

Optimalisering av fett og fettsyrer i fôr til atlantisk laks for bedre helse og velferd gjennom ulike livsfaser og utfordrende miljøbetingelser

Faglig sluttrapport

Bente Ruyter, Nini Sissener, Esmail Lutfi, Bjørg Kristine Hundal, Gerd Marit Berge, Brett Glencross, David Huyben, Tor Gjøen, Adriana Magalhaes Santos Andresen, Grete Bæverfjord, Erik Høglund, Mark Powell, Marta Bou Mira, Chandrasekar Selvam, Tone-Kari Østbye, Nina Liland, Grethe Rosenlund, Trygve Sigholt, Ingunn Stubhaug, Øystein Evensen, Aleksei Krasnov og Turid Mørkøre





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 77 62 90 00

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<i>Tittel:</i> Optimalisering av fett og fettsyrer i fôr til atlantisk laks for bedre helse og velferd gjennom ulike livsfaser og utfordrende miljøbetingelser	ISBN 978-82-8296-681-8 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> Optimising dietary fatty acids and lipids of Atlantic salmon to secure their health and welfare through varying environmental conditions and life stages [OptiHealth]	<i>Rapportnr.:</i> 17/2021
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Bente Ruyter ¹ , Nini Sissener ² , Esmail Lutfi ¹ , Bjørg Kristine Hundal ² , Gerd Marit Berge ¹ , Brett Glencross ³ , David Huyben ³ , Tor Gjølén ⁴ , Adriana Magalhaes Santos Andresen ⁴ , Grethe Bæverfjord ¹ , Erik Høglund ⁵ , Mark Powell ² , Marta Bou Mira ¹ , Chandrasekar Selvam ² , Tone-Kari Østbye ¹ , Nina Liland ² , Grethe Rosenlund ⁶ , Trygve Sigholt ⁷ , Ingunn Stubhaug ⁶ , Øystein Evensen ⁸ , Aleksei Krasnov ¹ og Turid Mørkøre ¹ ¹ Nofima, ² HI, ³ University of Stirling UK, ⁴ UiO, ⁵ NIVA, ⁶ Skretting ARC, ⁷ BioMAR, ⁸ NMBU	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi	<i>Dato:</i> 19. mai 2021
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 83
<i>Stikkord:</i> n-3, n-6, fettsyrer, atlantisk laks, stress, helse	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901282
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Hovedmålet med prosjektet har vært å skaffe til veie ny kunnskap om hvilke nivåer av fett og fettsyrer som kreves for å sikre produksjonen av en robust atlantisk laks i ulike livsfaser og under ulike produksjonsforhold. Resultater fra prosjektet viste at fôring med en planteoljerik diett i ferskvannsfasen bedret tilveksten til laksen, mens økende nivåer av EPA og DHA i fôret bedret tilveksten i sjøvannsfasen. Laks som var tilvent høyt nivå av planteoljer i fôret i ferskvannsfasen med god tilvekst, hadde ingen fordeler etter overføringen til sjøvann sammenlignet med en laks fôret høyere nivåer av marine oljer. Immunresponsen etter vaksinerings var lite påvirket av fettsyresammensetningen av dietten til laksen. Behovet for EPA og DHA, basert på vekstrespons under ideelle miljøforhold i tidlig sjøvannsfase, ble definert til 5 % - 7 % av totale fettsyrer i dietten, men i senere faser i merder i sjø under utfordrende miljøforhold kan dataene tyde på økt behov for disse fettsyrene for å opprettholde god helse og muskelkvalitet, da økende nivåer av EPA og DHA i fôret fra 10 g/kg til 35 g/kg (4-10 % av totale fettsyrer) bedret vekst, velferds- og helseindikatorer, muskelkvalitet og mineralstatus til laksen. Økt energinivå (fettinnivå) i fôret bedret veksten til laksen i tidlig sjøvannsfase, mens i seinere fase i merder i sjø førte lavere fettinnivå (økt proteinnivå) til bedret tilvekst. Økt energiinnhold i dietten økte ytelsen til laksen under hypoksisstress, men resulterte i mindre sunt tarmmikrobiom og hjertehelse og lavere mineral og sinknivå i helkropp. Genetisk seleksjon for høy kapasitet til syntese av EPA og DHA førte til redusert fettinnivå og økte nivåer av EPA og DHA i lever til laks fôret en diett rik på planteolje (bedret leverhelse). Forhøyet n-6 / n-3 ratio i fôret gav økt leverfett og etter hypoksisstress førte økt ratio til redusert kortisolrespons i plasma og økte nivåer av eikosanoidene PGE2 og PGD2 i leveren, men påvirket ikke sykdomsforløpet og uttrykk av gener relatert til immunrespons under AGD gjelleinfeksjon.	
<i>English summary:</i> Important research questions in this project have been to study whether n-3 fatty acids, n-6 fatty acids and/or n-6/n-3 ratio and fat level affects growth, nutrient utilisation, robustness and health, flesh quality of Atlantic salmon in different life phases and under different production conditions.	

Forord

Prosjektet er et resultat av fellesutlysning fra Norges forskningsråd og Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond i 2016: "Forskning for å frambringe kunnskap om laksens helse og velferd ved endret fettsyresammensetning i fôret.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	Faglig Bakgrunn	1
1.2	Prosjektets omfang	1
1.3	Prosjektorganisering (roller/ansvar: prosjektgruppe, styringsgruppe, andre?)	2
1.3.1	Referansegruppe	2
1.3.2	Samarbeidspartnerens kompetanse og roller	2
2	Problemstilling og formål	4
2.1	Prosjektets effektmål	4
2.2	Resultatmål/leveranser	4
2.2.1	Presentasjoner	4
2.2.2	Vitenskapelige artikler	5
2.2.3	Populærvitenskapelig artikkel	5
2.2.4	Artikler under arbeid	5
2.2.5	Presseoppslag	6
2.3	Administrative leveranser FHF	6
3	Prosjektgjennomføring	7
3.1	Material og metoder AP 1	7
3.1.1	Fiskeforsøk, dietter og prøvetaking	8
3.1.2	Vekst, fôrintaksparametere og beregning av fettsyreretensjon	9
3.1.3	Fettinnhold, fettsyresammensetning og kjemiske sammensetningsanalyser	9
3.1.4	Histologiske analyser og røntgenanalyser	10
3.1.5	Q-PCR analyse for CMS virusbelastning	10
3.1.6	Velferd og filetkvalitet	10
3.1.7	Statistikk	11
3.2	Material og metoder AP 2	11
3.2.1	Fiskeforsøk, dietter og prøvetaking	11
3.2.2	Stressforsøk og smitteforsøk med AGD	12
3.3	Material og metode AP 3	13
3.3.1	Fiskeforsøk, dietter og prøvetakingsinformasjon	13
3.3.2	Vaksinering og analyse av immunrespons	14
3.3.3	Vekstberegninger	15
3.3.4	Fettinnhold og fettsyrer	15
3.3.5	RNA ekstraksjon og microarray analyse	15
3.3.6	Statistikk	15
3.4	Material og metode AP 4	15
3.4.1	Fiskeforsøk, dietter og prøvetakingsinformasjon	15
3.4.2	Hypoksi-stress	17
3.4.3	Prøvetaking	17
3.4.4	Beregninger av vekst, kroppsindekser og fôrutnyttelse	18
3.4.5	Genuttrykk qPCR	18
3.4.6	Statistikk	18
4	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	19

4.1	Resultater og diskusjon AP 1	19
4.1.1	Vekst og fôrinntak	19
4.1.2	Fiskevelferd.....	20
4.1.3	Fett og fettsyresammensetning av helkropp og ulike vev	22
4.1.4	Estimert retensjon av fettsyrer i helkropp	25
4.1.5	Multivariat-og lineær regresjonsanalyse av fettsyresammensetning i ulike vev	25
4.1.6	Evaluering av histopatologi ved mikroskopi og røntgenanalyser.....	27
4.1.7	Filètkvalitet	29
4.1.8	Effekt av stress.....	30
4.1.9	Oppsummering av hovedresultater fra AP 1.....	33
4.2	AP 2 Resultater og diskusjon	33
4.2.1	Vekst.....	33
4.2.2	Fett og fettsyresammensetning av røde blodceller og lever fra laks i vekstforsøket	34
4.2.3	Stressrespons.....	36
4.2.4	Smitteforsøk med AGD.....	37
4.2.5	Oppsummering av hovedresultater AP 2	38
4.3	Resultat og diskusjon AP 3.....	38
4.3.1	Ferskvannsperiode: Vekst og totalt fettinnhold i helkropp og lever.....	38
4.3.2	Fettsyresammensetning av helkropp og lever	39
4.3.3	Sjøvannsperiode: Vekst og totalt fettinnhold i helkropp og lever	42
4.3.4	Fettsyresammensetning av helkropp og lever	43
4.3.5	Genuttrykk i lever	47
4.3.6	Effekter av genetisk bakgrunn og diett på immunrespons etter vaksinerings	48
4.3.7	Oppsummering av hovedresultater AP 3	51
4.4	Resultat og diskusjon AP 4.....	52
4.4.1	Fettnivå og n-3 i fôr og tilvekst.....	52
4.4.2	Helkroppssammensetning, retensjon av næringsstoff og fordøyelighet.....	52
4.4.3	Genuttrykk lever	55
4.4.4	Effekt av hypoksisstress på tilvekst, fôrutnyttelse og microbiota	57
4.4.5	Hypoksisstress og effekter på tarmmikrobiota.....	59
4.4.6	Oppsummering av hovedresultater AP 4	68
5	Hovedkonklusjoner	69
6	Hovedfunn	70
7	Referanser	71

1 Innledning

1.1 Faglig Bakgrunn

Begrenset tilgang på fiskeolje til bruk i laksefôr representerer en av de største utfordringene for videre vekst innen laksenæringen. Når nivået av marine oljer reduseres og erstattes med planteoljer i fiskefôret, endres fettsyresammensetningen i laksens vev og organer. Fettnivå og spesifikke fettsyrer spiller helt sentrale roller i en rekke biologiske prosesser, og endret sammensetning av fett kan påvirke både tilvekst, muskelkvalitet og helse. Prosjektet «Optihealth», har studert behovet for n-3 fettsyrer, samspill med fettnivået i fôret og n-6 fettsyrer for laksens helse, særlig under utfordrende miljøforhold. Rapporten «Fett for fiskehelse, FHF-901250 [1] belyste kunnskapsbehov relatert til betydningen av endret fettsyresammensetning i fôr for laksens helse, velferd og robusthet. Anbefalinger i denne rapporten danner grunnlaget for prioriterte forskningsområder i prosjektet.

Tidlig på 90-tallet bestod fôret til norsk oppdrettslaks av en protein/fett ratio på 3:2 og i det vesentlige av marine ingredienser, mens kommersielt fôr i dag har en protein/fett ratio på ca. 1:1 og 70 % planteingredienser [2]. Denne endringen i fôrsammensetning har resultert i økt mengde fett og pro-inflammatoriske n-6 fettsyrer og reduserte nivåer av de sunne n-3 fettsyrene, eikosapentaensyre (EPA) og dokosahexaensyre (DHA) i laksen [3]. I motsetning til de fleste marine arter har laks vist seg å ha evne til å elongere og desaturere den kortere α -linolensyren (ALA; 18:3n-3) til EPA og DHA, men kapasiteten er relativt begrenset [4-6]. Laksen har dermed behov for tilskudd av EPA og DHA i fôret [4, 5, 7-10]. En tidligere studie fra vår gruppe har vist en sammenheng mellom lavt EPA- og DHA-nivå i fôret i ferskvannsfasen og økt forekomst av fettakkumulering i lever og hjerte, tarmbetennelse og dødelighet i sjøfasen [3, 11]. I samsvar med dette, har flere studier vist at fettrike dietter med 70–80 % planteingredienser øker risikoen for utvikling av fettlever i atlantisk laks, spesielt ved lave vanntemperaturer [12, 13]. Forsøk har også indikert at fôrets innhold av n-6 fettsyrer kan påvirke behovet for n-3 fettsyrer [14]. Det er også vist at n-6 fettsyrer kan påvirke stressresponsen i fisk og utskillelse av stress-hormonet kortisol, som igjen kan være relatert til ratioen mellom langkjedede n-6 og n-3 fettsyrer i hjernen og påvirkning av den neuroendokrine stress-aksen [15, 16]. Følgelig kan dataene indikere mulighet for å opprettholde de positive helseeffektene av EPA og DHA, selv om innholdet av disse reduseres i fôret, dersom man samtidig reduserer n-6 fettsyrer nivået i fôret.

Utfordrende miljøforhold for fisken er en integrert del av havbruk, med transport og håndtering av fisk, avlusing, behandling for gjellesykdommen AGD etc. Imidlertid utføres de fleste fôringsforsøk under kontrollerte og stabile miljøforhold med minimal håndtering av fisken. Praktiske næringsbehov eller toleransenivåer må imidlertid defineres for å produsere en robust og sunn fisk som kan håndtere de utfordringer laksen møter i kommersiell akvakultur [3, 17].

Viktige forskningsspørsmål i dette prosjektet har vært å studere om n-3 fettsyrer, n-6 fettsyrer og/eller n-6/n-3 ratioen og fettnivå påvirker robusthet og helse til Atlantisk laks i ulike livsfaser og under ulike produksjonsbetingelser.

1.2 Prosjektets omfang

Prosjektperiode: 2017-2021

Totalt budsjett: NOK 18 760 000,-

Fra FHF NOK 17 310 000,-

Egenfinansiering partnere:

Skretting: NOK 700 000,-

BioMar: NOK 600 000,-

NIVA: NOK 150 000,-

NFR (tilleggsfinansiering): 2 toårige post doc stillinger tilknyttet prosjektet (ca. 4 mill).

