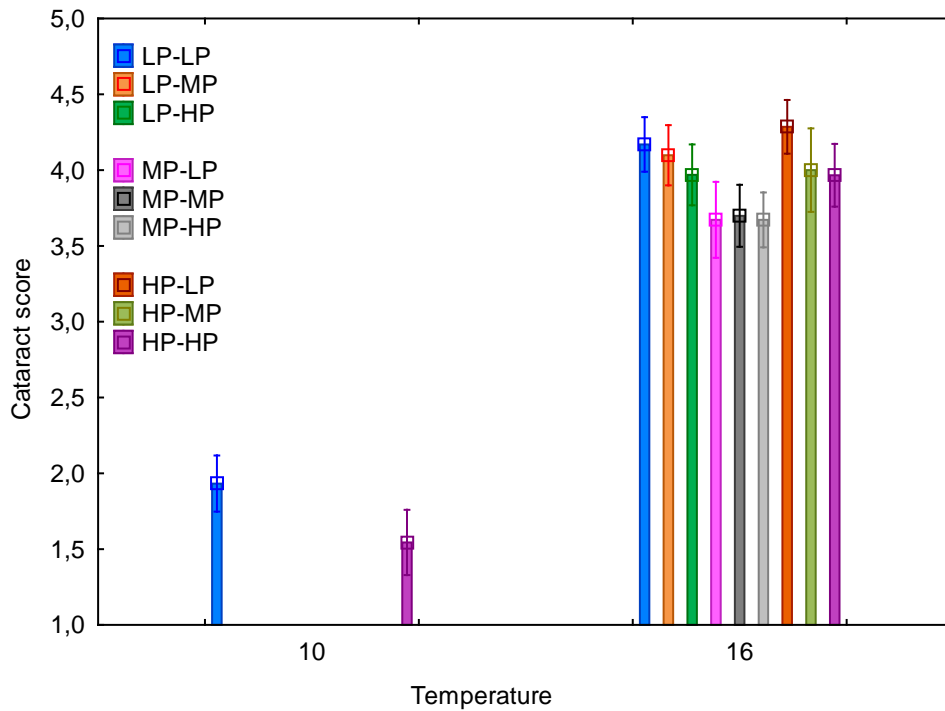
Figur 8. Vekt ved avslutning av forsøket januar 2014.



Figur 9. Kondisjonsfaktor ved avslutning av forsøket januar 2014.

Katarakt ved avslutning av forsøket (~4 kg)

Ved avslutning av forsøket var det for fisk holdt ved 16 °C en signifikant effekt av diett P i ferskvann på katarakt-score, men ingen signifikant forskjell mellom enkeltgrupper (Figur 10). For fisk gitt LP og HP i både fersk- og sjøvann (LP-LP og HP-HP) var det en signifikant effekt av temperatur på katarakt-score, og LP-LP 10C og HP-HP 10C gruppene hadde signifikant lavere score enn LP-LP 16C og HP-HP 16C-gruppene (Figur 10).

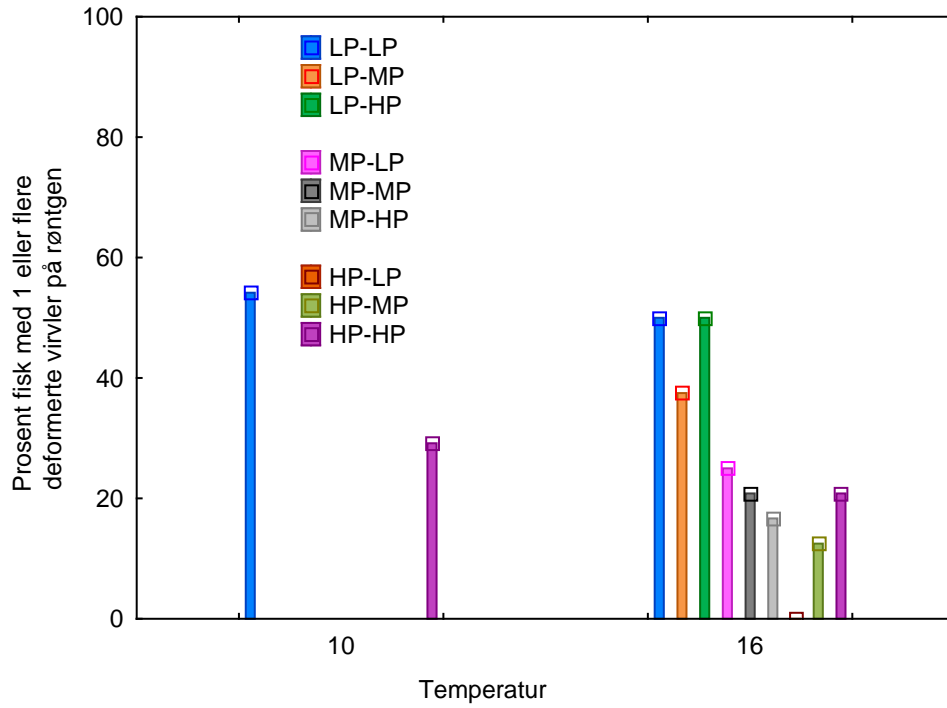


Figur 10. Katarakt-score ved avslutning av forsøket januar 2014.

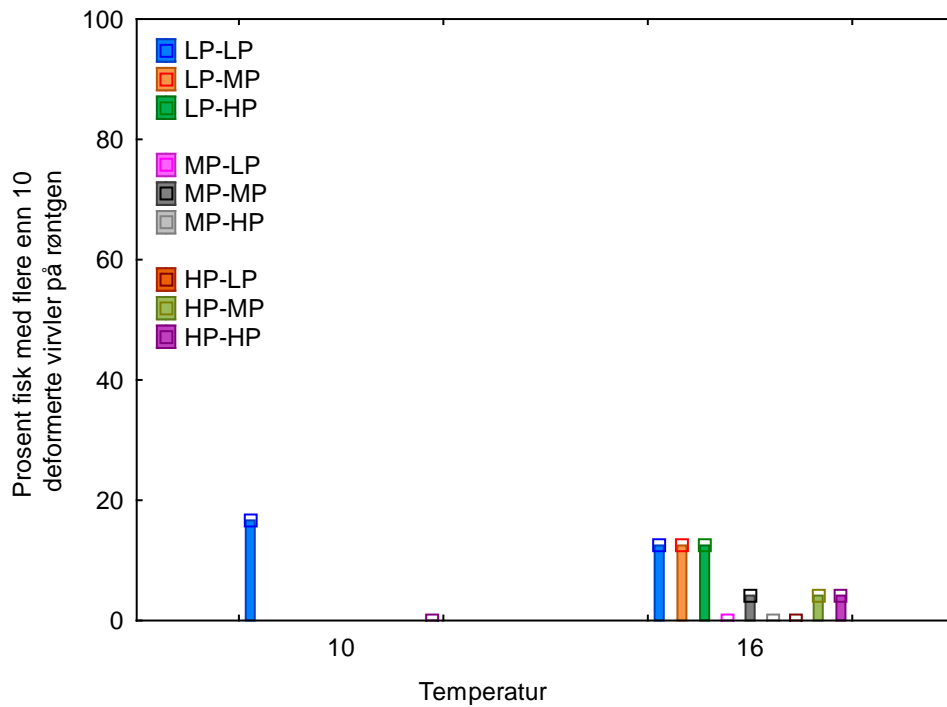
Ryggradsdeformasjoner

Palpering og røntgen

Ved avslutning av fôringsperioden (500 g) var det mest fisk med radiologiske virveldeformasjoner blant gruppene som var gitt LP i ferskvann (Figur 11 og 12), mens temperatur ikke viste effekt.

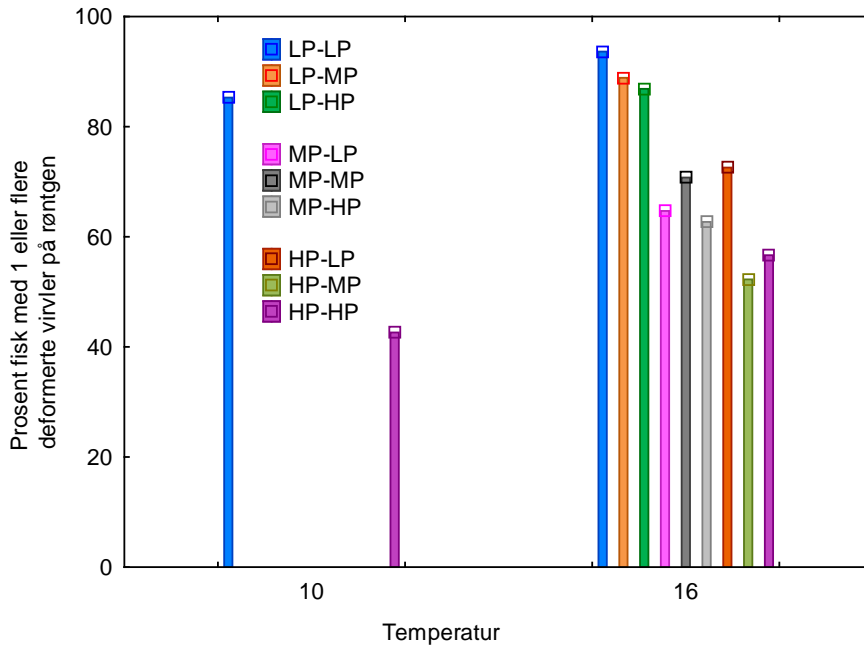


Figur 11. Prosent fisk med én eller flere deformerte ryggvirvler på røntgen ved avslutning av fôringsperioden (500 g) desember 2012.