Prosjektet har vært direkte sammenkoblet med to post-doc-prosjekt finansiert av Forskningsrådet (Forskningrådets projektnr. 267952). Det er også samarbeidet med prosjektet "Mørke flekker i laksefilet: Årsak til dannelse og tiltak som hemmer utvikling (EX-Spot)", (FHF-901487) for hensiktsmessig utnyttelse og analyser av prøvematerialet fra sjøforsøket. I tillegg har UiO bidratt med en stipendiat, og HI har bidratt med stipendiat med eksterne midler. En masterstudent fra Universitetet i Bodø har tatt masteroppgave i prosjektet i samarbeid med Ex-spot prosjektet (FHF 901487). Øystein Evensen NMBU, Veterinærhøgskolen ble tilknyttet prosjektet i slutfasen for å evaluere hjertehelse til laks (som egeninnsats NMBU og i samarbeid med EX-Spot).

1.3 Prosjektorganisering (roller/ansvar: prosjektgruppe, styringsgruppe, andre?)

Nofima, som juridisk enhet, har koordinert prosjektet med prosjektleder Bente Ruyter som ansvarlig for prosjektadministrasjonen. Prosjektledelsen har bestått av en representant fra hver av samarbeidspartnerne; Nofima, HI, UoS, BioMar, Skretting ARC, NIVA og UiO.

1.3.1 Referansegruppe

FHF oppnevnte følgende referansegruppe med representanter fra havbruksnæringen;

- Kåre Gruven, Norway Royal Salmon (NRS) AS - Fagsjef fiskefôr
- Ragna Heggebø (historisk tilknytning), Mowi ASA - Group Manager and Fish Performance
- Tor Eirik Homme, Grieg Seafood ASA - Director Feed and Nutrition, CSO
- Geir Magne Knutsen, Bremnes Seashore AS - Oppdrettssjef

Referansegruppen har vært invitert til oppstartsmøte, sluttmøte og 1-2 årlige møter med arbeidspakkelederne for å diskutere prosjektplaner og å gi innspill/diskutere forskningsstrategien.

1.3.2 Samarbeidspartnerne kompetanse og roller

Nofimas rolle i prosjektet har vært som prosjektleder og har videre bidratt med fiskefôrproduksjon, fiskefôringsforsøk (AP 1 og AP 3) og analyser. Nøkkelpersoner involvert: Professor Bente Ruyter: Prosjektleder; kompetanse innen fiskeernæring, lipidmetabolisme og essensielle fettsyrebehov. Dr. Gerd Marit Berge, fiskeernæring, fiskefôringsforsøk. Dr. Tone Kari Østbye og Dr. Marta Bou, lipidmetabolisme, celle- og molekylærbiologi, Dr. Aleksei Krasnov, transkripsjonsanalyser,

bioinformatikk. Dr. Grethe Bæverfjord som ansvarlig for røntgenanalyser og mikroskopianalyser av ulike vev. Dr. Esmail Lutfi, post doc i prosjektet (finansiert av NFR). Dr. Turid Mørkøre, muskelkvalitet.

HI's rolle i prosjektet har hatt sentral rolle i fiskeforsøk (AP 1 og AP 2) og analyser. Nøkkelpersoner involvert: Dr. Ninni Sissener, med bred erfaring innen fiskeernæring, fôr sikkerhet og lipid metabolisme. Dr. Nina Liland og Bjørg Hundal har vært henholdsvis post doc og stipendiat i prosjektet (finansiert av NFR). Chandrasekar Selvam ble også tilknyttet prosjektet som stipendiat, men finansiert av stipend fra India.

Institute of Aquaculture, University of Stirling (UoS), har vært ansvarlig for AP 4. Hovedkompetanse personer involvert: Professor Brett. D. Glencross med bred erfaring innen fiskeernæring, fiskefôringforsøk, råvarevurdering, lipidmetabolisme og essensielle fettsyrer. Dr. David Huyben har bidratt med bred erfaring innen fiskeforsøk og microbiotaanalyser.

SkrettingARC er den sentrale FoU-enheten i det store fôrselskapet Skretting. Nøkkelpersoner involvert: Dr. Grethe Rosenlund og Dr. Ingunn Stubhaug: ansvarlig for fiskeforsøk og fiskefôr AP 2 og deltager i AP 1.

BioMar har bidratt med kompetanse innen fiskefôrteknologi og fiskeernæring og fiskehelseaspekter (ansvarlig for å produsere fôr AP 1, og delaktig i AP 3). Hovedkompetanse personer involvert: Dr. Trygve Sigholt (diettsammensetning, fôringredienser, ernæring).

NIVA: Nøkkelpersoner involvert: Dr. Erik Høglund har kompetanse innen stressmekanismer innen fisk på nevroendokrint nivå (ansvarlig for stressforsøk AP 2). Professor Mark Powell har professor II-stilling ved Universitetet i Bergen (UiB, senere ansatt ved HI) i fiskehelse, og arbeider med gjelleinfeksjoner (ansvarlig for AGD forsøk AP 2).

Universitetet i Oslo (UiO), har bidratt med til aspekter knyttet til fiskehelse og sykdom og har ledet arbeidet med immunrespons i WP-3. Resistens mot virusinfeksjoner, cytokinuttrykk ved immunstimulering, TLR-uttrykk og aktivering. Hovedkompetanseperson involvert: Professor Tor GjØen (virusinfeksjoner i fisk, immunitet, in vitro-modeller).

Norges Miljø- og Biovitenskapelige universitet (NMBU): Professor Øystein Evensen har kartlagt eventuell forekomst av hjertepatologi og forekomst av PMCV virus som forårsaker CMS i laks fra sjøvannsforsøket ved Gildeskål Havbruksstasjon (AP 4).

2 Problemstilling og formål

2.1 Prosjektets effektmål

Atlantisk laks er den dominerende arten i norsk akvakultur (\approx 1,5 mill. tonn per år) og fôringredienser er en viktig faktor for bærekraftig produksjon i lakseoppdrett. Hovedingrediensene i laksefôr var tidligere hovedsakelig fiskemel og fiskeolje, mens disse ingrediensene utgjør nå kun ca. 30 %. Dette prosjektet har bidratt med ny kunnskap som gjør det mulig å produsere laks med tilgjengelige nivåer av marine ingredienser uten å gå på akkord med fiskehelse og fiskevelferd. Prosjektet har bidratt med ny kunnskap om behov og utnyttelse av fett og fettsyrer under ulike oppdrettsforhold og livsstadier. Kunnskap fra prosjektet er allerede implementert ute i industrien.

2.2 Resultatmål/leveranser

2.2.1 Presentasjoner

- Chandrasekar Selvam, Mark D. Powell, Nina S. Liland, Grethe Rosenlund, Nini H. Sissener (2019). *Impact of dietary level and ratio of n3/n6 on disease progression, physiological response and inflammation in Atlantic salmon challenged with amoebic gill disease (AGD). Asian-Pacific Aquaculture, Chennai Tamil Nadu, India, June 19th-21st.*
- Lutfi E, Berge GM, Bou M, Østbye TK, Sigholt T and Ruyter B (2018). *Dietary influence of n-3 fatty acids on performance and lipid metabolism in three Atlantic salmon genetic groups selected by divergent Δ -6 desaturase capacity. Oral presentation at: 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding; June 3-7; Las Palmas (Spain).*
- Bente Ruyter (2019). The oils of the millennium feed meet the salmon's need. Aqua Nor seminar: Where salmon biology meets new technology, Trondheim.
- Bente Ruyter (2020). Latest Research on N-3 and Fish Performance, AquaForum, Puerto Mont, Chile.
- Resultater fra de ulike arbeidspakkene i prosjektet er presentert ved 1-2 årlige dialogmøter med industrien.
- David Huyben, Chessor Matthew, Marta Bou, Bente Ruyter, Douglas Tocher, Brett Glencross (2020). The Theory of Relativity – As Applied to Essential Fatty Acid Requirements in Atlantic salmon. Poster presentation European Aquaculture Society. [EAS Congress 2020 now in an innovative virtual format | October 04-07 \(eas2020.com\)](https://www.eas2020.com/)
- Huyben, D., Glencross, B. (October 2019). Optimising levels of dietary fatty acids and lipids of Atlantic salmon under normoxic and hypoxic conditions. Aquaculture Europe Conference, Berlin, Germany. (Oral).
- Huyben, D., Roehe, B., Glencross, B. (November 2018). Impact of dietary lipids and dissolved oxygen on gut microbiota in Atlantic salmon. ARCH-UK Fish and Shellfish Microbiome Workshop, Aberdeen, UK. (Oral and poster).

2.2.2 Vitenskapelige artikler

- Bjørg Kristine Hundal, Nina S. Liland, Grethe Rosenlund, Marta Bou, Ingunn Stubhaug, Nini H. Sissener (2021). *Increasing dietary n-6 fatty acids while keeping n-3 fatty acids stable decreases EPA in polar lipids of farmed Atlantic salmon (Salmo salar)*. *British Journal of Nutrition*, 125, 10–25.
- Bjørg Kristine Hundal, Nina S. Liland, Grethe Rosenlund, Erik Høglund, Pedro Araujo, Ingunn Stubhaug, Nini H. Sissener (2021). *Increasing the dietary n-6/n-3 ratio alters the hepatic eicosanoid production after acute stress in Atlantic salmon (Salmo salar)*. *Aquaculture*, Volume 534, 736272.
- David Huyben, Teresa Grobler, Chessor Matthew, Marta Bou, Bente Ruyter, Brett Glencross (2021). *Requirement for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by Atlantic salmon is relative to the dietary lipid level*, *Aquaculture*, Volume 531, 735805, ISSN 0044-8486.
- Huyben David, Roehe Beeke K., Bekaert Michaël, Ruyter Bente, Glencross Brett (2020). *Dietary Lipid:Protein Ratio and n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Alters the Gut Microbiome of Atlantic Salmon Under Hypoxic and Normoxic Conditions*. *Frontiers in Microbiology*, VOLUME=11, PAGES=3385 DOI=10.3389/fmicb.2020.589898.
- David Huyben, Chessor Matthew, Pedro Muñoz-Lopez, Bente Ruyter, Brett Glencross (2021).
- Hypoxia does not change responses to dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, but rather attenuates dietary energy demand by Atlantic salmon. *Manuscript submitted to Aquaculture Nutrition*.
- Adriana Magalhães Santos Andresen, Esmail Lutfi, Bente Ruyter, Gerd Berge, Tor Gjølven (2019). *Interaction between dietary fatty acids and genotype on immune response in Atlantic salmon (Salmo salar) after vaccination: A transcriptome study*. *PLOS one*. doi.org/10.1371.
- Selvam Chandrasekar, Mark D Powell, Nina S. Liland, Grethe Rosenlund, Nini H Sissener. *Impact of dietary level and ratio of n-6 and n-3 fatty acids on disease progression and expression of immune and inflammatory markers in Atlantic salmon (Salmo salar) challenged with Paramoeba perurans*. *Submitted to Aquaculture (February 2021)*.
- Huyben, D., Matthew, C., Muñoz-Lopez, P., Ruyter, B., Glencross, B. (in review). *Hypoxia does not change responses to dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, but rather reduces dietary energy demand by Atlantic salmon*. *Accepted Aquaculture Nutrition*.

2.2.3 Populærvitenskapelig artikkel

<https://nofima.no/nyhet/2019/09/omega-3-nivaet-i-foret-er-viktig-for-laksens-velferd/>

2.2.4 Artikler under arbeid

- Lutfi E, Berge GM, Bæverfjord G, Sigholt T, Bou M, Sveen L, Mørkøre T, Evensen Ø, Sissener N, Rosenlund G, Østbye TK, and Ruyter B. *Increasing dietary levels of the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA, improve growth, welfare, health, and fillet quality in Atlantic salmon (Salmo salar L)*. *Planned submission in April-May 2021 to the British Journal of Nutrition*.
- Lutfi E, Berge GM, Bou M, Østbye TK, Sigholt T and Ruyter B. *Dietary influence of EPA and DHA on fish growth and tissues fatty acid composition in three Atlantic salmon genetic groups selected by divergent Δ -6 desaturase capacity*. *Manuscript in prep*.
- Lutfi E, Berge GM, Bou M, Østbye TK, Sigholt T and Ruyter B. *Breeding selection for Δ -6 desaturase capacity improves hepatic n-3 enrichment and fish robustness in Atlantic salmon: a metabolomic and transcriptomic approach*. *Manuscript in prep*.

2.2.5 Presseoppslag

- **Aftenposten**, Joakim Lund, Jeg er redd jeg har dårlige nyheter. 27.08.2019
- **NRK P2 Dagsnytt 18**, 27.08.2019, (<https://radio.nrk.no/serie/dagsnytt-atten/sesong/201908/NMAG03017019>)
- **Tekfisk**, Camilla Aadland, Laksen fikk fôr med hundre prosent fiskeolje. Da skjedde dette. Laksen hadde bedre vekst, bedre fiskevelferd, bedre kvalitet og ble mindre syk. 28. august 2019. <https://www.tekfisk.no/havbruk/laksen-fikk-f-r-med-hundre-prosent-fiskeolje-da-skjedde-dette-/2-1-661559>
- **Intrafish**, Farmed salmon fed with fish oil are significantly healthier 06.09.2019., <https://www.intrafish.com/aquaculture/study-farmed-salmon-fed-with-fish-oil-are-significantly-healthier/2-1-665145>

2.3 Administrative leveranser FHF

- 01.03.17 Artikkel til Nofima og Nifes sine hjemmesider med informasjon om prosjektet
- 22.08.17 Referat fra møte med referansegruppen og prosjektgruppen
- 15.12.17 Statusrapport FHF
- 31.06.18 Referat fra møte med referansegruppen og prosjektgruppen
- 01.12.18 Artikkel til Nofima og HI sine hjemmesider
- 15.12.18 Faktaark
- 04.02.18 Statusrapport FHF
- 25.06.18 Referat fra møte med referansegruppen
- 04.02.19 Statusrapport FHF
- 31.03.21 Sluttrapport FHF

3 Prosjektgjennomføring

Samarbeidspartnerne i Optihealth har bidratt med bred kompetanse og erfaring innen feltene fiskefôrproduksjon og -teknologi (BioMar, Skretting ARC, Nofima fôrteknologi), ernæring, kvalitet, fiskehelse og velferd og i å utføre små/ mellomstore og store fiskefôringsforsøk (Nofima, HI, University of Stirling (UoS), BioMar, Skretting ARC), samt at de innehar kompetanse innen molekylære, kjemiske, celleforsøk og fysiologiske teknikker for å evaluere fiskehelse og ytelse (Nofima, HI, UiOS), NIVA, Universitetet i Oslo, NMBU.

Prosjektet er satt sammen av følgende 4 arbeidspakker:

AP 1

Ledelse: Nofima

Partnere: HI, NMBU, Skretting ARC og Biomar

Her er det i 2017–2019 gjennomført et fôringsforsøk med mål å etablere hvilke behov atlantisk laks har for EPA og DHA i fôret i sjøvannsfasen (i kombinasjon med høye og lave fettnivåer) under utfordringer som laksen normalt møter under kommersielle produksjonsforhold.

AP 2

Ledelse: HI

Partnere: NIVA, Skretting ARC og Nofima

I AP 2 er det i 2017–2019 gjennomført fôringsforsøk i kar på land hvor det sentrale forskningsspørsmålet er om n-6-fettsyrer og/eller n-6/n-3-ratio påvirker EPA- og DHA-behov og robusthet av atlantisk laks inkludert stressrespons og mottakelighet for gjelleinfeksjoner.

AP 3

Ledelse: Nofima

Partnere: BioMar, Universitetet i Oslo

I AP 3 er det i 2017 gjennomført et fôringsforsøk i kar på land hvor det studeres hvordan kapasiteten til å produsere EPA og DHA i atlantisk laks påvirkes av ratioen mellom ALA, EPA og DHA i fôret. Videre studeres samspill mellom genetisk bakgrunn til laksen, immunrespons og n-3-fettsyremetabolisme.

AP 4

Ledelse: University of Stirling

Partnere: HI og Nofima

I denne arbeidspakken er det i 2018-2019 gjennomført et fôringsforsøk i Stirling hvor man har undersøkt om det er mulig å opprettholde fiskehelse med reduserte nivåer av EPA + DHA i fôret dersom man endrer nivået av ALA eller total lipid. Et viktig spørsmål vil være om oppdrettsmiljø (hypoksi), fetttyrer i fôret og lipidnivåer påvirker laksen robusthet, inkludert kronisk stress (hypoksi).

3.1 Material og metoder AP 1

Fôringsforsøk i merder i sjø med mål å bestemme behovet for fettmengde, EPA og DHA under utfordrende produksjonsforhold.

3.1.1 Fiskeforsøk, dietter og prøvetaking

Atlantehavslaks postsmolt, fra MOWI (Glomfjord, Meløy), med en gjennomsnittsvekt på 115 g ble overført til Gildeskål Forskningsstasjon (GIFAS). Fram til forsøksstart ble fisken akklimatisert ved GIFAS og fôret kommersielt BioMar fôr fram til en størrelse på 275 g. Deretter ble forsøksfisken tilfeldig fordelt i 15, 125 m³ merder (5x5x5 m), 190 fisk per merd. Fôringsforsøket ble gjennomført fra oktober 2017 til januar 2019. Laksen ble fôret fem eksperimentelle dietter i triplikat (10, 13, 13 lavfett, 16 og 35 g EPA+DHA/kg fôr) (EPA:DHA-forholdet i fôret var ca. 1:1). Laks ble fôret ad-libitum en gang (høst og vinter) eller to ganger (vår og sommer) om dagen. Tre forskjellige pelletstørrelser (4, 6 og 9 mm) med økende fettnivå ble produsert, (5 batcher). Tabell 1 viser diettformulering og kjemisk sammensetning for siste periode av studien for 9 mm fôret. Alle dietter var isoenergetiske (26 MJ/kg) med unntak av lavfettgruppen (25 MJ/kg). Fettsyresammensetningen av diettene vises i Tabell 2 (9 mm pellet).

Det ble tatt ut 10 fisk til helkroppsprøver ved start. Disse ble fryst ved -40 °C. Etter 3 måneder (slutt av 4 mm fôrperiode) og 6 måneder (slutt av 6 mm fôrperiode), ble fisken bulkveid og det ble tatt ut helkroppsprøver fra alle merder. Prøvene ble frosset ved -40 °C. Ved avslutning av forsøket ble det registrert individvekter av all fisk i merdene. 15 fisk per merd ble tatt ut til biometriske målinger, kvalitetsanalyser og velferdsscoreanalyser. Prøver fra helkropp, lever, skinn, midttarm, baktarm og norsk kvalitetssnitt (NKS) ble frosset ned ved -80 °C. Videre ble prøver av lever, skinn, midttarm, baktarm og hjerte (inkludert atrium og ventrikkel) fiksert i 10 % fosfatbufret formalin og lagret ved 4 °C. Prøver fra de samme vevene ble også tilsatt RNAlater (Qiagen Nordic, Norge). I tillegg ble fôrprøver fra alle fôrpartier frosset ved -40 °C.

Tabell 1 Diettformulering og kjemisk sammensetning av forsøksfôr (9 mm – fra september 2018 til januar 2019)

Formulering	EPA+DHA nivåer i fôr (%)				
	1,0	1,3	1,3L	1,6	3,5
Rapsolje ¹	31,03	29,33	25,11	27,48	16,88
Guarmel ²	14,00	14,00	14,47	14,00	14,00
Soya proteinkonsentrat	11,82	11,98	8,00	12,20	12,65
Hvete ³	10,95	10,95	13,78	10,95	10,95
Fiskeolje ⁴	4,42	6,08	5,90	7,88	18,21
Hvetegluten ⁵	7,82	7,72	13,94	7,57	6,50
Fiskemel ⁶	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Maisgluten ⁷	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Erteprotein ⁸	5,00	5,00	4,31	5,00	6,00
Mono-kalsium fosfat	1,29	1,29	1,30	1,28	1,27
Premiks ⁹	1,58	1,58	1,50	1,58	1,58
Aminosyrer ¹⁰	0,99	0,99	0,99	0,98	0,90
Pigment, 20 %	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
Vann	1,07	1,07	0,67	1,06	1,03
Kjemisk sammensetning					
Energi (MJ/kg)	26,18	26,18	25,45	26,17	26,13
Protein (g/100g, %)	33,43	33,43	36,10	33,44	33,48
Fett (g/100g, %)	38,68	38,65	34,49	38,61	38,43
Aske (g/100g, %)	4,36	4,37	4,20	4,38	4,43

Opprinnelsesland: ¹Danmark. ²India. ³Danmark. ⁴Peru/Danmark. ⁵EU. ⁶Peru/Danmark. ⁷Ukraina. ⁸Kina. ⁹Sverige. ¹⁰Tyskland/Korea/Kina

Tabell 2 Fettsyresammensetning av forsøksfôrene (% av totale fettsyrer) (9 mm)

	EPA+DHA nivåer i fôr (%)				
	1,0	1,3	1,3L	1,6	3,5
Σ SFA ¹	12,6	13,1	13,8	13,3	17,0
Σ MUFA ²	53,2	53,7	52,8	53,1	48,8
Σ n-6 ³	20,2	19,0	18,9	17,2	13,1
EPA	1,5	2,0	2,2	2,4	5,2
DHA	1,4	1,8	1,9	2,3	5,0
Σ n-3 ⁴	11,5	12,5	12,7	13,3	17,2
Σ EPA & DHA	2,8	3,8	4,1	4,7	10,2

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0, 24:0. ²Inkluderer 16:1 n-5, 16:1n-9, 17:1n-7, 18:1n-11, 20:1 n-7, 22:1 n-7,

³Inkluderer 18:3 n-6. ⁴Inkluderer 20:3 n-3

3.1.2 Vekst, fôrintaksparametere og beregning av fettsyreretensjon

Fiskevekt ble registrert og vekstratene ble beregnet som følger, basert på gjennomsnittlige verdier per merd:

$$\text{Spesifikk vekstrate (SGR)} = (\ln W_1 - \ln W_0) / (t_1 - t_0) \times 100$$

$$\text{Termisk vekst koeffisient (TGC)} = (W_1^{1/3} - W_0^{1/3}) \times 1000 / d^\circ;$$

hvor W_0 er startvekt (g) og W_1 er sluttvekt (g), henholdsvis t_1 og t_2 , og d° er summen av døgngader.

Fôrutnyttelse (FCR) er basert på registrert fôrintak og biomasse økning per merd og beregnet som følger:

$$\text{FCR} = \text{fôr spist (g)} / \text{biomasse vektøkning (g)}$$

$$\text{Kondisjonsfaktor (CF)} = (\text{kroppsvekt (g)}) / (\text{fiskens gaffellengde (cm)})^3 \times 100$$

Fettsyreretensjon ble beregnet per merd i 3 fôringsperioder (P1, P2 og P3) i henhold til følgende generelle formel:

$$\text{Fettsyreretensjon} = [(FB \times N_1) - (IB \times N_0)] / (\text{fôrintak} \times N_{\text{diett}})^{-1} \times 100;$$

hvor FB og IB refererer til slutt (F) og start (I) biomasse og N er konsentrasjonen av fettsyrer i fisk (hvor 1 er slutt og 0 start prøvetaking dager) eller diett. Den endelige biomassen ble korrigert for antall døde i alle eksperimentelle perioder.

3.1.3 Fettinnhold, fettsyresammensetning og kjemiske sammensetningsanalyser

Totallipid og fettsyresammensetning ble analysert i fôr, helkropp, muskel (NQC), lever, skinn, midttarm og baktarm etter metoder beskrevet av Folch et al. [18] og Mason et al. [19]. Kjemisk sammensetning av helkropp ble analysert som beskrevet [20].

3.1.4 Histologiske analyser og røntgenanalyser

Vevsprøver ble dehydrert i etanol, og støpt inn i parafin i henhold til standard histologiske teknikker [21]. Vevssnitt av hjerte, lever, midttarm og baktarm med ca. 2-4 mm tykkelse ble farget med hematoksylin og eosin (H&E) og vevsnett av skinn ble farget med alcianblue/periodic-acid-Schiff (AB/PAS). Vevssnittene ble senere skannet (Aperio Scan Scope AT Turbo slice scanner) og digitale bilder ble evaluert blindt (Aperio Image Scope v12.4, FastStone Image Viewer 7.0). Totalt 50-60 prøver per vev ble undersøkt (3-5 prøver per merd). Leverprøver ble undersøkt for grad av patologisk steatose ved hjelp av en semi-kvantitativ scoringsskala fra 1 til 5, hvor 1 representerer liten grad av vakuolisering og 5 høyt antall intracytoplasmatiske mikro- og makrovesikler. Videre, for prøver fra midttarm og baktarm, ble en enkel histologisk evaluering benyttet til å beskrive generelle morfologiske egenskaper som folding av tarmslimhinnen og vakuolisering av enterocytter. Hjertet (atrium/ventrikel) ble undersøkt for eventuelle histopatologiske endringer som beskrevet [22, 23]. Skinn ble evaluert ved hjelp av en kunstig intelligens modell (Aiforia, Aiforia Technologies Oy) opplært til å identifisere endringer i antall mucusceller, tykkelse av dermis og epidermis, bindevev, pigmentering, og skjell. Før røntgenanalysen ble fisk filètert, og ryggbein ble røntgenfotografert ved Nofimas røntgenlaboratorium på Sunndalsøra. De resulterende bildene ble undersøkt, rettet mot identifisering og klassifisering av vevspatologi. Antall undersøkte prøver var 22-25 per diett.

3.1.5 Q-PCR analyse for CMS virusbelastning

Hjerteprøver ble analysert med LightCycler 2.0-instrument (Roche) som beskrevet av Haugland [23]. Primere som ble benyttet var følgende; PMCV-F (5'-ACACCAGGTGAC CGAAAAG-3'), PMCV-R (5'-TCCAGTGCCTTGATGTCTG-3' b-actin F (5'-CCAGTCCTGCTCACTGAGGC-3') og b-actin R (5'-GGTCTCAAACATGATCTGGGTCA-3'). Reaksjonsforholdene inkluderte inkubasjon ved 50 °C i 2 min og aktivering av hot-start polymerase ved 95 °C i 2 min, etterfulgt av 40 sykluser ved 95 °C i 15 s, primer annealing i 15 s, og forlengelse i 1 min ved 60 °C. Smeltekurveanalyse ble utført for å bekrefte dannelsen av de forventede PCR-produktene.

3.1.6 Velferd og filetkvalitet

Fisk ble evaluert for eventuelle ytre synlige skader (øyekatarakt, hudlesjoner, snute-, skjell- og finneskader) og intern helsescore (melaninflekker i fettvev- og hjerte, hjerteform, mage- og tarmbetennelse, og fettakkumulering i lever). Hver av velferdsindikatorene fikk en score mellom 0 og 3 (ytre skader) eller 0 og 4 (intern helsescore), hvor lav verdi representerer en god og høy verdi en dårlig tilstand. Eksterne og interne evalueringer ble utført av samme personer (2 stk). I tillegg ble scorene fra ytre og indre indikatorer kartlagt ved bruk av radarplott, og det resulterende arealet ble beregnet og brukt som en oppsummert indeks (ekstern velferdsindeks, EWI og intern velferdsindeks, IWI), i henhold til den generelle formelen:

$$EWI \text{ eller } IWI = 1/2 \times (A \times B + B \times C + \dots + C \times A) \times s \left((360 / n \times \pi) / 180 \right)$$

Store bokstaver (A,B,C++) representerer hver av velferdsindikatorene og "n" er antall fisk inkludert i evalueringen.

Filetkvalitetsanalyser inkluderte filetfarge fra fremre og bakre deler av fileten (visuell vurdering, SalmoFan fargescore), antall melaninflekker og væsketap etter frysing og tining ble analysert som beskrevet av Mørkøre et al. [24].