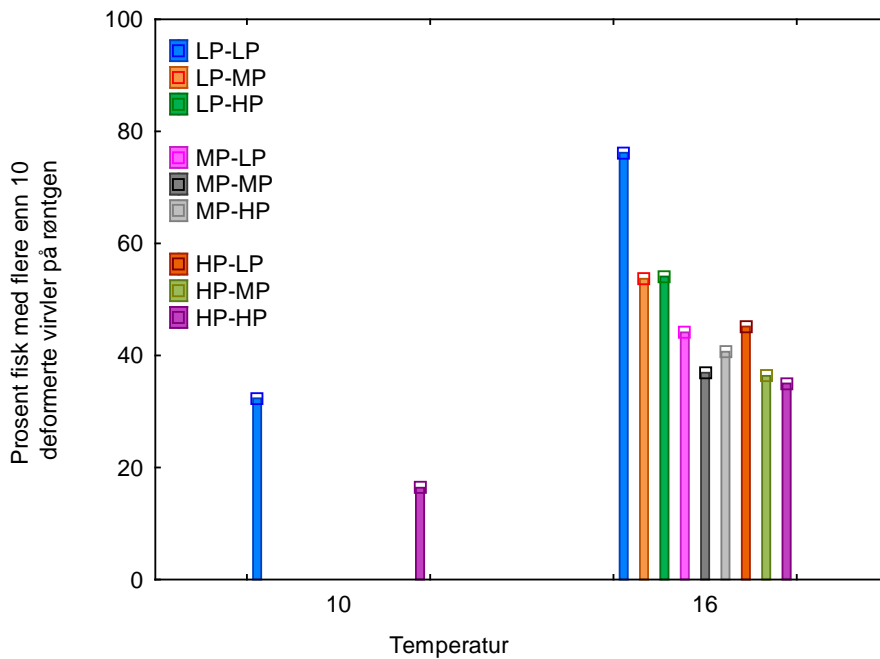


Figur 12. Prosent fisk med over ti deformerte ryggvirvler på røntgen ved avslutning av fôringsperioden (500 g) desember 2012.

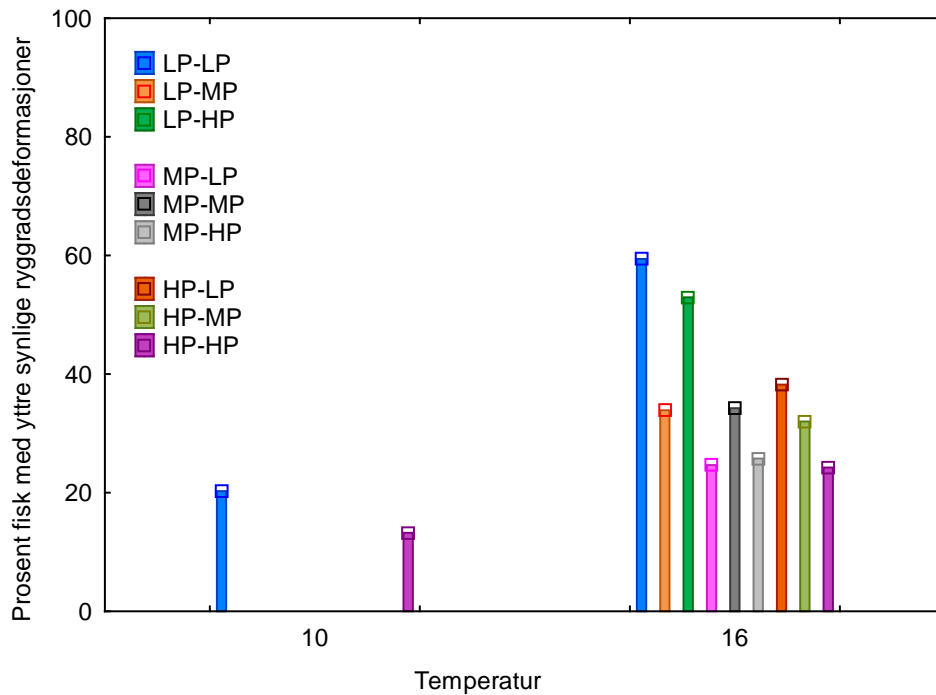
Ved avslutning av forsøket (4 kg) var bildet ganske likt som ved avslutning av fôringsperioden (Figur 13), men alvorlighetsgraden av deformasjonene var verre for fisk som hadde gått ved 16 °C enn ved 10 °C (Figur 14). Dette var også gjenspeilt i innslaget av fisk med utvendig synlige ryggradsdeformasjoner ved avslutning, der både diett P og temperatur viste tydelig effekt (Figur 15). Det bør nevnes at alle grupper hadde et relativt høyt innslag av fisk med utvendig synlige ryggradsdeformasjoner.



Figur 13. Prosent fisk med én eller flere deformerte ryggvirvler på røntgen ved avslutning av forsøket (4 kg) januar 2014.

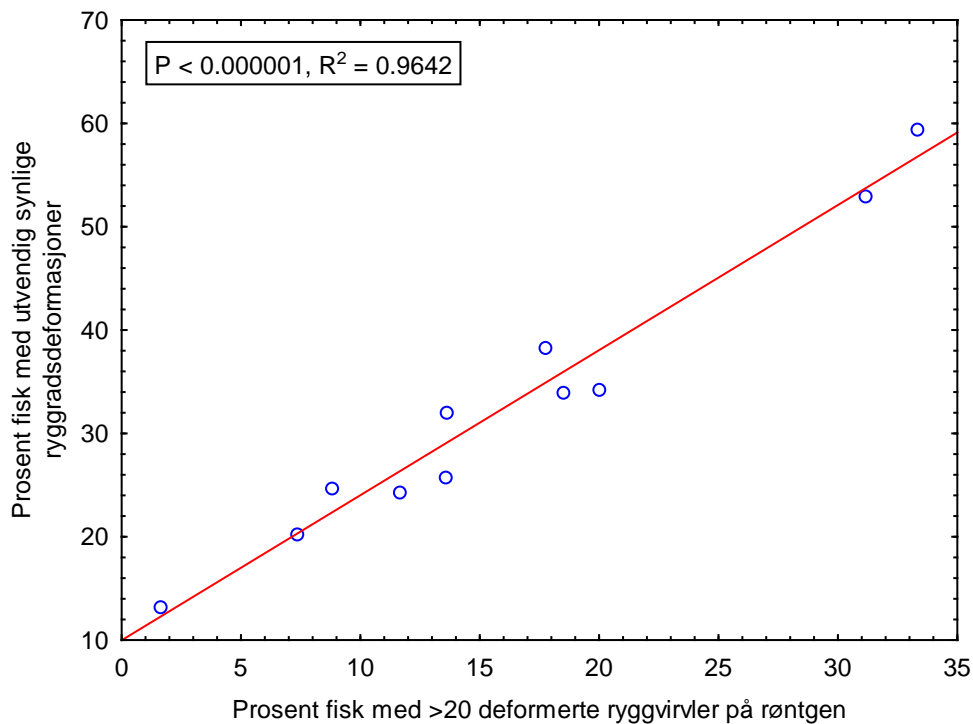


Figur 14. Prosent fisk mer enn ti deformerte ryggvirvler på røntgen ved avslutning av forsøket (4 kg) januar 2014.

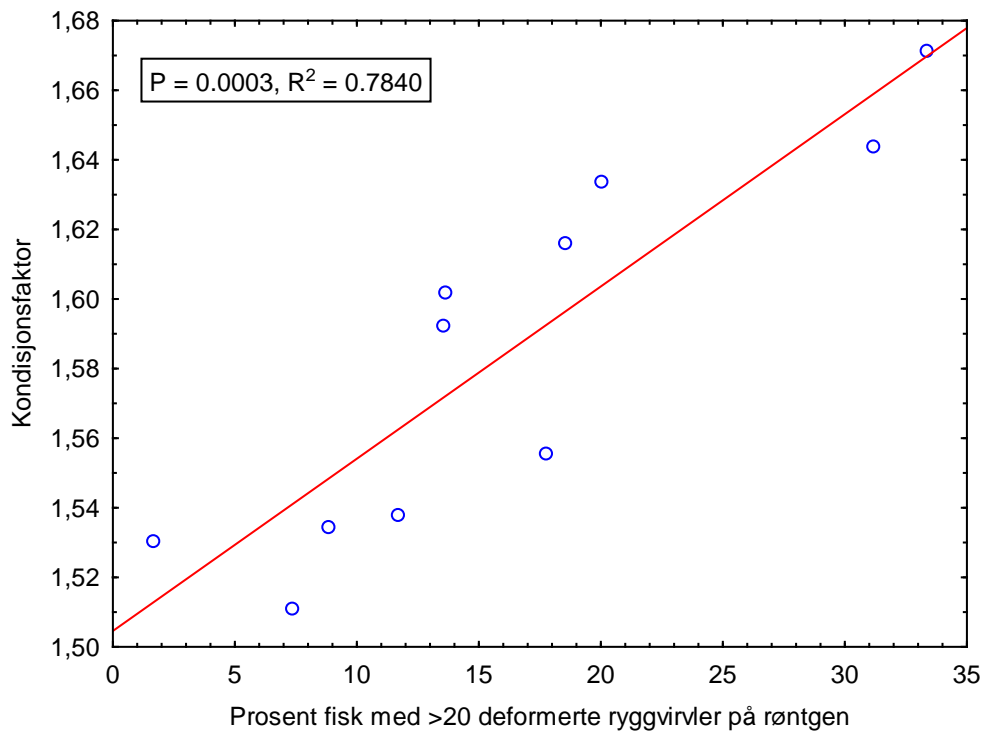


Figur 15. Prosent fisk med utvendig synlige ryggradsdeformasjoner ved avslutning av forsøket (4 kg) januar 2014.

Det var en sterk korrelasjon mellom andel fisk med utvendig synlige deformasjoner og fisk med alvorlige radiologiske deformasjoner (>20 deformerte virvler) når snitt per gruppe ble brukt som enhet (n = 11, Figur 16). Det var også en sterk korrelasjon mellom kondisjonsfaktor og andel fisk med alvorlige radiologiske deformasjoner (>20 deformerte virvler) når snitt per gruppe ble brukt som enhet (n = 11, Figur 17).