3.1.7 Statistikk

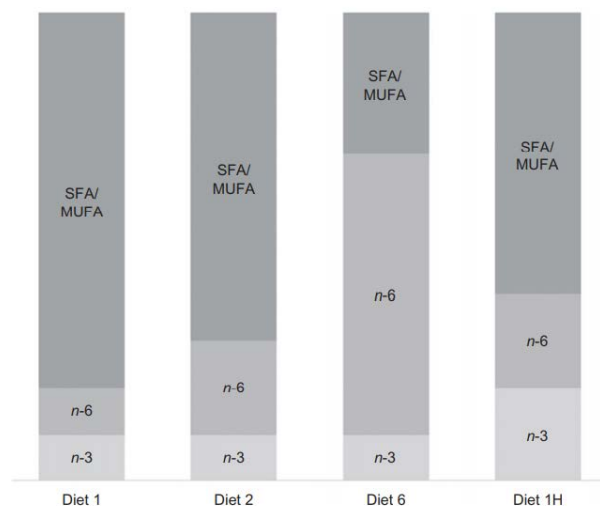
Forskjeller mellom diettbehandlinger ble analysert ved hjelp av GraphPad Prism 8 (La Jolla, USA, www.graphpad.com) og JMP® programversjon 11.2.1 (SAS Institute Inc.). Statistisk signifikans ble analysert med enveis variansanalyse (enveis ANOVA), etterfulgt av Tukey HSD *post-hoc* test. Når data ikke fulgte en normalfordelingskurve, ble en ikke-parametrisk Kruskal-Wallis-test benyttet, etterfulgt av Dunns sammenligningstest. Forskjellene ble vurdert som statistisk signifikante ved $P < 0,05$. Merd ble brukt som eksperimentell enhet ($n=3$). I tillegg ble de relative fettsyresammensetningsdataene for laksevev analysert ved hjelp av programvaren Unscrambler® X, versjon 10.3 (CAMO). En multivariat komponentanalyse (MPCA) ble utført for hver datamatrise for den relative fettsyresammensetningen. Videre ble lineære regresjonsmodeller brukt til å evaluere forholdet mellom fettsyrer i vev, filet kvalitet, og EPA + DHA-nivåer i fôret.

3.2 Material og metoder AP 2

Fôringsforsøk i kar på land hvor det studeres om $n-6$ -fettsyrer og / eller $n-6/n-3$ -ratio påvirker EPA- og DHA-behovet, stressrespons og AGD mottakelighet.

3.2.1 Fiskeforsøk, dietter og prøvetaking

Det ble gjennomført et fôringsforsøk i saltvannsfasen der Atlantisk laks ble gitt fôr med ulikt forhold mellom $n-6$ og $n-3$ fettsyrer ($n-6/n-3$ ratioer på 1, 2 og 6) (Figur 1). Tre dietter hadde samme innhold av EPA + DHA og samme total mengde $n-3$ fettsyrer, men med økende innhold av $n-6$ fettsyrer slik at $n-6/n-3$ ratioen økte (navngitt diett 1, 2 og 6 etter $n-6/n-3$ ratioen). Det var i tillegg inkludert en diett med dobbelt så mye $n-3$ fettsyrer og $n-6/n-3$ ratio på 1 (diett 1H). Formålet var å teste om behovet for EPA og DHA kunne påvirkes av fôrets $n-6/n-3$ ratio og/eller det totale innholdet av $n-6$ fettsyrer, og hvordan ulike vev og fett-typer ble påvirket.



Figur 1 Oversikt over fettsyresammensetning i forsøksfôrene. De første tre fôrene hadde samme innhold av $n-3$ fettsyrer, men økende innhold av $n-6$ fettsyrer (og dermed økende $n-6/n-3$ ratio), mens det fjerde fôret hadde dobbelt så høyt innhold av $n-3$ fettsyrer, men samme $n-6/n-3$ ratio som fôr 1

Alle fire fôrene hadde samme proteiningredienser, inkludert 10 % fiskemel av den totale resepten, og det var kun oljeblandingen som varierte (Tabell 3). Fôret med $n-6/n-3$ ratio på 6,0 var inkludert for å være sikker på at eventuelle $n-6$ -effekter ble synlige, mens de andre fôrene hadde mer kommersielt relevante ratioer.

Tabell 3 Fôrsammensetning (fra Hundal et al. [25])

	Diet 1	Diet 2	Diet 6	Diet 1H
Wheat	7.2	7.2	7.2	7.2
Soya protein concentrate	28.2	28.2	28.2	28.2
Sunflower meal	6.0	6.0	6.0	6.0
Wheat gluten	18.0	18.0	18.0	18.0
Faba beans, dehulled	2.0	2.0	2.0	2.0
FM, North Atlantic	10.0	10.0	10.0	10.0
Linseed oil	1.2	1.2	1.3	2.7
Sunflower oil	0.6	4.8	19.3	5.1
Olive oil	12.2	7.7	0.0	1.6
Coconut oil	0.7	1.0	0.3	0.0
FO, North Atlantic	0.0	0.0	3.9	4.9
FO, Capelin	10.0	10.0	0.0	10.5
Premixes	3.7	3.7	3.7	3.7
Yttrium	0.1	0.1	0.1	0.1

FM, fishmeal; FO, fish oil.

* Diet 1/Diet 2/Diet 6/Diet 1H, diet codes according to dietary *n-6:n-3* fatty acid ratio. The final diet is labelled 1H due to its higher absolute contents of *n-3* and *n-6* fatty acids compared with the first diet.

Den analyserte fettsyresammensetningen i fôrene lå tett opp til planlagte verdier, dog med noe høyere *n-6/n-3* ratioer på 1,4, 2,4, 6,1 og 1,2 (Tabell 4). Det planlagte designet ble allikevel vurdert som godt ivaretatt med disse forsøksfôrene.

Tabell 4 Fettsyresammensetning i fôrene, oppgitt i % av totale fettsyrer (fra Hundal et al. [25])

	Diet 1	Diet 2	Diet 6	Diet 1H
Proximate composition (g/100 g)				
Lipids	29.8	30.0	28.6	28.8
Protein	44.5	44.1	44.5	44.8
Ash	5.1	5.2	5.5	5.4
FA (% of total FA)				
ΣSFA	19.7	19.7	16.6	19.8
12:0	1.3	1.7	0.4	0.1
14:0	3.3	3.5	1.5	4.4
16:0	11.2	10.4	9.4	11.5
18:0	2.5	2.6	3.7	2.7
ΣMUFA	59.4	52.2	27.3	43.5
16:1 <i>n-7</i>	3.8	3.7	1.5	5.1
18:1 <i>n-7</i>	2.2	2.0	1.1	2.0
18:1 <i>n-9</i>	37.1	30.1	23.1	18.2
20:1 <i>n-9</i>	6.4	6.4	0.7	7.0
22:1 <i>n-11</i>	7.7	7.7	0.7	8.5
Σ <i>n-6</i>	11.1	18.2	46.9	18.4
18:2 <i>n-6</i>	10.8	17.9	46.7	17.6
20:4 <i>n-6</i> (ARA)	0.1	0.1	0.1	0.2
Σ <i>n-3</i>	7.7	7.7	7.8	15.1
18:3 <i>n-3</i>	2.9	2.9	3.1	5.7
20:5 <i>n-3</i> (EPA)	2.4	2.4	2.0	4.4
22:6 <i>n-3</i> (DHA)	1.5	1.5	1.8	3.1
EPA + DHA	3.9	3.9	3.8	7.5
ΣPUFA	20.9	28.1	56.1	36.8
<i>n-6:n-3</i>	1.4	2.4	6.1	1.2
Total FA (g/100 g diet)	27.1	27.3	29.7	25.5

3.2.2 Stressforsøk og smitteforsøk med AGD

Først ble det gjennomført en pre-fôringsperiode med forsøksfôrene på 3 mnd., slik at fettsyresammensetningen i vevene til all fisken skulle gjenspeile fôrene. Deretter ble tre ulike forsøk gjennomført med denne fisken; et 12-ukers vekstforsøk (triplikate kar), et stress-forsøk og et smitteforsøk med AGD. Stressforsøket ble gjennomført med de fire fôrgruppene i triplikate, både med gjentatt/kronisk stress og ustresst kontroll, totalt 24 kar i 4 uker, alle karene ble utsatt for akutt stress i forbindelse med sluttuttak, og prøver ble tatt før akutt stress, 1 time etter og 24 timer etter). Gjentatt

stress bestod av senkning av oksygenivå til 35 % metning tre ganger per uke, ved å slå av vannstrøm inn i karet, og starte den igjen når oksygenivå hadde gått ned til 35 % (etter ca. 30 min).

For smitteforsøk med AGD ble fisk transportert til ILAB i Bergen. Forsøket ble gjennomført med de fire fôrgruppene som ble smittet i triplikate kar, samt et usmittet kontrollkar per fôr, totalt 16 kar i 6 uker), og ukentlige uttak ble gjennomført. Startvekt var ~300 g. Fisk fra hver av diettgruppene ble smittet med en klonal kultur av *Paramoeba perurans* ved en konsentrasjon på 1000 celler/L. Utviklingen av sykdommen ble så fulgt, med prøveuttak og scoring av gjeller, både før smitte og ukentlig i fem uker etter smitte.

Alle data fra AP 2 er publisert/under publisering, og det henvises til artiklene for detaljerte metodebeskrivelser, statistikk osv (Hundal et al. 2020a [25], Hundal et al. 2020b [26], Selvam et al., submitted).

3.3 Material og metode AP 3

Fôringsforsøk i kar på land hvor kapasiteten til å produsere EPA og DHA og immunrespons studeres i laks med ulik genetisk bakgrunn og fôret ulike n-3 fettsyrenivåer.

3.3.1 Fiskeforsøk, dietter og prøvetakingsinformasjon

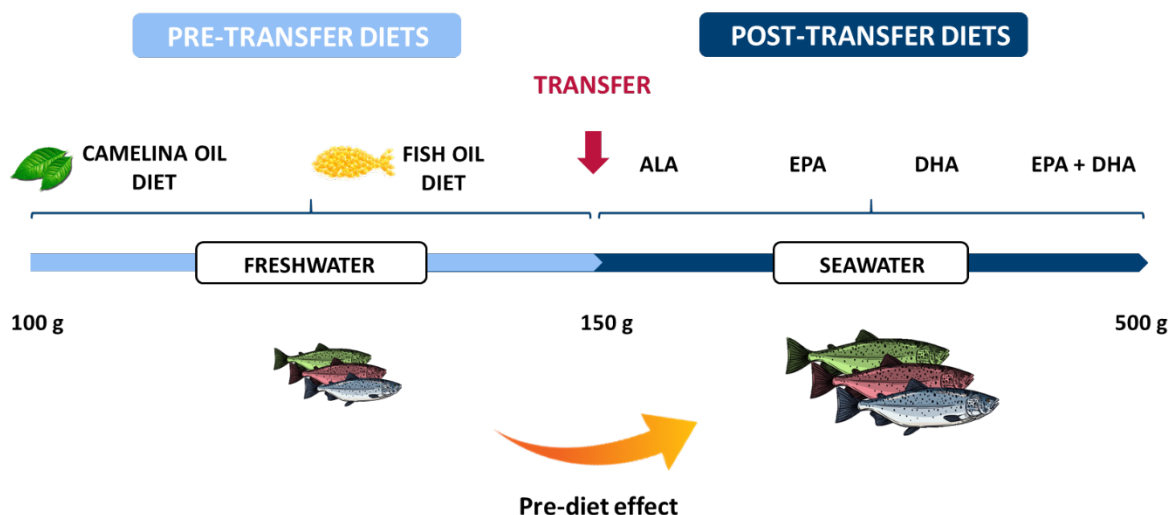
Tre ulike genetiske grupper atlantisk laks pre-smolt fra SalmoBreed, enten standard driftsfisk som ikke er selektert etter desaturasekapasitet (Drift) eller laksegrupper som gjennom to generasjoner enten er selektert for høy Δ -6 desaturasekapasitet (Høy) eller lav Δ -6 desaturasekapasitet (Lav). Laksen ble produsert ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra. Forsøksfisken ble fôret et kommersielt BioMar fôr i forkant av studien. Laks fra de tre genetiske gruppene og med en gjennomsnittlig startvekt på 80 g, ble fordelt i triplikate kar i ferskvann og fôret 2 forskjellige dietter i 12 uker. En diett var tilsatt planteolje fra *Camelina sativa* (no. Dodre) , kamelina olje (KO) for å øke nivået av α -linolensyre (ALA, 18:3n-3) og en diett var tilsatt ekstra fiskeolje (FO) og dermed rik på EPA og DHA (Tabell 5).

Tabell 5 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) av ferskvannsdiettene (fra november 2016 til februar 2017)

	KO	FO
18:1 n-9	35,3	16,2
18:2 n-6	17,3	9,3
18:3 n-3	5,4	2,6
20:5 n-3	3,8	7,2
22:6 n-3	3,7	6,6
Sum EPA&DHA	7,5	13,8

Diettene består av 45 % protein, 24,6 % lipid, 8,3 % stivelse og 5,5 % aske. Oljeblandingen i KO dietten bestod av 5 % fiskeolje, 8 % rapsolje og 8 % camelina olje og oljeblandingen i FO dietten bestod av 5 % rapsolje og 16 % fiskeolje.

Etter første forsøksperiode i ferskvann ble laksen veid og helkroppsprøver og vevsprøver ble frosset ved -40 °C for senere analyser av kjemisk sammensetning og fettsyresammensetning. Resterende forsøksfisk fra alle grupper, med gjennomsnittlig vekt på 122 g ble overført til triplikate kar i sjøvann og fôret videre på 4 ulike dietter med ulikt innhold av ALA, EPA, DHA og EPA + DHA (Tabell 6) i 16 uker inntill fisken nådde ca. 500 g. Figur 2 viser en kortfattet oversikt over forsøksoppsettet.



Figur 2 Skjematisk presentasjon av eksperimentelt design

Tabell 6 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) av sjøvanndiettene (fra februar 2017 til juni 2017)

	ALA	EPA	DHA	EPA+DHA
18:1 n-9	35,1	31,6	31,6	31,6
18:2 n-6	22,3	21,1	21,0	21,1
18:3 n-3	18,1	17,6	17,4	16,9
20:5 n-3	0,0	3,4	0,6	2,2
22:6 n-3	0,1	1,0	3,7	2,3
Sum EPA&DHA	0,1	4,3	4,4	4,5

De fire diettgruppene består av 47,5 % protein, 8,1% stivelse, 25,7% lipid og 6 % aske. Dietten rik på ALA var tilsatt ekstra camelinaolje, EPA og /eller DHA anrikede dietter ble tilsatt ulike nivåer av EPA og /eller DHA konsentrater fra Croda.