Figur 16. Korrelasjon mellom prosent fisk med utvendig synlige ryggradsdeformasjoner og mer enn 20 deformerte ryggvirvler på røntgen ved avslutning av forsøket (4 kg) januar 2014.



Figur 17. Korrelasjon mellom kondisjonsfaktor og prosent fisk med mer enn 20 deformerte ryggvirvler på røntgen ved avslutning av forsøket (4 kg) januar 2014.

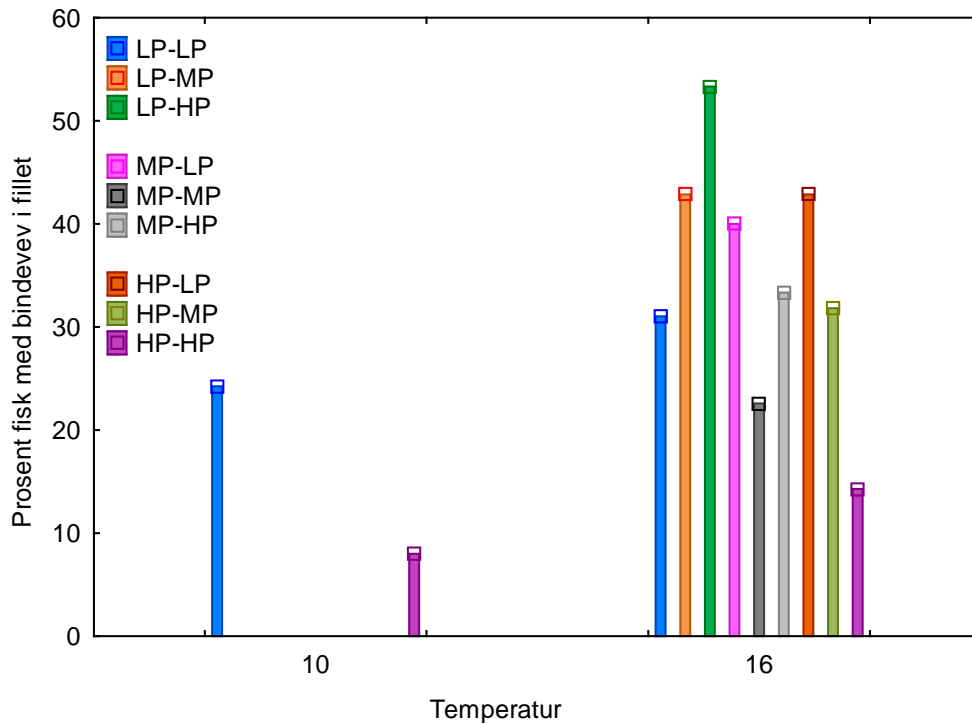
Filetering

Ved avslutning av forsøket var det mye fisk med bindevev rundt virvelsøylen som gav uønsket bindevev i filet ved filetering. Dette gjaldt hovedsakelig halepartiet. Fisken ble filetert manuelt, og fisk med bindevev i både venstre og høyre filet ble klassifisert som affektert (Figur 18).



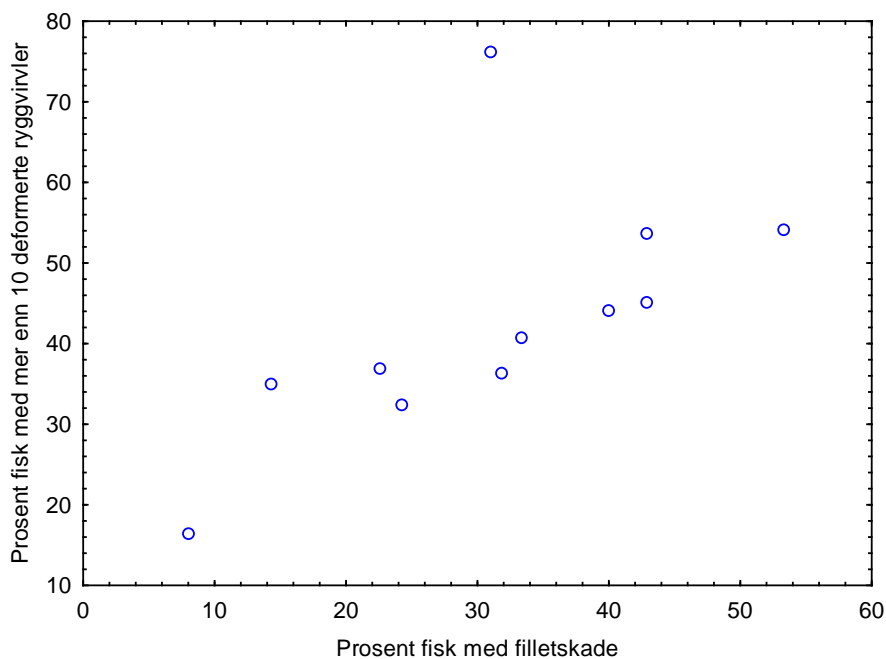
Figur 18. Foto av filet fra fisk med unormal bindevevsvekst rundt ryggraden i halepartiet ved avslutning av forsøket (4 kg).

For fisk som ble holdt ved 16 grader viste diett P-nivå i sjøvann motsatt effekt hos fisk som var gitt LP og HP i ferskvann (Figur 19). Dersom en ser på de "reine" diettgruppene (LP-LP, MP-MP, HP-HP) ved 10 °C og 16 °C ser det ut til at det for disse gruppene er en klar effekt av diett P; økt diett P gir lavere innslag av fisk med filetskade (Figur 19). Det ser videre ut som at skifte i diett P fra ferskvann til sjøvann er ugunstig, da gruppene LP-MP, LP-HP, MP-LP, MP-HP, HP-LP og HP-MP har høyest innslag (Figur 19).



Figur 19. Prosent fisk med uønsket bindevev i fillet ved avslutning av forsøket (4 kg) januar 2014.

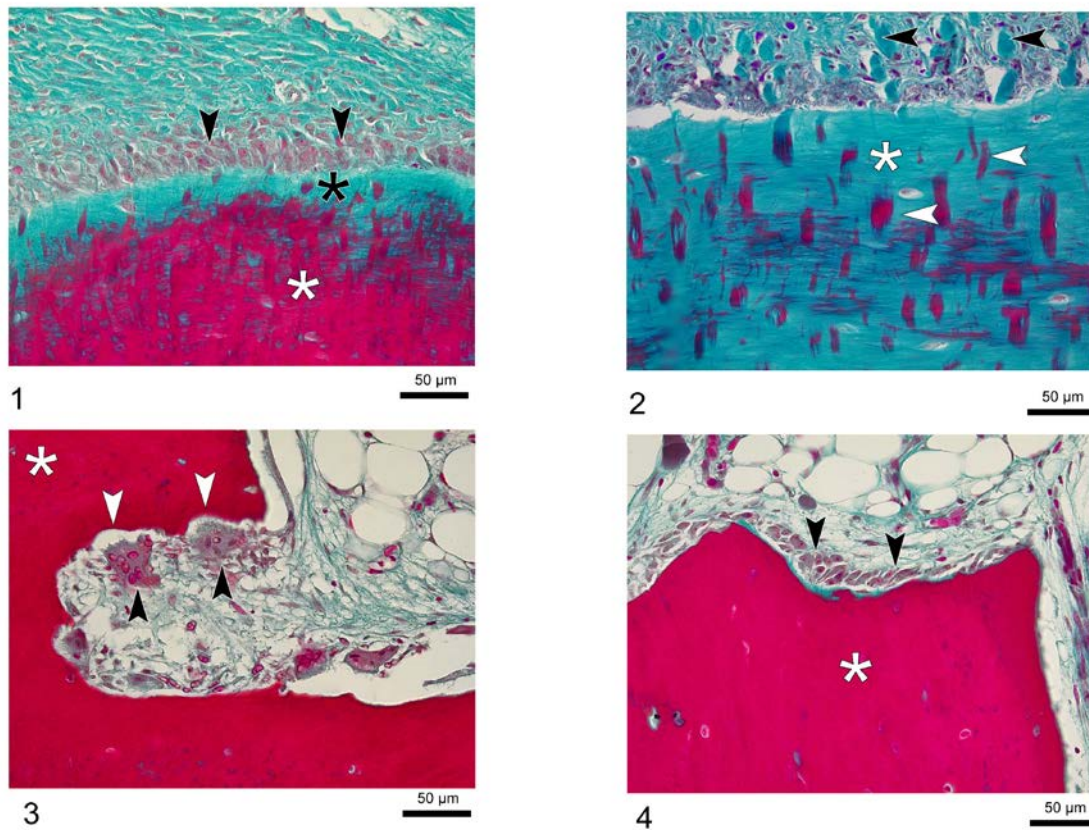
Det var signifikant korrelasjon mellom prosent fisk med mer enn ti deformerte ryggvirvler på røntgen og prosent fisk med filetskade når gruppe ble brukt som enhet ($n = 11$) (Figur 20). Gruppen LP-LP 16C viste avvikende sammenheng sammenlignet med de andre gruppene; denne gruppen hadde mye fisk med mer enn ti deformerte virvler (76 %), men et mer moderat innslag av fisk med filetskader (31 %). Ved å ta ut denne gruppen fra datasettet ($n = 10$) økte R^2 fra 0,3889 til 0,8383 (Figur 20).



Figur 20. Korrelasjonsplott mellom prosent fisk med mer enn ti deformerte ryggvirvler og med filetskader ved avslutning av forsøket (4 kg).