Ved forsøkets avslutning ble det tatt prøver av helkropp og ulike vev og organer til analyse av fettsyresammensetning og genuttrykk. Formålet med forsøket var å studere potensiell effekt av ernæring i ferskvannsfasen og genetisk bakgrunn for ytelse og fettsyresammensetning i sjøvann.

3.3.2 Vaksinerings og analyse av immunrespons

For å studere effekten av genetisk bakgrunn og førsammensetning i sjøvannsfasen på immunresponser ble totalt 60 fisk (15 fra hver fôrgruppe) vaksinert med en kommersiell vaksine (ALPHA JECT micro 6, PHARMAQ, NORWAY). PBS ble injisert i 6 fisk som kontroll for vaksinasjon. Preimmunt plasma ble isolert fra 36 kontrollfisk (alle grupper representert). Etter 24 timer ble 12 fisk fra hhv høydesaturase- og driftsgruppene (3 fra hver fôrgruppe) + kontrollfisk avlivet og vev fra hodenyre og milt tatt ut og frosset ned for RNA isolering og sekvensering (RNAseq). Ved å måle endringer i genuttrykk i hodenyre (mye immunceller) et døgn etter vaksinasjon vil man kunne evaluere den såkalte medfødte immunresponsen. Resten av fisken ble samlet i et kar og foret videre i 60 dager EPA+DHA diettgruppen. Etter denne perioden ble fisken avlivet, og vaksinespesifikke immunresponser ble analysert ved ELISA. Dette er et mål på den såkalte adaptive immunresponsen.

3.3.3 Vekstberegninger

Det ble registrert vekter ved de to tidspunktene som beskrevet over, og vekstratene ble beregnet som beskrevet i 4.1.2 basert på gjennomsnittlige verdier per kar.

3.3.4 Fettinnhold og fettsyrer

Totallipid og fettsyresammensetning ble analysert i dietter, helkropp, muskel og lever etter metoder beskrevet av Folch et al. [18] og Mason et al. [19]. Kjemisk sammensetning av helkropp ble analysert som beskrevet [20].

3.3.5 RNA ekstraksjon og microarray analyse

RNA fra lever ble isolert ved bruk av *Quick-RNA™ Microprep kit* (Zymo Research, CA, USA). RNA-konsentrasjonen ble målt i et *NanoDrop 1000Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, DE, USA), og kvaliteten på prøvene før mikroarray ble videre vurdert ved hjelp av et *Agilent®2100 Bioanalyzer™ RNA 6000 Nano kit* (Agilent Technology Inc., Santa Clara, CA, USA). For mikroarrayanalysen ble *Nofimas oligonukleotidmikroarray med 4x44k* benyttet (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Lever fra fisk føret de 4 ulike diettene i gruppene med høy Δ -6 desaturase kapasitet og NS ble analysert. Genuttryksdata ble behandlet og analysert med *Nofimas bioinformatikkdatabase STARS (Salmon and Trout Annotated Reference Sequences)*.

3.3.6 Statistikk

Eventuelle forskjeller mellom diettbehandlinger ble analysert ved bruk av *GraphPad Prism 8* (La Jolla, USA, www.graphpad.com) og *JMP® programvareversjon 11.2.1* (SAS Institute Inc.). Data normalitet ble vurdert ved hjelp av *Shapiro-Wilk* og *Levenes* tester. Statistisk signifikans ble vurdert ved *toveisanalyse av variansanalyse etterfulgt av Tukey HSD post-hoc test*. For data fra ferskvannsperioden og sjøvann mikroarray analyse, ble en *treveis ANOVA analyse* benyttet for fettsyresammensetning. Forskjellene ble vurdert som statistisk signifikante ved $P < 0,05$. I tillegg ble de relative FA-sammensetningsdataene for laksevev analysert ved bruk av programvaren *Unscrambler® X, versjon 10.3* (CAMO). En multivariat hovedkomponentanalyse (MPCA) ble utført for hver datamatrise for de relative fettsyresammensetningene. PCA plott ble brukt til å undersøke de viktigste trendene i dataene, og deres respektive korrelasjoner.

3.4 Material og metode AP 4

Fôringsforsøk i kar på land hvor det undersøkes om reduserte nivåer av EPA + DHA i føret og/eller endret total lipid påvirker fisken ytelse, stressrespons og microbiota.

3.4.1 Fiskeforsøk, dietter og prøvetakingsinformasjon

Hensikten med forsøket var å undersøke om fettnivå og ulike EPA og DHA nivåer i føret påvirker vekst, fettsyremetabolisme, helse, tarmmikrobiota og stressrespons. Forsøksfisken ble fordelt i 24 kar med 40 fisk per kar og føret 4 ulike dietter fra ~ 100 g til ~ 500 g (~ 112 dager, 4 måneder). I løpet av forsøksperioden ble halvparten av karene (12 kar) benyttet til stressforsøket beskrevet under. Laks ble føret de 4 diettene (Tabell 7, Tabell 8) ved Marine Environmental Research Laboratory, Machrihanish, UK. Det ble benyttet 500 L kar med gjennomstrømning av sjøvann på 5 L/min og vanntemperatur på

10 -14°C og fotoperiode 16L:8D. Laksen ble fôret i overskudd to ganger per dag ved hjelp av Arvotec matere over en bestemt tidsperiode (2 t) med fôroppsamling. Forsøket er beskrevet i Huyben et al. [27].

Tabell 7 *Diettformulering og kjemisk sammensetning. HL-Ln3 er høy lipid og lave n-3 fettsyrer, LL-Ln3 er lav lipid og lave n-3 fettsyrer, HL-Hn3 er høy lipid og høy n-3 fettsyrer, LL-Hn3 er lav lipid og høye n-3 fettsyrer*

	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3
<i>Formulering (g kg⁻¹)</i>				
Fiskemel ¹	200	200	200	200
Soya protein konsentrat ²	180	64	180	64
Soya protein isolat	115	300	115	300
Hvetemel	145	100	145	100
Hvetegluten	92	113	92	113
Fiskeolje ³	11	11	38	38
Linfrøolje	2	2	8	8
Olivenolje	194	144	161	111
L-Histidine	8	8	8	8
DL-Methionine	2	3	2	3
L-Lysine	2	5	2	5
L-Taurine	4	5	4	5
Dicalcium phosphate	20	20	20	20
Vitamin & Mineral Premix ⁴	10	10	10	10
Yttrium oxide	2	2	2	2
AntiOxidant	1,5	1,5	1,5	1,5
Soya Lecithin	10	10	10	10
Carophyll Pink	0,5	0,5	0,5	0,5
Choline chloride	1	1	1	1
<i>Proximate sammensetning (g kg⁻¹ tørrstoff)</i>				
Tørrstoff	938	947	941	950
Protein	475	590	490	591
Lipid	241	192	222	187
Aske	85	83	85	83
Karbohydrat ⁵	199	136	203	139
Energi (MJ kg ⁻¹)	24,2	23,6	23,7	23,1
Calcium (Ca)	18	17	18	18
Fosfor (P)	13	13	13	14

¹Norvik LT70 (704 g kg⁻¹ protein and 63 g kg⁻¹ lipid; Sopropêche, France)

²Soycomil (624 g kg⁻¹ protein and 4 g kg⁻¹ lipid; ADM Animal Nutrition, Decatur, IL, USA)

³Savinor (10,5 % EPA and 15,7 % DHA; Savinor UTS, Covelas TRF, Portugal) ⁴Neovia (formerly Invivo; Vannes, France)

⁵Carbohydrate, calculated by difference (i.e. CHO = 1000 - protein - lipid - ash)

Tabell 8 Fettsyresammensetning (% totale fettsyrer) av diettene sammensetning. HL-Ln3 er høy lipid og lave n-3 fettsyrer, LL-Ln3 er lav lipid og lave n-3 fettsyrer, HL-Hn3 er høy lipid og høy n-3 fettsyrer, LL-Hn3 er lav lipid og høye n-3 fettsyrer

	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3
14:0	0,5	0,6	1,4	1,7
16:0	12,4	13,1	13,0	14,4
18:0	2,9	2,9	3,3	3,2
20:0	0,4	0,3	0,3	0,3
Totale mettede	16,5	17,2	18,3	20,0
16:1n-9	0,2	0,2	0,2	0,2
16:1n-7	1,5	1,6	2,2	2,7
18:1n-9	61,8	58,7	56,2	48,4
18:1n-7	3,8	3,6	3,0	2,5
20:1n-9	0,6	0,7	0,7	0,9
22:1n-11	0,4	0,5	0,5	0,7
24:1n-9	0,2	0,2	0,2	0,2
Totale mono-umettede	68,9	66,0	63,6	56,3
18:2n-6	10,5	12,0	9,2	11,5
20:4n-6	0,1	0,1	0,2	0,2
Total n-6 PUFA	10,6	12,2	9,6	11,9
18:3n-3	1,5	1,7	2,8	3,5
18:4n-3	0,2	0,2	0,5	0,6
20:5n-3	1,0	1,2	2,7	3,5
22:5n-3	0,1	0,1	0,3	0,4
22:6n-3	0,9	1,1	1,8	2,5
Total n-3 PUFA	3,7	4,3	8,3	10,8
Total PUFA	14,6	16,8	18,2	23,7
Total LC-PUFA	2,1	2,6	5,3	7,0
n-6/n-3	2,9	2,8	1,2	1,1

Fettsyrer < 0,2 % ikke inkludert.

3.4.2 Hypoksi-stress

Halvparten av forsøksfisken (12 kar, 4 dietter i triplikat) ble utsatt for oksygenmetning på 90-100 % og resten med oksygenmetning på 60 % -70 % for å undersøke effekten av hypoksisstress. Viktige responsparametere var vektøkning (fôrintak (g/fisk), fôrfaktor, microbiota (MiSeq av 16S rRNA) og genuttrykk (qPCR av lipider og immun).

3.4.3 Prøvetaking

Blod tas fra fire fisk ved hjelp av en 5 ml heparinisert sprøyte med en 18G kanyle. Plasmaet ble overført til et rent CryoTube™ (merket) og frosset ved -80 °C. Prøver av hodenyre, muskel, proksimal tarm, hjerne, hjerte, øye, gjelle og lever ble frosset ved -80 °C. Helkroppssammensetning av fem (5) fisk på dag 0, fire fisk (4) fra hver tank ved måned 1, måned 2 og fem (5) fisk fra hver tank ved måned 4, ble frosset hele ved -20 °C. Gjødsele ble tatt ved stripping.

Prøvetaking av mikrobiota: Under sterile forhold ble baktarmen tatt ut. Faeces ble overført til et separat rør og frosset ved -80 °C. Like deler av faeces og tarmslimhinne ble senere kombinert og dyrket på agar (marine, MRS) for å bestemme mikrobiell sammensetning, samt 16S rRNA ved Illumina sekvensering som beskrevet av Huyben et al. [28].

3.4.4 Beregninger av vekst, kroppsindekser og fôrutnyttelse

Vekstdata ble generert basert på tre replikate kar, kroppsindekser var basert på fire representative fisk per kar og fôrutnyttelse var basert på en samleprøve fra fire fisk per kar. Vektøkning, fôrintak (FI) og fôrutnyttelse (FCR) ble beregnet ved hjelp av følgende ligninger:

Vektøkning (g fisk⁻¹) = sluttvekt – startvekt

FCR = FI / vektøkning

Hepatosomatisk indeks (HSI), viscerosomatisk indeks (VSI), fordøyelighet og næringsretensjon ble beregnet i henhold til følgende ligninger:

HSI (%) = (levervekt / sluttvekt) x 100

VSI (%) = (viscera vekt / sluttvekt) x 100

Næringsretensjon (%) = [(FW x C / 100) – (SW x C / 100)] / (FI x C / 100) x 100

Fordøyelighet (%) = [1 - (F / D x Di / Fi)] x 100

C er % næringsstoff (eller MJ kg⁻¹ for energi) i kroppen eller dietten (D), F er % næringsstoff (eller MJ kg⁻¹ for energi) i faeces, Di er % inert markør yttrium i dietten og Fi er % inert markør yttrium i faeces.

3.4.5 Genuttrykk qPCR

Leverprøver ca. 50 mg ble homogenisert i 1 ml Tri Reagens (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) ved hjelp av en mini-perle beater (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). Prøvene ble sentrifugert på 12.000 g i 10 min og det øvre laget ble overført til nye rør som inneholder 1-bromo-3-kloropropan (Sigma-Aldrich). RNA-løsningen ble blandet, sentrifugert ved 20 000 g i 15 min, utfelt med en løsning av natriumklorid (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), natriumsitrat sesquihydrat (Sigma-Aldrich) og isopropanol. Prøvene ble sentrifugert som før, og RNA-pelleten ble vasket med to runder med 70 % etanol og deretter lufttørket. RNA pellet ble resuspended i RNase fritt vann og konsentrasjonen og kvaliteten ble sjekket ved hjelp av et spektrofotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, DE, USA). Alle prøvene hadde en 260/230 nm 260/280 ratioer over 2,0 og 1,8. QPCR ble utført i henhold til protokoll fra leverandøren (Applied Biosystems, Paisley, UK).