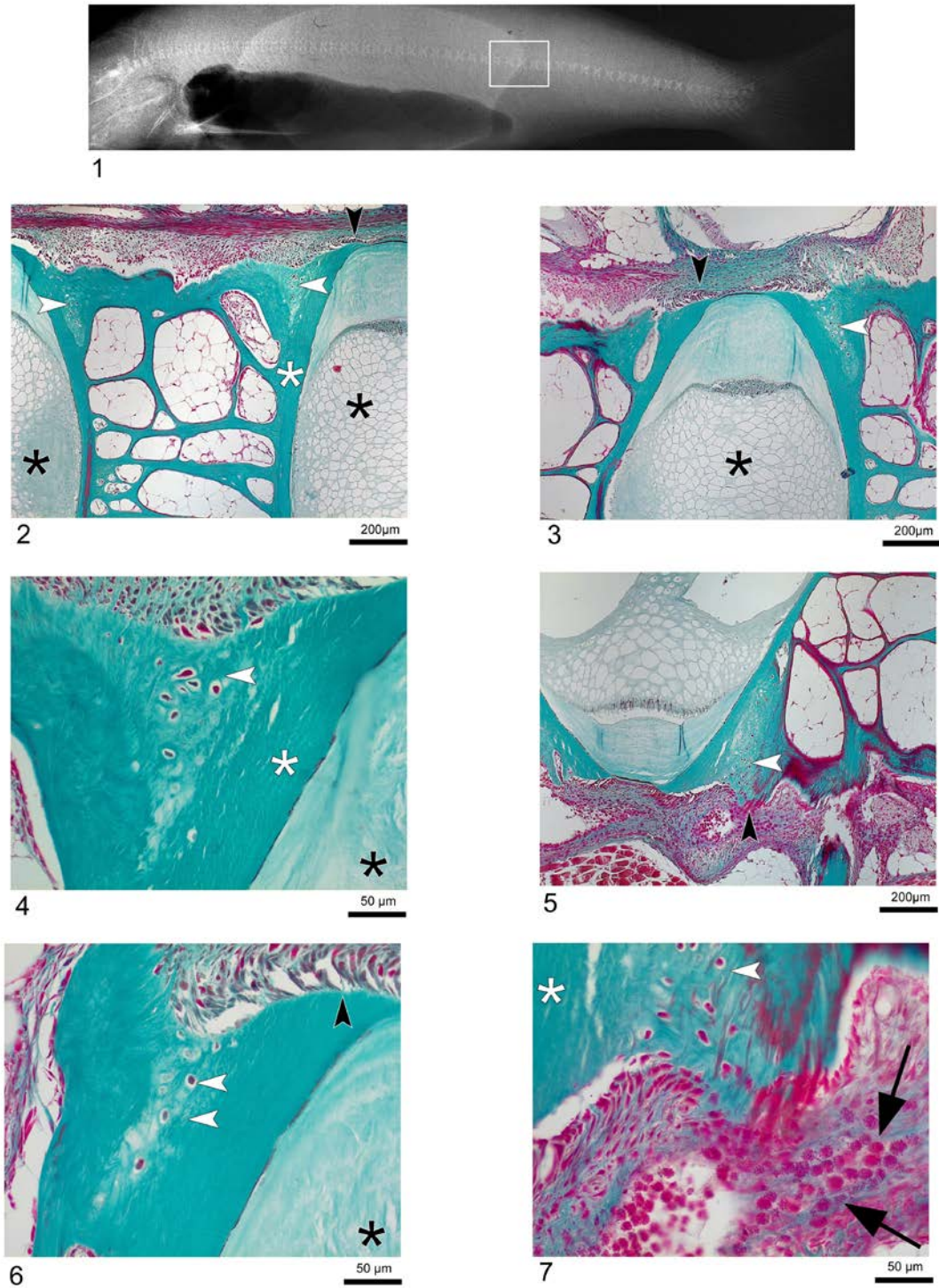
Histopatologi

Det ble gjort histopatologiske analyser av ryggvirvler ved 20 g, 100 g (sjøvannsoverføring) og avslutning av forsøket (4 kg). Disse virvlene ble også røntgenfotografert. Figur 21 viser ulike beinceller som ble påvist i dette materialet vha. av Massons trichrome-farging.

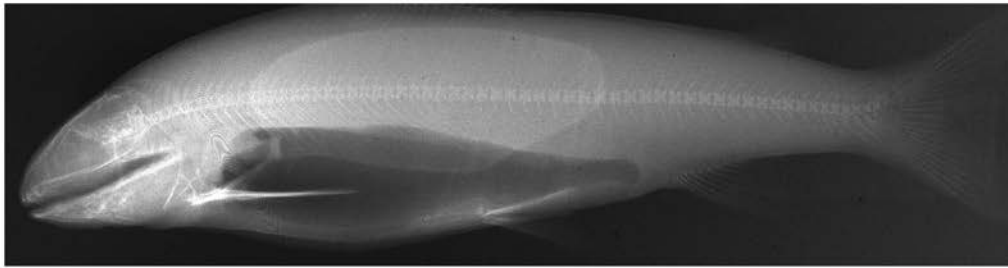


Figur 21. Normale beinceller, identifisert vha. Massons trichrome-farging. 1. osteoblaster (svart pilhode), osteoid (svart stjerne), bein (hvit stjerne). 2. Kollagen fiberbunter (svart pilhode), Sharpey fibre (hvitt pilhode), bein (hvit stjerne). 3. Nedbryting av bein. Osteoklaster (svart pilhode), resorpsjons lakuner (hvitt pilhode). 4. Påfylling av resorpsjons-lakuner. Osteoblaster (svart pilhode), bein (hvit stjerne).

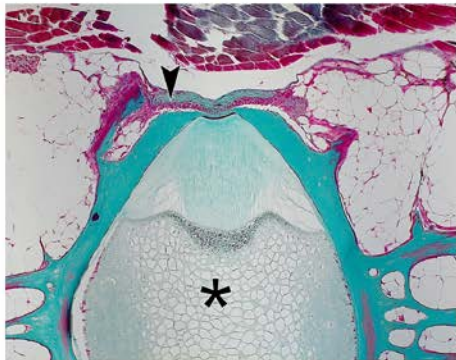
20 g: Totalt 24 individer (8 per diettgruppe) ble fiksert i formalin og røntgenfotografert. Røntgenanalysene viste at 7 av individene fra LP-gruppen og 1 fra MP-gruppen viste fenotypiske tegn på lavt mineralinnhold. Histopatologisk viste disse ektopisk (feilplassert) patologisk brusk som var lokalisert ventralt og dorsalt ved siden av vekstsonene i ryggvirvlens endeplater (Figur 22). Figur 23 viser en normal virvel fra denne fiskestørrelsen.



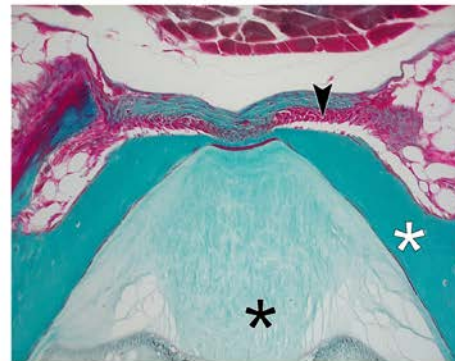
Figur 22. Ferskvann 20 g. Deformert bein i virvlens vekstsoner. Virvel endeplater og mellomrom dorsalt (2, 3, 4, 6) og ventralt (5, 7). Ektopisk patologisk brusk ved siden av virvlens vekstsoner (Figur 23 viser normal situasjon uten brusk). Ektopisk brusk (hvitt pilhode), bein (hvit stjerne), osteoblaster (svart pilhode), mellomvirvelvev; notochord eller notochord slire (svart stjerne), granulocytter (svart pil).