3.4.6 Statistikk

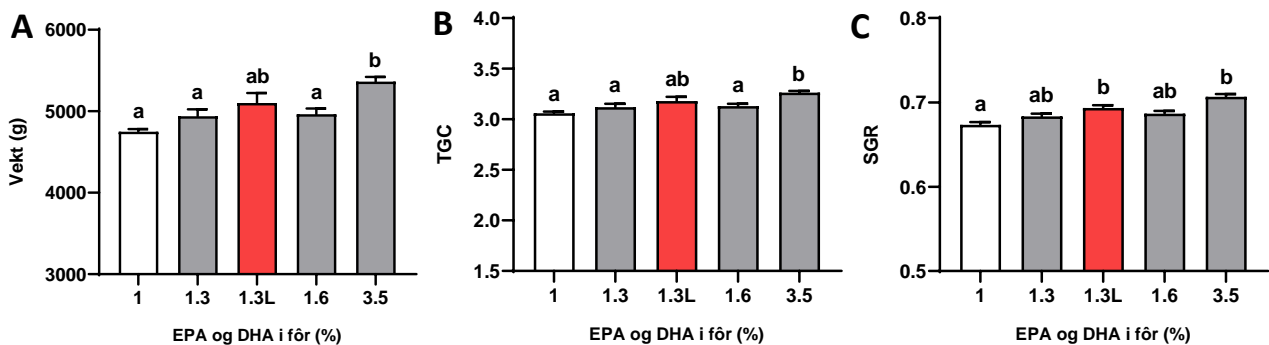
Normalfordeling og homogenitet av hvert datasett ble bestemt ved hjelp av Shapiro-Wilk og Levene test i Rstudio programvareversjon 1.0.143 (R-Core-Team, 2015). Om nødvendig ble data normalisert ved loggtransformasjon. Alle data presenteres som gjennomsnitt ± sem med mindre annet er spesifisert. Akaike's An Information Criterion (AIC) ble brukt til å bestemme den statistiske modellen. Signifikante forskjeller mellom behandlinger ble bestemt ved hjelp av lineære modeller (lm) for vekst og fettsyredata og lineære »mixed model» (lme) for genuttryksdata basert på nlme R-pakken. For ytterligere informasjon om statistiske beregninger se [27, 28].

4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

4.1 Resultater og diskusjon AP 1

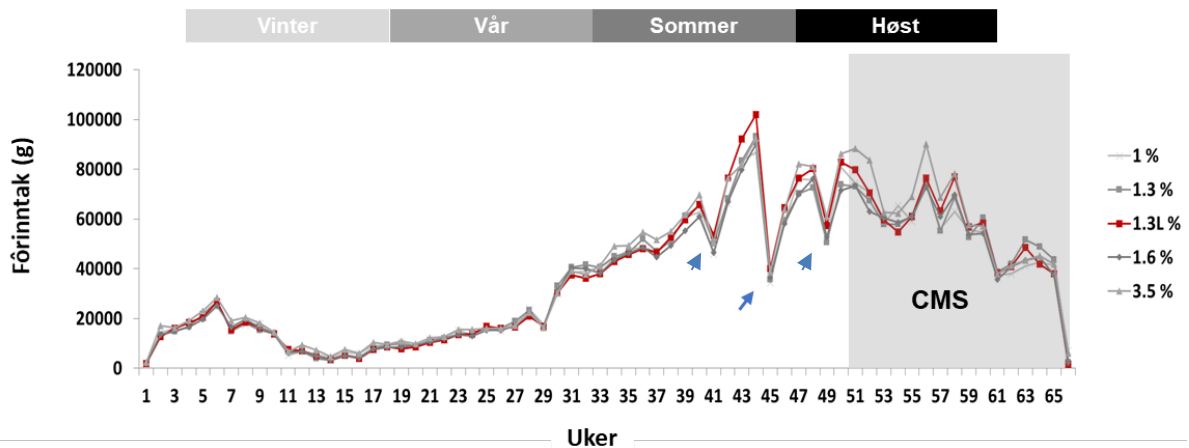
4.1.1 Vekst og fôrintak

Sluttvekt og TGC var signifikant høyere i laksegruppen fôret 3,5 % EPA og DHA sammenlignet med gruppene fôret lavere nivåer av EPA og DHA i dietten, 1 %, 1,3 % og 1,6 % EPA og DHA, men ikke signifikant forskjellig fra lavfettgruppen fôret 1,3 % EPA og DHA (1.3L) (Figur 3). 1,3 L gruppen viste tendens til høyere sluttvekt og TGC enn høyfett diettgruppene 1, 1,3 og 1,6 % EPA og DHA. Videre viste både 1,3 L og 3,5 % diettgruppene signifikant høyere SGR enn 1 % gruppen.



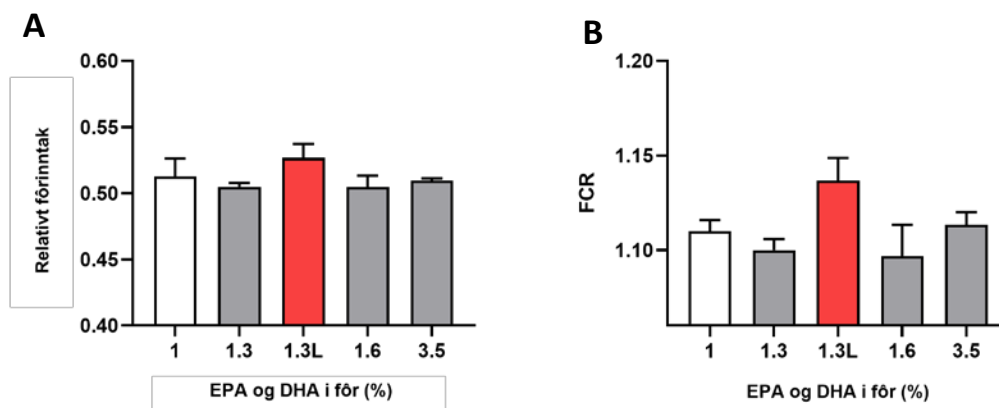
Figur 3 Sluttvekt (A), TGC; (B) og SGR; (C). (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1.3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret). Data vises som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$). Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres med forskjellige bokstaver og ble bestemt ved hjelp av enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test

Figurene 4 og 5 viser fôrintaket i de ulike diettgruppene gjennom hele forsøksperioden. Det var ingen signifikante forskjeller i fôrintak mellom diettgruppene, men både diettgruppene 1,3 L og 3,5 %, viste noe høyere fôrintak i dagene etter avlusning (indikert med blå piler) og i perioden med utbrudd av CMS (markert med grått felt), noe som kan tyde på at både høye nivåer av EPA og DHA og lavere fettinnhold i diettene har positiv effekt på fôrintaket under stressende miljøforhold.



Figur 4 Fôrintak gjennom hele forsøksperioden. Fôrintaket (g) ble beregnet ukentlig. Tidspunkter for avlusning og utbruddsperiode med kardiomyopatisyndrom (CMS) er indikert med henholdsvis blå piler og grå skravert bakgrunn

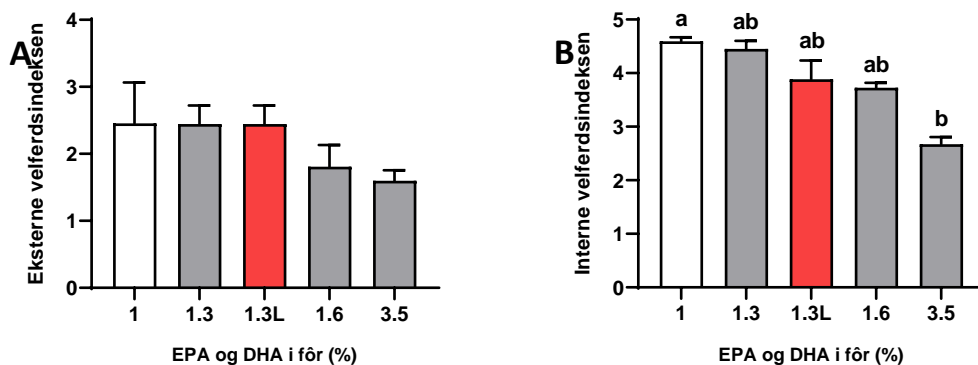
Relativt fôrintak var 0,5 (Figur 5A) og FCR ca. 1,1 (Figur 5B) for alle eksperimentelle grupper. Det var en tendens til noe økt FCR i lavfettgruppen 1,3 L.



Figur 5 Relativ fôrintak beregnet som % av kroppsvekt per dag (A) og fôrutnyttelse FCR (B). (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1,3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret). Data vises som gjennomsnitt \pm SEM (n=3)

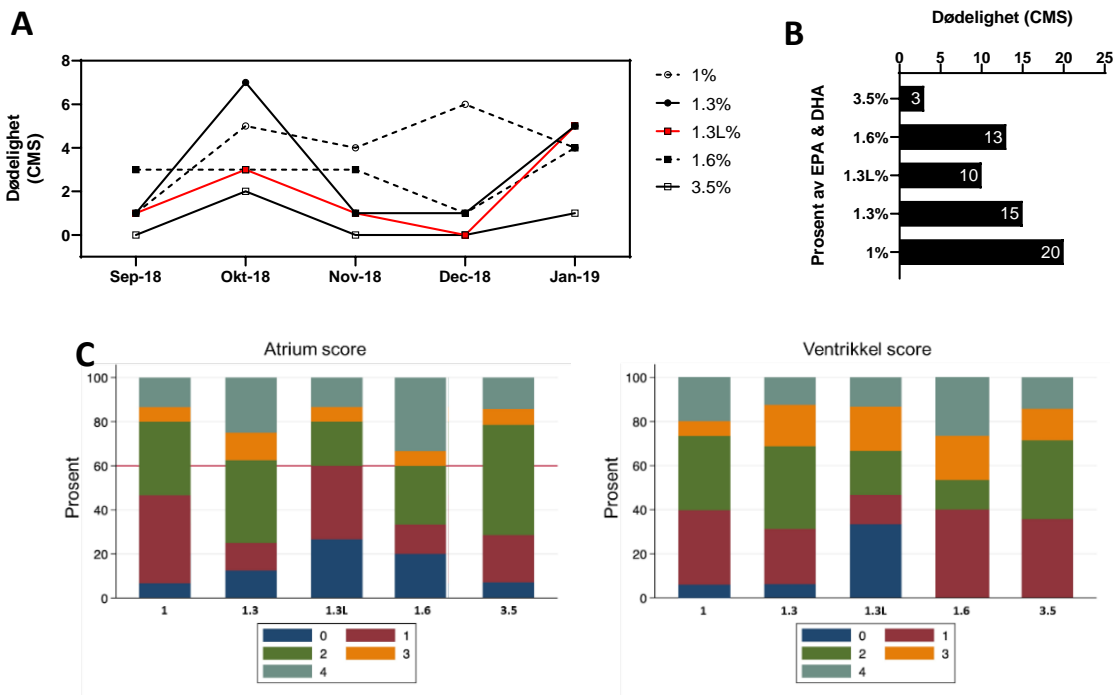
4.1.2 Fiskevelferd

Registrering av de ytre velferdsindikatorerne, skader på snute, gjeller, katarakt, skjelltap og finneskader viste ingen statistisk signifikante forskjeller mellom diettgruppene, selv om det var en tendens til lavere forekomst av ytre skader i gruppene fôret med de to høyeste nivåene av EPA og DHA (Figur 6A). Figur 6B viser en samlet helseindeks som inkluderer forekomst av fett og melaninflekker på hjertet, mengde innvolls fett og forekomst av melaninflekker i fettvevet, mage og tarmbetennelse og leverfett. Figuren viser en samlet bedret helseindeks med økende nivå av EPA og DHA i fôret. Laks fôret det høyeste nivået av EPA og DHA i dietten (3,5 % diettgruppen) hadde signifikant bedre helseindeks enn gruppen fôret 1 % EPA og DHA i dietten.



Figur 6 Eksterne (ytre skader) (A) og interne (indre organ helsescore) (B) velferdsindekser. Data vises som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$). (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1,3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret). Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres med forskjellige bokstaver og ble bestemt ved hjelp av en enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test. Rød stolpe er lavfettgruppen

Det var ingen signifikante forskjeller i total dødelighet mellom de eksperimentelle. Total dødelig var 7,5 % gjennom hele sjøvannsfasen. Figur 7A og 7B viser alikevel en spennende trend til lavere dødelighet med økende nivå av EPA og DHA i fôret under CMS utbruddet som varte fra oktober 2018 og fram til forsøksavslutning i januar 2019, med 3 døde fisk i i gruppen fôret 3,5 % EPA og DHA i dietten sammenlignet med 10 til 20 døde fisk i gruppene fôret de lavere nivåene av EPA og DHA i fôret. Det var for lav dødelighet og for stor spredning i dødelighet mellom merdene til å gi signifikante forskjeller i mellom gruppene i denne perioden. NMBU, Veterinærhøgskolen analyserte for forekomst av hjertepatologi i de ulike diettgruppene ved avslutning av forsøket (Figur 7C). Tallverdi 0 tilsvarer normal morfologi og tallverdi 4 alvorlig patologi. Det var imidlertid ingen statistiske forskjeller mellom fôringsgruppene i hjertescore for patologi (ventrikkel og atrium), selv om lavfettgruppen viste en tendens til flest normale hjerter med score 0, dvs uten funn av hjertepatologi. Videre viste PCR-resultater ingen statistiske forskjeller i virusnivåer av CMS mellom fôringsgruppene (data ikke vist).



Figur 7 Månedlig dødelighet (antall fisk) (A) og totaldødelighet (antall fisk) under utbrudd av kardiomyopatisyndrom (CMS) (B) og hjertepatologi score (C; atrium og ventrikel). (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1,3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret)

4.1.3 Fett og fettysresammensetning av helkropp og ulike vev

Totalt fettinnhold og fettysresammensetning av helkropp vises i Tabell 9. Det var ingen signifikante forskjeller i totalt fettinnhold mellom diettgruppene, fettnivået varierte fra 25,5 % i lavfettgruppen (1,3 L) til ca. 27 % i høyfettgruppene. Videre gjenspeilet fettysresammensetningen i helkropp i stor grad fettysresammensetningen til fôret, med høyere nivåer av mettede og flerumettede fettysrer med økende innblanding av fiskeolje i fôret. Økende nivåer av planteolje i diettene med lavt EPA og DHA innhold, førte til økende prosentandel av MUFA og n-6 fettysrer i helkropp. Lavfettgruppen, 1,3 L, hadde noe høyere prosentandel av mettede (SFA) og flerumettede fettysrer (PUFA). Lavfett (1,3 L) gruppen hadde noe høyere prosentandel av EPA og DHA i helkropp enn høyfettgruppen fôret samme 1,3 % EPA og DHA i dietten, men i mg EPA+DHA per g filèt var det ikke signifikante forskjeller mellom disse to gruppene.

Tabell 9 Totalt fettinnhold og fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i helkropp. Data vises som gjennomsnittet \pm SEM (n=3). (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1,3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret)

	EPA+DHA (%) i fôr										P
	1,0		1,3		1,3L		1,6		3,5		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
Fett %	26,5	0,40	27,0	0,77	25,5	0,38	27,0	0,43	27,0	0,30	>0,05
Σ SFA	12,2^a	0,13	12,6^a	0,18	13,8^b	0,13	13,4^b	10,14	16,9^c	0,06	<0,0001
Σ MUFA	56,3^a	0,10	55,2^b	0,08	53,5^c	0,14	54,2^c	0,11	47,8^d	0,09	<0,0001
20:5 n-3	1,5 ^a	0,01	1,8 ^b	0,02	2,0 ^c	0,01	2,2 ^d	0,02	4,4 ^e	0,01	<0,0001
22:6 n-3	2,0 ^a	0,05	2,28 ^b	0,01	2,5 ^c	0,01	2,8 ^d	0,01	5,1 ^e	0,02	<0,0001
EPA+DHA	3,5^a	0,05	4,1^b	0,00	4,5^c	0,01	5,0^d	0,03	9,6^e	0,02	<0,0001
Σ PUFA	31,0^a	0,17	31,6^b	0,12	31,8^b	0,06	31,7^b	0,06	33,8^c	0,05	<0,0001
Σ n-3	11,5^a	0,10	12,4^b	0,08	12,6^c	0,02	13,2^d	0,05	17,8^e	0,03	<0,0001
Σ n-6	19,5^a	0,06	19,2^b	0,07	19,1^b	0,05	18,5^c	0,02	15,9^d	0,04	<0,0001

Som for helkropp, gjenspeilet fettsyresammensetningen i muskel, lever, skinn og tarm fettsyresammensetningen til dietten. Økende nivåer av EPA og DHA i dietten førte til økende nivåer av disse fettsyrene i vevene (Tabell 10).

Ved å sammenligne høyfettgruppen med lavfettgruppen fôret samme EPA og DHA nivået i fôret, så viste muskel til høyfettgruppen lavere prosentandel EPA og DHA og tendens til høyere kvantitativt nivå (7,4 mg/g sammenlignet med 6,5 mg/g) av EPA og DHA. Det var ikke signifikante forskjeller i nivåene av EPA og DHA i lever, skinn og tarm mellom disse to 1,3 % EPA og DHA diettgruppene.

Tabell 10 Fett% (gram fett/100 gram vev) og EPA og DHA nivåer (i mg/g og i % av totale fettsyrer) i lever, muskel, skinn midttarm og baktarm til atlantisk laks fôret de eksperimentelle diettene. (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1,3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret). Data vises som gjennomsnittet \pm SEM (n=3)

		EPA+DHA nivåer (%) i fôr										P	
		1,0		1,3		1,3L		1,6		3,5			
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM		
Lever	mg/g	Fett %	10,5 ^{ab}	0,80	12,4 ^a	1,86	9,5 ^{ab}	0,75	10,2 ^{ab}	0,57	5,96 ^b	0,45	0,0146
		EPA	2,4 ^a	0,11	2,5 ^a	0,09	2,6 ^a	0,10	2,8 ^a	0,05	3,3 ^b	0,09	0,0004
		DHA	4,7 ^a	0,25	4,8 ^a	0,13	5,2 ^a	0,16	5,6 ^a	0,21	7,2 ^b	0,21	<0,0001
	%	EPA	3,1 ^a	0,24	2,8 ^a	0,36	3,6 ^a	0,28	3,5 ^a	0,21	7,4 ^b	0,36	<0,0001
		DHA	5,97 ^a	0,50	5,2 ^a	0,71	7,1 ^a	0,99	7,0 ^a	0,63	16,1 ^b	0,52	<0,0001
Muskel	mg/g	Fett %	20,4 ^a	0,41	20,9 ^a	1,25	16,3 ^b	0,59	20,4 ^a	0,72	20,0 ^a	0,26	0,0072
		EPA	2,6 ^a	0,07	3,2 ^{ab}	0,20	2,7 ^a	0,13	3,97 ^b	0,10	7,4 ^c	0,22	<0,0001
		DHA	3,4 ^a	0,03	4,2 ^b	0,08	3,8 ^{ab}	0,12	5,0 ^c	0,14	8,9 ^d	0,28	<0,0001
	%	EPA	1,5 ^a	0,02	1,8 ^b	0,02	2,0 ^c	0,02	2,2 ^d	0,01	4,3 ^e	0,04	<0,0001
		DHA	2,0 ^a	0,02	2,3 ^b	0,10	2,8 ^c	0,06	2,8 ^c	0,02	5,2 ^d	0,03	<0,0001
Skinn	mg/g	Fett %	17,3	1,82	14,4	1,10	24,1	3,50	17,3	1,78	18,1	1,29	NS
		EPA	2,6 ^a	0,22	2,6 ^a	0,26	4,1 ^a	0,52	3,7 ^a	0,43	7,3 ^b	0,43	<0,0001
		DHA	3,0 ^a	0,22	3,3 ^a	0,45	4,7 ^a	0,66	4,5 ^a	0,41	8,1 ^b	0,37	<0,0001
	%	EPA	1,7 ^a	0,06	2,2 ^b	0,02	2,0 ^b	0,04	2,5 ^c	0,06	4,7 ^d	0,08	<0,0001
		DHA	2,0 ^a	0,08	2,8 ^b	0,27	2,3 ^{ab}	0,01	3,0 ^b	0,12	5,2 ^c	0,15	<0,0001
Midttarm	mg/g	Fett %	5,9	0,95	5,1	0,25	4,6	0,42	5,1	0,38	4,9	0,74	NS
		EPA	1,4	0,22	1,5	0,02	1,5	0,13	1,9	0,34	2,0	0,14	NS
		DHA	2,8	0,45	3,3	0,07	3,3	0,13	4,4	0,88	4,3	0,24	NS
	%	EPA	3,2 ^a	0,22	4,1 ^a	0,13	4,5 ^{ab}	0,30	4,4 ^{ab}	0,18	6,1 ^b	0,71	0,0036
		DHA	6,4 ^a	0,78	9,1 ^{ab}	0,50	10,4 ^{ab}	1,19	10,2 ^{ab}	0,63	13,0 ^b	1,80	0,0209
Baktarm	mg/g	Fett %	3,9	0,54	2,7	0,22	5,6	2,35	3,8	0,20	5,7	1,25	NS
		EPA	1,3 ^a	0,05	1,2 ^a	0,04	1,6 ^{ab}	0,38	1,4 ^{ab}	0,06	2,6 ^b	0,37	0,0159
		DHA	2,9 ^a	0,08	2,8 ^a	0,06	3,3 ^a	0,35	3,4 ^a	0,10	5,0 ^b	0,33	0,0003
	%	EPA	4,7	0,32	5,7	0,69	4,7	1,01	5,1	0,23	5,7	0,22	NS
		DHA	10,4	0,96	13,8	1,87	10,6	3,03	11,9	0,81	11,5	1,48	NS

4.1.4 Estimert retensjon av fettsyrer i helkropp

Retensjonen av EPA og DHA i helkropp ble estimert for å anslå hvor mye av EPA og DHA spist som gjenfinnes i helkropp til laks i de ulike diettgruppene (Tabell 11). Retensjonen av EPA og DHA ble beregnet i 3 forskjellige perioder. Periode 1, fra oktober 2017 til januar 2018 (4 mm fôrpellet), periode 2, fra januar 2018 til april 2018 (6 mm fôrpellet) og periode 3, fra april 2018 til januar 2019 (9 mm fôrpellet). I periode 1 var det høyest retensjon av EPA og DHA i helkropp til laks fôret det høyeste diettnivået (3,5 %) av EPA og DHA i fôret. Denne trenden ble derimot reversert i de to senere tidsperiodene, hvor det ble observert en tendens til lavere retensjoner av EPA og DHA med økende nivåer av disse fettsyrene i fôret. I stor laks, er det en tendens til redusert retensjon av EPA og DHA med økende nivå av disse i fôret som tidligere vist i en rekke studier [29, 30]. Det var ingen signifikant forskjell i EPA og DHA retensjonen mellom 1,3 % EPA+DHA gruppene fôret høy fett og lavfett (data for 1,3 L ikke vist).

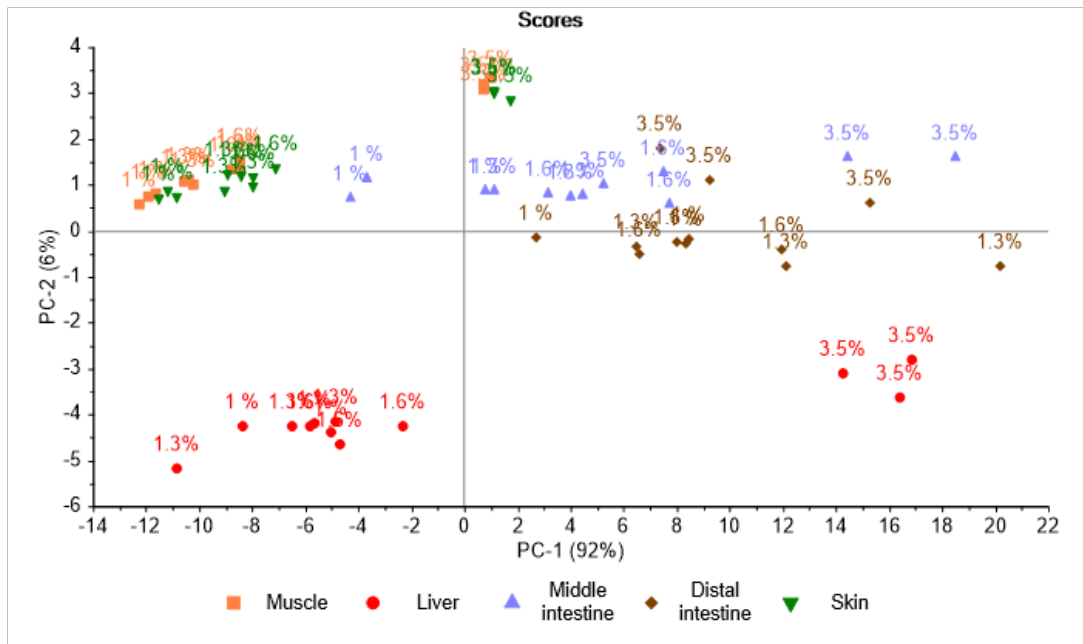
Tabell 11 Estimert retensjon av EPA og DHA i 3 ulike perioder i henhold til pelletstørrelse og forskjeller i fôrformulering (P1, fra oktober 2017 til januar 2018, 4 mm; P2, fra januar 2018 til april 2018, 6 mm; P3, fra april 2018 til januar 2019, 9 mm). (1, 1,3, 1,6 og 3,5 er % EPA +DHA i fôret, 1,3 L er lavfettgruppen med 1,3 % EPA+DHA i fôret)

		EPA+DHA nivåer (%) i fôr								P
		1,0		1,3		1,6		3,5		
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
P1	EPA	21,3 ^a	1,93	20,2 ^a	2,82	25,6 ^a	1,84	32,8 ^b	1,46	0,01
	DHA	35,2	6,57	36,0	7,35	36,9	5,19	58,8	3,49	0,06
P2	EPA	40,8	1,37	49,1	7,36	33,0	4,22	32,4	2,53	NS
	DHA	76,5 ^a	3,32	69,6 ^a	16,67	47,4 ^{ab}	13,88	26,2 ^b	5,24	0,049
P3	EPA	54,3	1,62	54,1	2,36	59,4	2,79	53,1	0,57	NS
	DHA	72,8 ^{ab}	2,62	72,1 ^{ab}	2,01	84,3 ^a	6,68	66,9 ^b	0,45	0,049

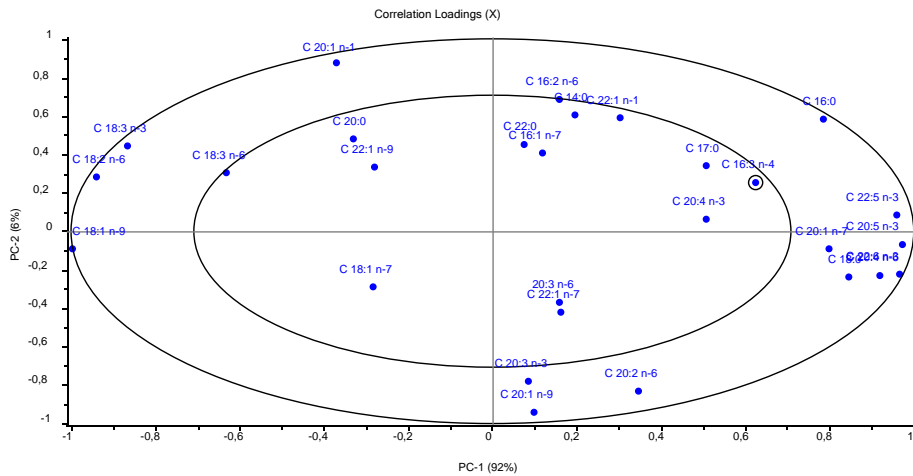
4.1.5 Multivariat-og lineær regresjonsanalyse av fettsyresammensetning i ulike vev

For ytterligere å vurdere de spesifikke effektene på fettsyresammensetning ble «principal component analyses» PCA (Figur 8) og lineær regresjonsanalyser inkludert for muskel, lever, midtarm, baktarm, og skinn (Figur 9). Muskel og skinn er plassert i samme kvadrant i PCA plottet, noe som betyr at de kjennetegnes ved tilstedeværelse av de samme fettsyrene og at de i relativt lik grad er påvirket av fettsyresammensetningen av fôret. Lever skiller seg ut ved å være lokalisert i nedre kvadrant og har en fettsyresammensetning som skiller seg fra muskel og skinn og er i stor grad påvirket av fettsyresammensetningen av fôret. Baktarm og midttarm, plasserte seg også i ca. samme område i PCA plottet, men bare midttarm var påvirket av fôrsammensetningen.