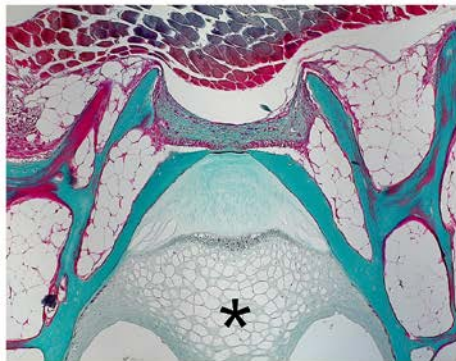
9



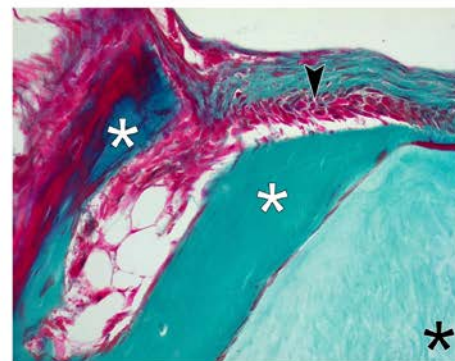
11



12



13

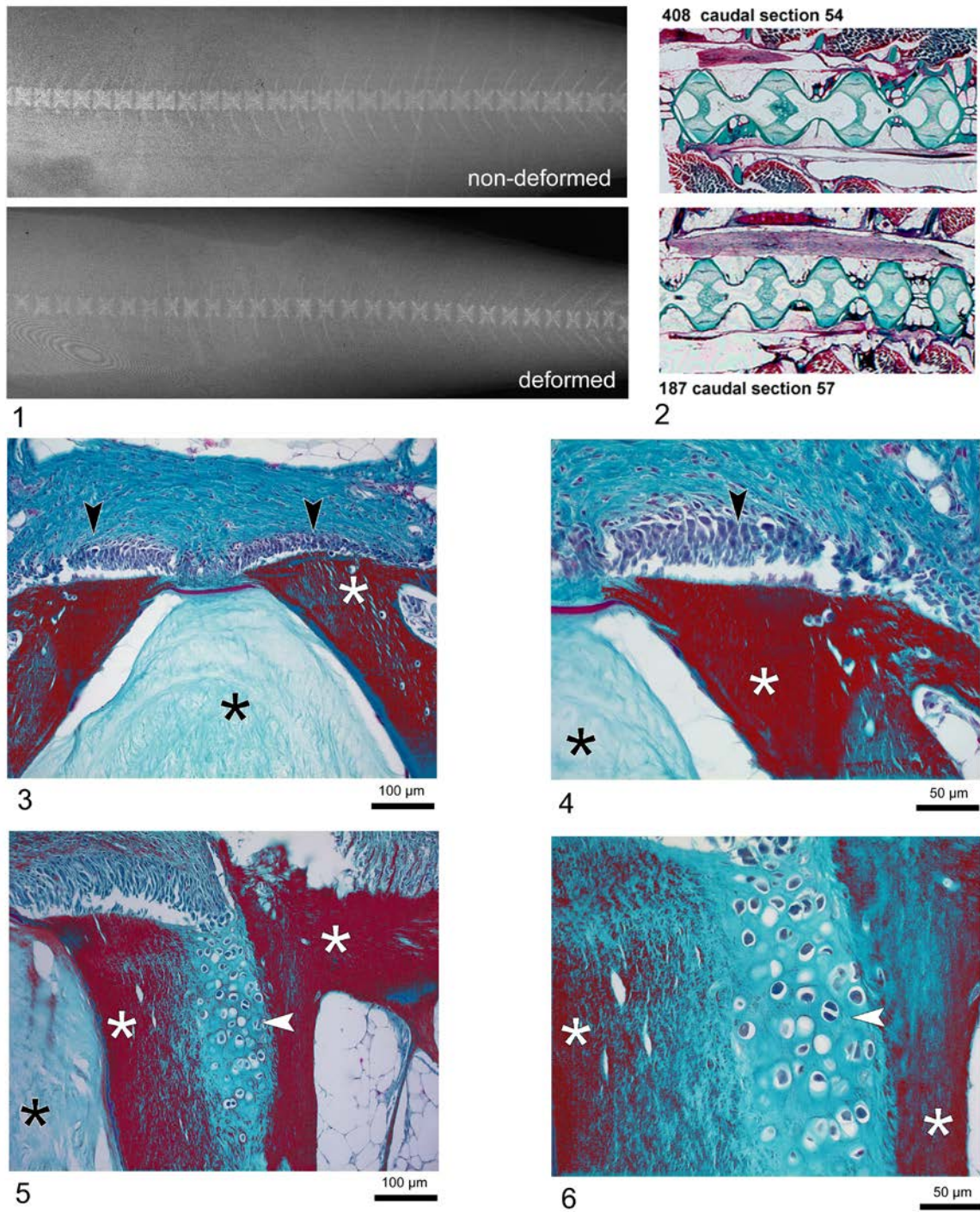


14

Figur 23. Ferskvann 20 g. Normalt ikke-deformert bein i virvelens vekstsoner. Virvelens endeplate og mellomvirvelrom dorsalt. Osteoblaster (svart pilhode), bein (hvit stjerne), mellomvirvelvev; notochord eller notochord-slire (svart stjerne).

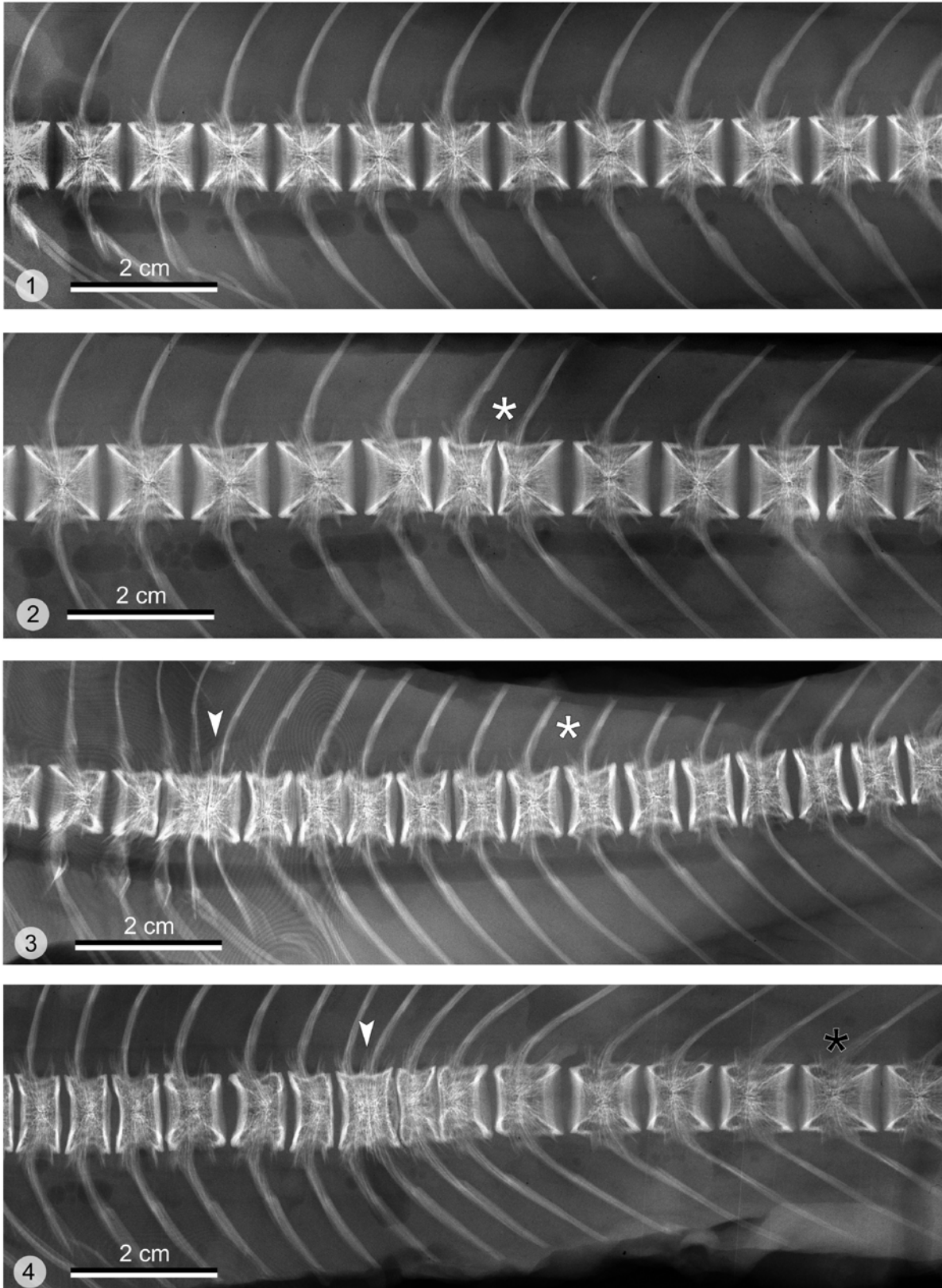
100 g: Totalt 18 individer (6 per diettgruppe) ble fiksert i formalin og røntgenfotografert. Røntgenanalysene viste at fem av individene fra LP-gruppen og én fra MP-gruppen viste fenotypiske tegn på lavt mineralinnhold. Histopatologisk viste også disse ektopisk brusk ved siden av vekstsonene i ryggvirvlens endeplater, men større mengde brusk enn ved 20 g, og med en mer hyalin fenotype.

Figur 24 sammenligner en normal og en deformert vekstsone.



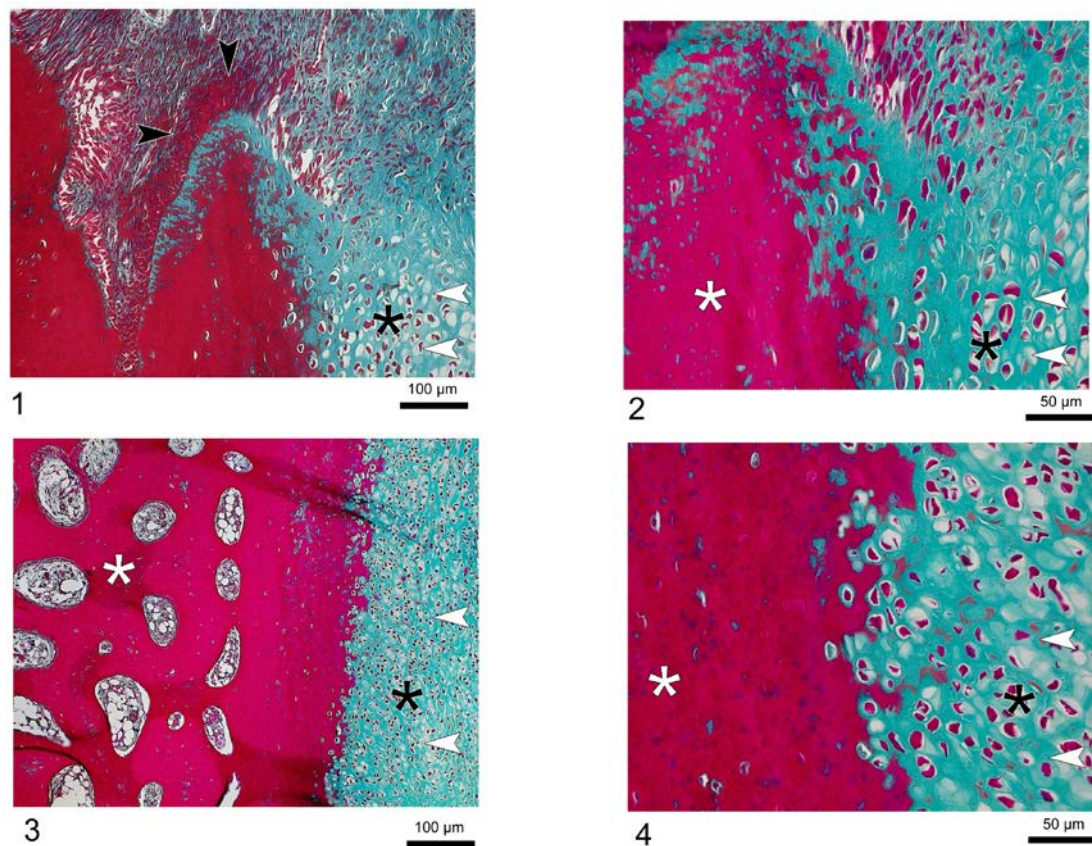
Figur 24. Overføring til sjøvann 100 g. Radiologisk og mikroskopisk fremstilling av virvelsøyler fra et normalt og et deformert individ. 3-6. Sammenligning av virvelens vekstsone i et normalt ikke-deformert individ (3, 4) og et deformert individ (5, 6). Legg merke til den fremskredne utviklingen av ektopisk brusk ved siden av virvelens vekstsone. Ektopisk brusk (hvitt pilhode), bein (hvit stjerne), osteoblaster (svart pilhode), mellomvirvelvev; notochord eller notochord-slire (svart stjerne).

4 kg: Totalt 66 individer (6 per diettgruppe) ble fiksert i formalin og røntgenfotografert. Som vist i avsnitt over om virveldeformasjoner var det mye deformert fisk i alle gruppene. Blant den undersøkte fisken var 56 deformerte (én eller flere deformerte virvler). Disse hadde ulike typer sammenvoksninger og kompresjoner (Figur 25), med et tydelig hode til hale-gradient. Det var mest deformasjoner i halepartiet, mens deformasjoner nærmere hodet var mer sjeldne. Hos fisk med tydelige kompresjoner var alt vev mellom virvlene – normalt notochordvev – erstattet med brusk (Figur 26). I virvlens vekstsoner var det en overgang fra beinformende celler (osteoblaster) til bruskbildende celler (chondroblaster). Denne overgangen tyder på at cellene som danner hyalin (patologisk) brusk stammer fra osteoblaster som gjennomgår osteoplastisk til chondroblastisk transdifferensiering. Som et resultat av dette ser man en gradient fra bein til brusk med chondroid bein som et overgangsvev. Dette vevet er ikke til stede i normale virvler.



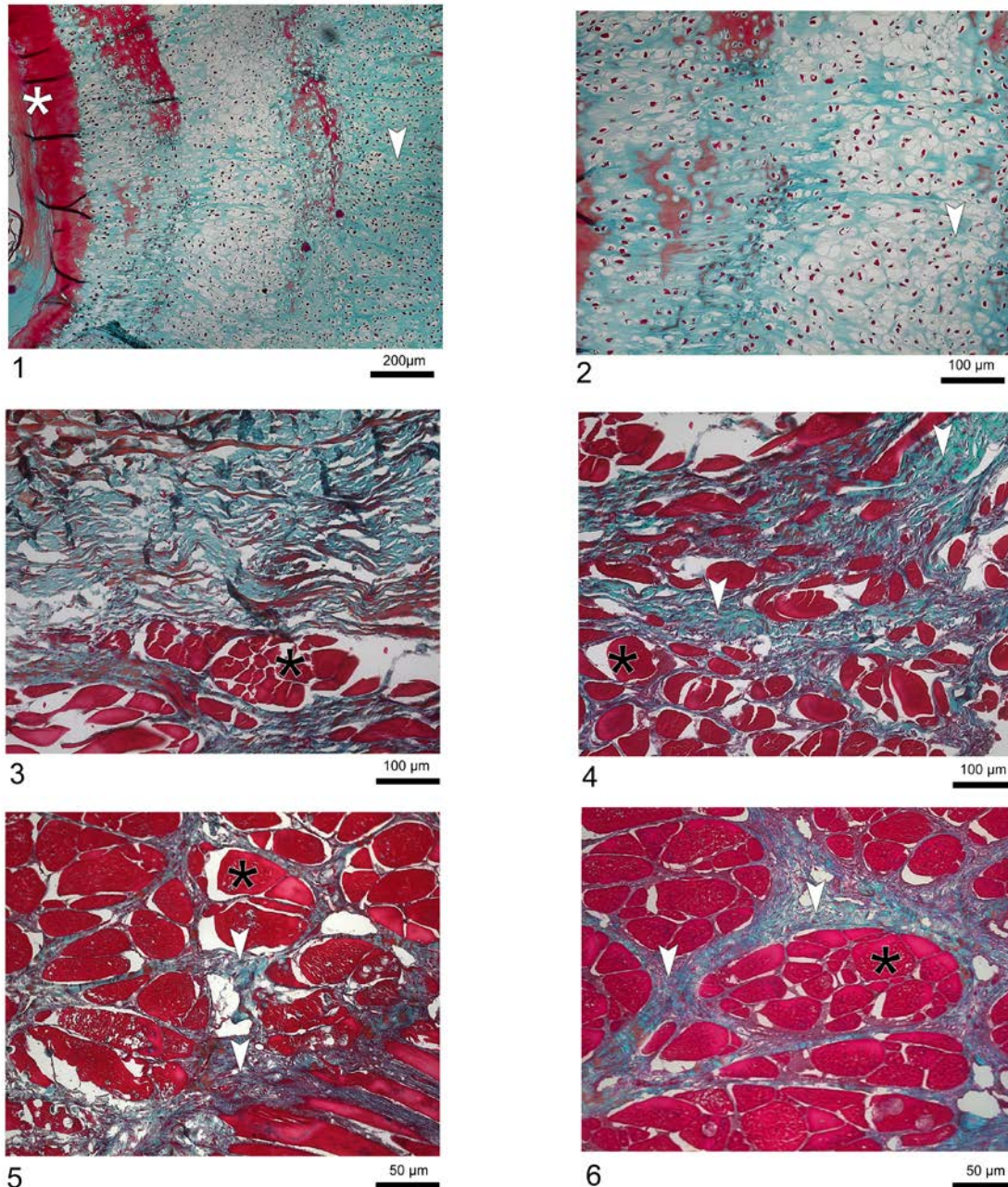
Figur 25. 4 kg avslutning av forsøket. Typiske deformasjonstyper diagnostisert hovedsakelig i haleregionen av virvelsøylen. 1. normale virvler. 2. ikke-alvorlige deformasjoner (type 5 og 6) i virvel nummer 35 til 45. 3. typiske kompresjoner og ferdige sammenvoksninger i virvler nummer 31 til 47. 4. Fisk med alvorlige

kompresjoner og ferdige sammenvoksninger i virvel nummer 31 til 46. Legg merke til den kompenserende forlengelse av virvler, virvel nummer 42 og bakover. Kompresjon (hvit stjerne), sammenvoksning (hvitt pilhode), kompenserende forlengelse (svart stjerne).



Figur 26. 4 kg avslutning av forsøket. Alvorlig kompresjon. Massiv utvikling av ektopisk brusk som erstatter notochordvevet i mellomvirvelrommet. Ektopisk brusk (hvitt pilhode), bein (hvit stjerne), osteoblaster (svart pilhode), mellomvirvelvev, lokalisering av mellomvirvelromm nå fylt med brusk (svart stjerne).

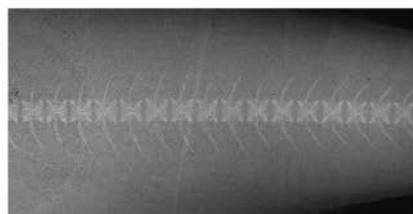
Ektopisk brusk hadde spredd seg ut fra komprimerte/sammenvokste virvler og dannet et vev som var en mellomting mellom brusk og bindevev – chondroid (Figur 27). I områder med sammenvokste virvler dannet fibrøst chondroid vev en ekstracellulær formløs substans med samme innfargingsegenskaper som ekstracellulær bruskmatriks. Dette vevet trengte inn i muskulaturen og erstattet muskelfibrene (Figur 27).



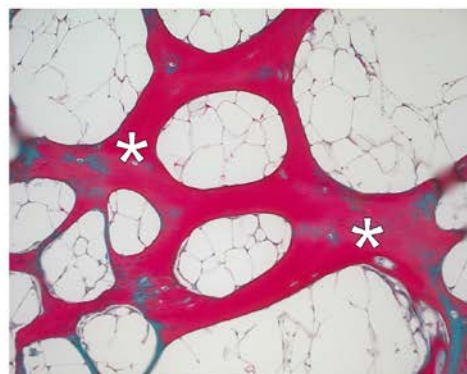
Figur 27. 4 kg avslutning av forsøket. Alvorlig kompresjon og sammenvoksning. Ektopisk bruskk som erstatter notochordvevet og forgreining av fibrøst chondroid vev inn i muskulaturen. 1, 2. Bruskk som går over til chondroid vev i en sammenvokst virvel og trenger inn omkringliggende vev. 3-6. Fibrøst og chondroid vev (lysegrønt) som invaderer muskulaturen (rød). Legg merke til uordenen i muskelfibrene. Ektopisk bruskk og chondroid (hvitt pilhode), bein (hvit stjerne), muskelfibre (svart stjerne).

Alle fiskestørrelser: De fleste diagnostiserte deformasjonene var knyttet til dårlig mineraliserte endeplater i virvlene, til dannelse av ektopisk bruskk, og den påfølgende erstatningen av normalt (notochord basert) vev mellom virvelen med ektopisk bruskk og dens inntregning i muskulaturen.

Bare få individer med virvler diagnostisert som dårlig mineralisert vha. røntgen viste forandringer i beinstruktur. Figur 28 viser et eksempel på sammenligninger til normal beinstruktur: "hyper tette" virvler med mye chondroid bein og myke bølgede beintrabekler.



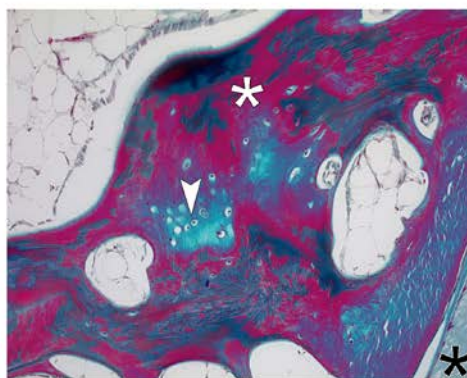
1



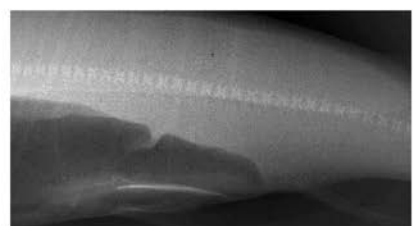
2



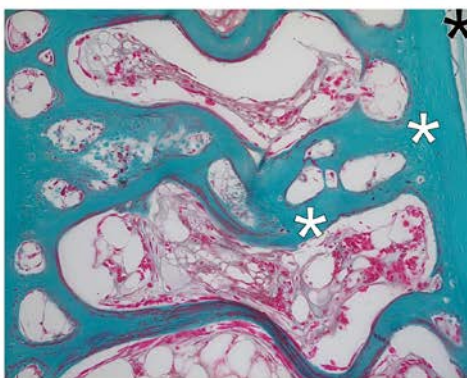
3



4



5

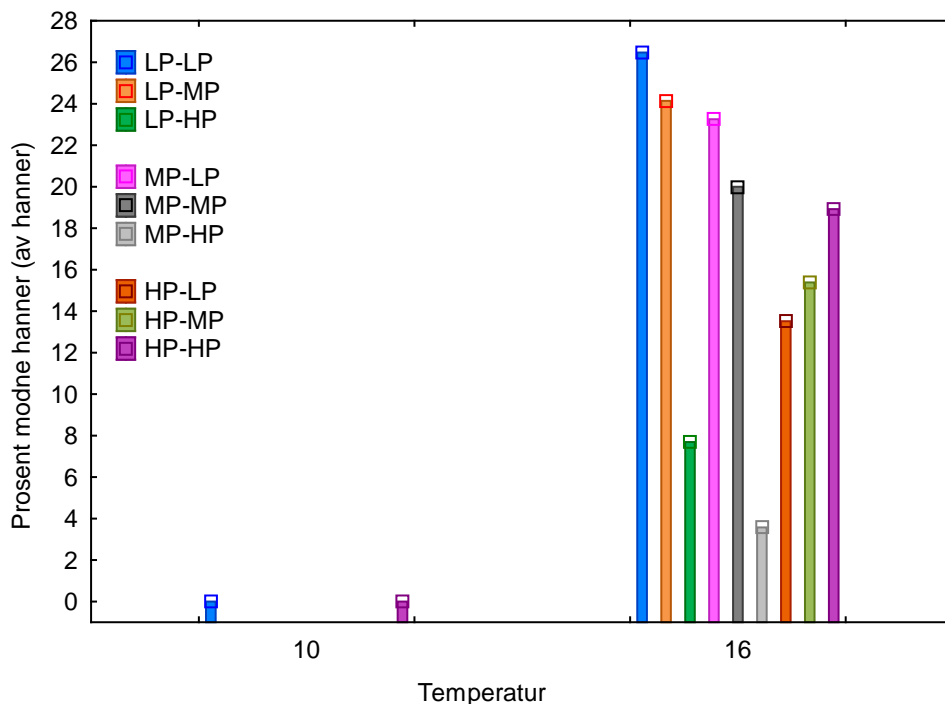


6

Figur 28. Virvelens beinstruktur. 1. og 2. normal beinstruktur. 3. og 4. "hyper tett" virvel. 4. og 5. virvel med lavt mineralinnhold og overgang til myke spongiøse strukturer. Ektopisk chondroid bein (hvitt pilhode), bein (hvit stjerne), virvelmellomrom (svart stjerne).

Kjønnsmodning

Dette forsøket hadde ikke som mål å se på hvordan temperatur og fosforenæring påvirker kjønnsmodning; dette ble gjort siden det var modne fisk ved avslutning av forsøket. En tidligere studie (Fjellidal et al. 2012d) viste at høstsmolt gitt vanlig kommersielt fôr i ferskvann, ekstra fosfor-fôr de første tre månedene i sjøvann, og deretter vanlig kommersielt fôr, fikk redusert innslag av grilsing blant hanner sammenlignet med høstsmolt gitt vanlig kommersielt fôr hele tiden. Det var få modne hunner ved avslutning av forsøket i januar 2014; totalt 5 modne hunner fordelt på 5 ulike grupper (LP-LP, LP-MP, MP-LP, MP-MP, MP-HP). For hannene var dataene mer interessante; HP i sjøvann gav kraftig redusert innslag av modne hanner dersom de tidligere var gitt LP og MP i ferskvann (LP-HP, MP-HP) (Figur 29). HP i sjøvann hadde ikke denne effekten dersom fisken var gitt HP i ferskvann. Det var ingen modne individer blant fisk som var holdt ved 10 °C.

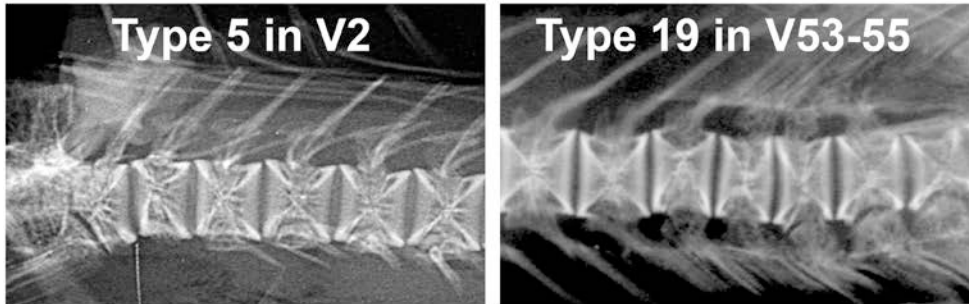


Figur 29. Prosent modne hanner (av hanner) ved avslutning av forsøket januar 2014.

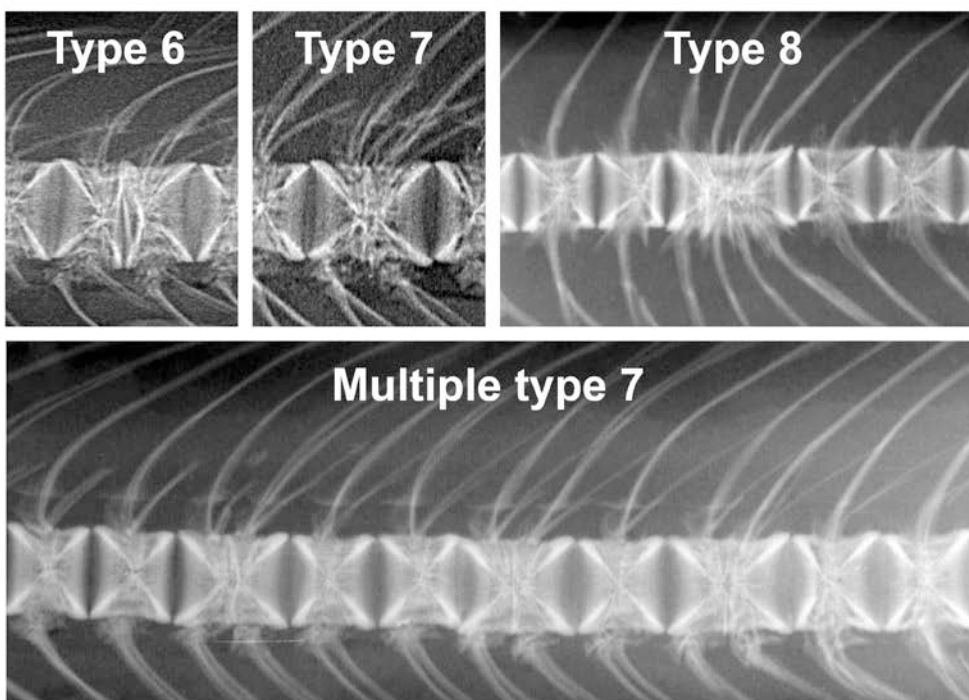
Deformasjoner hos villaks

Vi fant virveldeformasjoner hos villaks. 43 % av fiskene (totalt 65 fisk undersøkt) hadde én eller flere deformerte virvler på røntgen. Disse var som regel små endringer i virvelform nær hode og hale. Sammenvekste virvler ble også observert. Andel fisk med sammenvekste virvler sank signifikant i Figgjo mellom 2010 og 2012 (2010: 29 %, 2011: 17 %, 2012: 5 %). Den mest typiske deformatjonen hos oppdrettslaks, sammentrykte virvler i haleregionen, ble ikke observert i noen av de undersøkte villaksene. Gjennomsnittlig antall deformerte virvler blant fisk med deformasjoner var 1,7 hos villaksen, mens det var 9,0 hos gruppen med minste deformasjoner (HP-HP 10C) og 18,9 hos gruppen med mest deformasjoner (LP-LP 16) i fosfor-forsøket. Figur 30 viser virveldeformasjoner funnet hos villaks fra Figgjoelva.

Minor compressions



Fusions



Figur 30. Ulike virveldeformasjoner funnet hos villaks. Små kompresjoner (type 5 og 19), sammenvoksninger (type 6, 7 og 8).

Konklusjon

Resultatene fra prosjektet viser tydelig at diett P-nivå påvirker viktige velferds-, nedklassings- og reklamasjonsrelaterte faktorer som virvelsøyledeformasjoner, bindevevsvekst i muskulatur og kjønnsmodning hos oppdrettslaks. Dette betyr at fokus på optimal fosforenæringsnivå vil være formålstjenlig for en positiv utvikling i norsk lakseoppdrett. Forsøket viser at det er særlig viktig å sikre god P-forsyning til laks i ferskvann. Videre viser de histopatologiske analysene at dårlig mineralisert bein gir økt risiko for dannelse av ektopisk brusk ved virvlernes vekstsoner, som med tid kan erstatte det normale notochordvevet mellom virvlene og fremme dannelse av bindevev som trenger inn i muskulaturen rundt ryggspylen og skade denne. Videre viser resultatene at økt temperatur gir mer alvorlige deformasjoner og mer kjønnsmodning.

6. Leveranser

- Per Gunnar Fjelldal, Sissel Albrektsen, Ramon Fontanillas, Eckhard Witten, Olav Breck. 2013. Ulike P-nivå i fôr til laks: Effekter på vekst og beinohelse. Dialogmøte om mineralernæring, beinohelse og fosfor utnyttelse fra biprodukter. Clarion Hotel Bergen Airport, 18. april 2013.
- Hovde (2013). Validation of a method for analysis of soluble phosphorus by use of alkaline extraction and spectrophotometric determination. Nofima Report 17/2013.
- Per Gunnar Fjelldal, Kevin Glover. 2013. Virveldeformasjoner hos villaks fra Figgjo og Arna elva. Dialogmøte om mineralernæring, beinohelse og fosforutnyttelse fra biprodukter. Clarion Hotel Bergen Airport, 18. april 2013.
- Florian Sambraus, Olav Breck, Sissel Albrektsen, Paul Eckhard Witten, Ramon Fontanillas, Tårn Thomsen, Per Gunnar Fjelldal. 2013. Dietary phosphorus in fresh and seawater – impacts on rapid growing farmed Atlantic salmon. Poster: 3rd International Conference, Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology, April 22-24, 2013 Tavira, Algarve, Portugal.
- Florian Sambraus, Kevin A. Glover, Tom Hansen, Monica Solberg, Thomas W. K. Fraser, Per Gunnar Fjelldal. 2013. A field study on occurrence of vertebral deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from two rivers in Western Norway. Poster: 3rd International Conference, Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology, April 22-24, 2013 Tavira, Algarve, Portugal.
- Florian Sambraus, Kevin A. Glover, Tom Hansen, Thomas W.K. Fraser, Monica F. Solberg, Per Gunnar Fjelldal, 2013. Vertebra deformities in wild Atlantic salmon caught in the river Figgjo, southwest Norway. *Journal of Applied Ichthyology* 30, 777-782. (vedlagt pdf).
- Det foreligger videre plan for vitenskapelig og populærvitenskapelig publisering av resultatene fra fosforforsøket.

7. Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater

Tårn Helgøy Thomsen (Skretting), Sissel Albrektsen (NOFIMA) og Per Gunnar Fjelldal (Havforskningsinstituttet) har kvalitetssikret gjennomføring av forsøk, analyser og opparbeidet dataene.

Referanser

- Albrektsen S., Thorsen, K., Bæverfjord, G., Nygård, H. (2012). Improved P availability from acid treated fish bone meal in Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. Oral presentation, Havbrukskonferanse, NFR, Stavanger, 16–18 April, 2012, Norway.
- Albrektsen, Sissel; Thorsen, Kaspar Høye; Bæverfjord, Grete; Nygaard, Halvor (2013). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB) Third Meeting; 2013-04-22 - 2013-04-24 .
- Albrektsen, S., Lock, E.-J., Bæverfjord, G., Pedersen, M., Takle, H., Ørnstrud, R., Veiseth-Kent, E., Waagbø, R. og Ytteborg, E. (2014). Økt utnyttelse av næringsstoffer fra marint restråstoff. Sluttrapport FHF prosjekt #900558. Nofima Rapport 11/2014.
- Aunsmo, A.; Guttvik, A.; Midtlyng, P.J.; Larssen, R.B.; Evensen, O.; Skjerve, E., 2008: Association of spinal deformity and vaccine-induced abdominal lesions in harvest-sized Atlantic salmon, *Salmo salar*. L. J. Fish Dis. 31, 515-524.
- Bæverfjord, G.; Åsgård, T.; Shearer, K.D., 1998: Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and post-smolts. Aq. Nutr. 4, 1–11.
- Grete Bæverfjord, Per Gunnar Fjellidal, Rune Waagbø, Sissel Albrektsen, Bjarne Hatlen, Vegard Denstadli, Elisabeth Ytteborg, Harald Takle, Eric-Jan Lock, Marc Berntssen, Anne-Kathrine Lundebye, Torbjørn Åsgård (2012). Working title: Review on mineral nutrition and potential impact on bone development and skeletal deformities. FHF rapport 2012.
- Berg, A.E.; Rødseth, O.M.; Tangerås, A.; Hansen, T.J., 2006: Time of vaccination influences development of adherences, growth and spinal deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Dis. Aquat. Org. 69, 239–248.
- Coloso, R.M.; King, K.; Fletcher, J.W.; Hendrix, M.A.; Subramanyam, M.; Weis, P.; Ferraris, R.P., 2003: Phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical diets and its consequences on effluent phosphorus levels. Aquaculture 220, 801-820.
- Fjellidal, P.G.; Nordgarden, U.; Berg, A.; Grotmol, S.; Totland, G.K.; Wargelius, A.; Hansen, T., 2005: Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolt. Aquaculture 250, 516–524.
- Fjellidal, P.G.; Lock, E.J.; Grotmol, S.; Totland, G.K.; Nordgarden, U.; Flik, G.; Hansen, T., 2006: Impact of smolt production strategy on vertebral growth and mineralisation during smoltification and the early seawater phase in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Aquaculture 261, 715–728.
- Fjellidal, P.G.; Nordgarden, U.; Hansen, T.J., 2007: The mineral content affects vertebral morphology in under-yearling smolt of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 270, 231–239.
- Fjellidal, P.G.; Hansen, T.; Breck, O.; Sandvik, R.; Waagbø, R.; Berg, A.; Ørnstrud, R., 2009: Supplementation of dietary minerals during the early seawater phase increase vertebral strength and reduce the prevalence of vertebral deformities in fast growing under-yearling Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. Aquaculture Nutrition 15, 366-378.

- Fjelldal P.G.; Hansen T., 2010: Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. *Aquaculture* 309, 131-136.
- Fjelldal, P.G.; Lock, E-J.; Hansen, T.; Wargelius, A.; El-Mowafi, A.; Ørnsrud, R., 2011: Extra dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Oral presentation at the Interdisciplinary Approach in Fish Skeletal Biology Second Meeting, 26-28 April, Tavira, Portugal.
- Fjelldal, P.G.; Hansen, T.; Breck, O; Ørnsrud, R.; Lock, E-J.; Waagbø, R.; Wargelius, A.; Witten, E., 2012a: Vertebral deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – etiology and pathology. *J. App. Ichthyol.*, in press, doi: 10.1111/j.1439-0426.2012.01980.x.
- Fjelldal, P.G.; Lock, E.J.; Hansen, T.; Waagbø, R.; Wargelius, A.; Gil Martens, L.; El-Mowafi, A.; Ørnsrud, R., 2012b: Continuous light induces bone resorption and affects vertebral morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a phosphorous deficient diet. *Aquaculture Nutrition*, in press, doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00918.x.
- Fjelldal, P.G.; Hansen, T.; Albrektsen, S., 2012c: Inadequate phosphorus nutrition in juvenile Atlantic salmon has a negative effect on long-term bone health. *Aquaculture* 334-337, 117-123.
- Fjelldal, P.G.; Imsland, A.; Hansen, T., 2012d: Vaccination and elevated dietary phosphorus reduces the incidence of early sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 364, 333-337.
- Grini, A.; Hansen, T.; Berg, A.; Wargelius, A.; Fjelldal, P.G., 2011: The effect of water temperature on vertebral deformities and vaccine induced abdominal lesions in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Fish Dis.* 34, 531–546.
- Hansen, T.; Fjelldal, P.G.; Yurtseva, A.; Berg, A., 2010: A possible relation between growth and number of deformed vertebrae in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Appl. Ichthyol.*
- Haugarvoll, E.; Bjerkås, I.; Szabo, N.J.; Satoh, M.; Koppang, E.O., 2010: Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. *Vaccine* 28, 4961-4969.
- Helland, S.; Refstie, S.; Espmark, A.; Hjelde, K.; Baeverfjord, G., 2005: Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. *Aquaculture* 250, 364-376.
- Hovde (2013). Validation of a method for analysis of soluble phosphorus by use of alkaline extraction and spectrophotometric determination. Nofima Report 17/2013.
- Ketola, H.G., 1975: Requirement of Atlantic salmon for dietary phosphorus. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 104, 548-551.
- Kvellestad, A.; Hoie, S.; Thorud, K.; Torud, B.; Lyngoy, A., 2000: Platyspondyly and shortness of vertebral column in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway - description and interpretation of pathologic changes. *Dis. Aquat. Org.* 39, 97–108.
- Michie, I., 2001: Causes of downgrading in the salmon industry. In: *Farmed Fish Quality* (ed. by S.C. Kestin & P.D. Warris), pp. 129-136. Fishing News Books. Oxford.
- NRC – National Research Council, 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington DC.

- Phillips, M.J.; Clarke, R.; Mowat, A., 1993: Phosphorus leaching from Atlantic salmon diets. *Aquacultural Engineering* 12, 47-54.
- Sugiura, S.H.; Dong, F.M.; Hardy, R.W., 2000: A new approach to estimating the minimum dietary requirement of phosphorus for large rainbow trout based on nonfecal excretions of phosphorus and nitrogen. *J. Nutr.* 130, 865-872.
- Sullivan, M.; Hammond, G.; Roberts, R.J.; Manchester, N.J., 2007a: Spinal deformation in commercially cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a clinical and radiological study. *J. Fish Dis.* 30, 745-752.
- Wargelius, A.; Fjelldal, P.G.; Nordgarden, U.; Hansen, T., 2009: Continuous light affects mineralization and delays osteoid incorporation in vertebral bone of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 212, 656-661.
- Witten, P.E.; Gil-Martens, L.; Hall, B.K.; Huysseune, A.; Obach, A., 2005: Compressed vertebrae in Atlantic salmon *Salmo salar*: evidence for metaplastic chondrogenesis as a skeletogenic response late in ontogeny. *Dis. Aquat. Org.* 64, 237–246.
- Witten, P.E.; Obach, A.; Huysseune, A.; Bæverfjord, G., 2006: Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture* 258, 164-172.
- Ytteborg, E.; Bæverfjord, G.; Torgersen, J.; Hjelde, K.; Takle, H., 2010: Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Physiology* 10, 12.
- Åsgård, T.; Shearer, K.D., 1997: Dietary phosphorus requirement of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition* 3, 17–23.