A



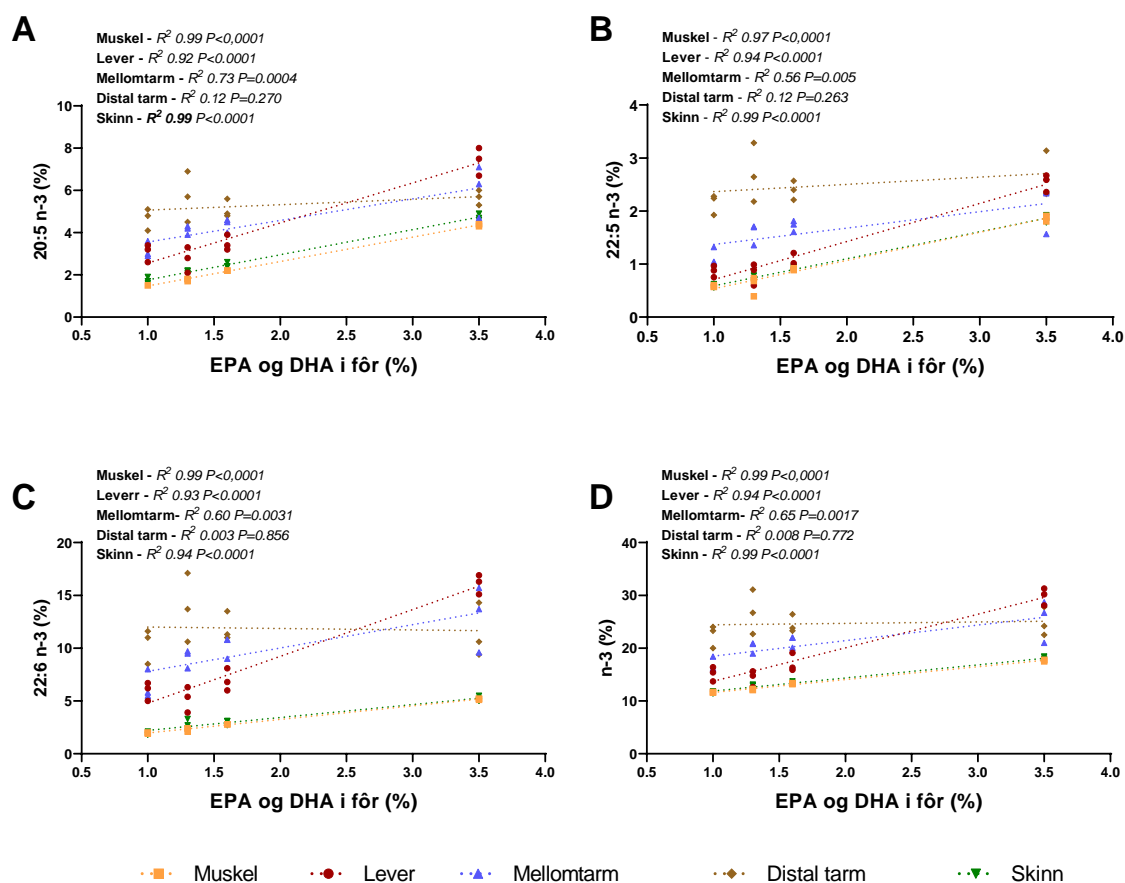
B



Figur 8 Score som viser forholdet mellom de forskjellige vevene og den totale fettsyre-sammensetningen (% av totale FA-syrer). Disse plottene viser første hovedkomponent (PC1) v. andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 98 % av variasjonen. De forskjellige fargene i resultatplottet representerer ulike vev analysert (8A), korrelasjonsplottet viser hvilke fettsyrer som kjennetegner de ulike vevene (8B)

Videre viste regresjonsanalyser en lineær økning av n-3 fettsyrer i muskel, skinn, midttarm og spesielt leveren med økende nivåer av fiskeolje i fôret (Figur 9). Muskel og skinn viste nesten identiske verdier med en jevn økning i 20:5n-3 (fra 1,5 og 1,7 % til 4,3 % og 4,7 %), 22:5n-3 (fra 0,6 % til 1,9 % for begge vev) og 22:6n-3 (fra 2 % til 5,2 % for begge vev) med økende EPA og DHA i fôret. Lignende resultater ble funnet i midttarmen med verdier fra 3,2 % til 6,1 % for 20:5n-3, fra 1,1 % til 2,1 % for 22:5n-3 og

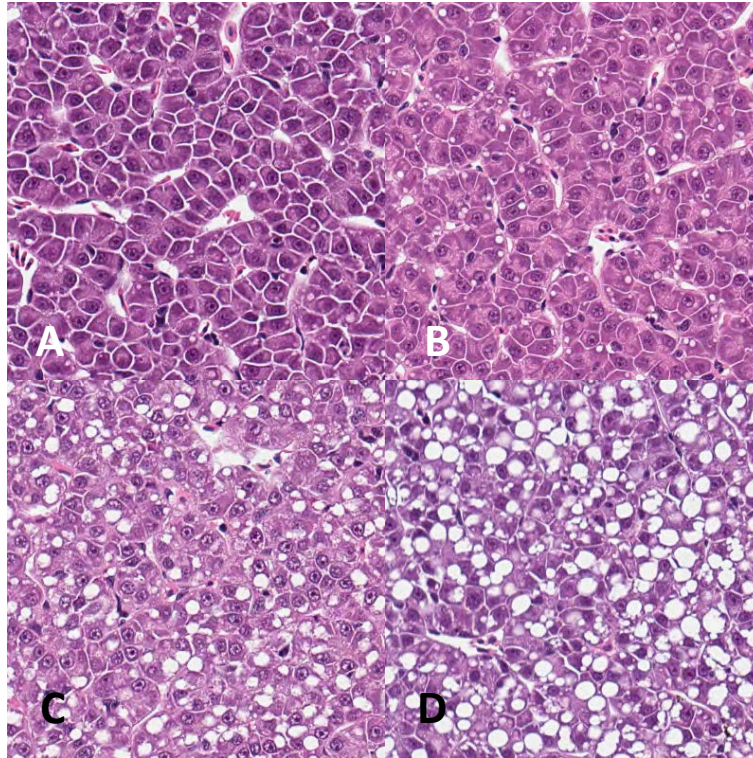
fra 6,4 til 13 % for 22:6n-3. Videre viste lever den høyeste økningen i EPA og DHA av alle vevene. Nivåene av EPA og DHA i baktarm var i liten grad påvirket av fettsyresammesetningen av fôrene.



Figur 9 Regresjonsanalyse av EPA og DHA i fôret vs EPA, DPA, DHA og totale n-3 fettsyrer i vevene (A), 22:5n-3 (B), 22:6n-3 (C) og Σ n-3 (D) fettsyrer og deres respektive innhold i muskel, lever, midttarm, baktarm og skinn fra atlantisk laks fôret de forskjellige eksperimentelle diettene

4.1.6 Evaluering av histopatologi ved mikroskopi og røntgenanalyser

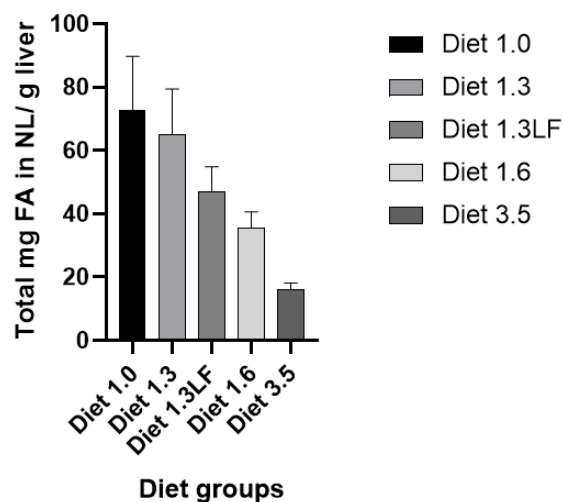
Mikroskopi undersøkelse av lever kunne ikke påvise spesifikke patologier og den generelle strukturen og morfologien til vevet ble ansett som normal. Det ble derimot observert individforskjeller i antall og størrelse på fett-vakuoler i hepatocytterne. Score mellom 1 og 5 ble benyttet, hvor 1 betegnet sparsom vakuolisering og 5 betegnet patologisk lipidose (Figur 10). Ingen av vevsprøvene i dette materialet ble gitt score 5. Gjennomsnittlig score for fett-vakuoler var henholdsvis 2,3, 2,5 og 2,2 for de tre diettgruppene 1 %, 1,3 % og 1,6 % EPA og DHA. For 3,5 % diettgruppen var gjennomsnittlig score 1,7. Spesielt kan nevnes at ingen av leversnittene fra 3,5 % EPA og DHA diettgruppen scoret høyere enn 2. I motsetning fikk 2 lever i hver av diettgruppene 1 % og 1,3 %, score 4. Noe som kan tyde på at økende diettnivåer av EPA og DHA kan bidra til lavere forekomst av fett-vakuoler i hepatocytter, en observasjon som er i overensstemmelse med tidligere studier [13, 30, 31].



Figur 10 Mikroskopi analyse av lever A) Sparsom vakuolisering, score 1, B) moderat, men distinkt tilstedeværelse av lipid vakuoler, score 2, C) rikelig vakuolisering, score 3, D) store fett vakuoler dominerer vevet, men hepatocytter og andre vevsstrukturer er normale, score 4

Akkumulering av lagringsfett (nøytralt lipid) i lever var høyere jo mindre EPA+DHA det var i føret (Figur 11), noe som samsvarer godt med resultater fra ulike velferdsscore (Figur 6B, og mikroskopi av fettvakuoler i lever (Figur 10) fra samme fisken. Fett i lever fra fiskegruppen foret lavfettdiett med 1,3 % EPA og DHA lå numerisk noe lavere enn fisk føret høyfett diett med 1,3 % EPA+DHA, men pga. stor individuell variasjon var det ingen signifikant forskjell mellom disse diettgruppene.

Liver lipid accumulation (NL)



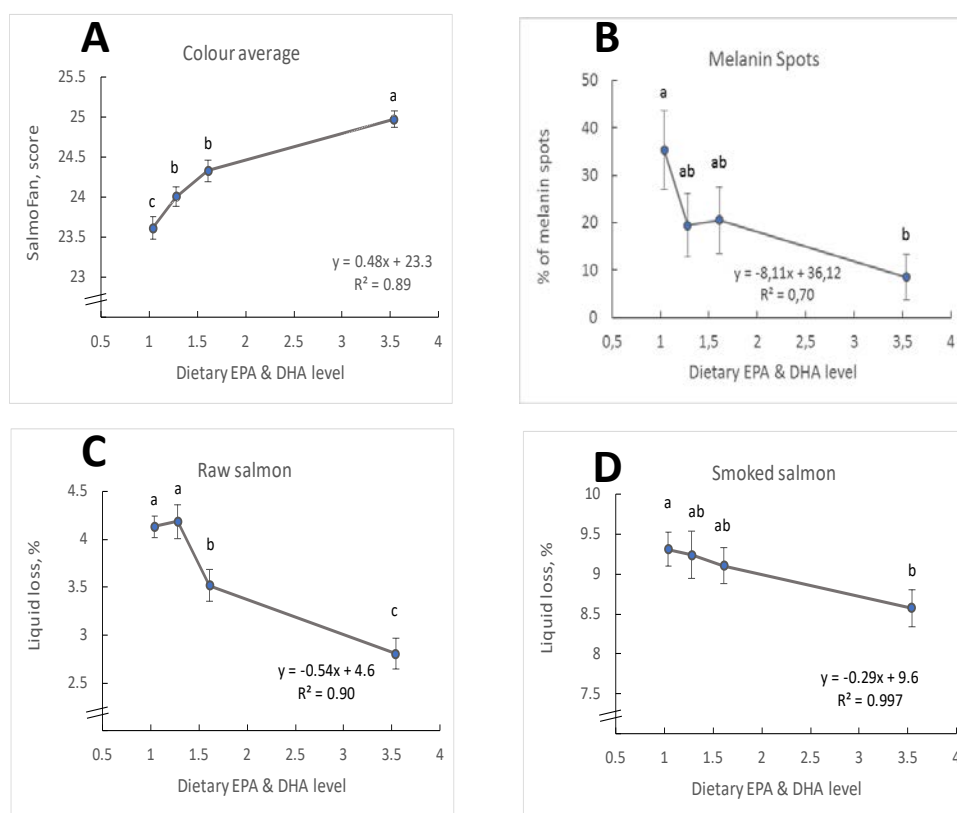
Figur 11 Totale mg fettsyrer detektert i nøytrale lipider (lagringsfett) hos laks føret ulike nivåer av EPA+DHA (1,0 – 3,5 % av totale fettsyrer), samt lavfett (LF) diett

Mikroskopianalyse av midttarmen viste generelt normalt vev i alle diettgruppene. Noen mindre tegn på økt vakuolisering i supranukleærområdet av enterocytter ble observert i 2 av 15 seksjoner i gruppen fôret det laveste nivået av EPA og DHA, 1 % EPA og DHA, og i ett av snittene fra 1,6 % EPA og DHA fôret laks. Videre hadde all fisk en normal baktarm, med velutviklede slimhinnefolder og svært vakuoliserte slimhinnefolder. Noen få individer hadde et avvikende utseende av tarmslimhinnen, og viste enten en svært sparsom vakuolisering eller et skummende utseende av supranuclear cytoplasma. Den reduserte vakuoliseringen ble registrert i totalt fire fisk, en i 1 % gruppen og tre i 1,3 % gruppen. Det skummende cytoplasmaet ble observert i to fisk, en i hver av 1 % og 1,6 % gruppene. I gruppen fôret 3,5 % EPA og DHA ble alle prøvene ansett som normale. Skinnanalyse viste ingen spesifikke patologier, selv om det ble observert en tendens til økende tykkelse av dermis og økt antall mukusceller med økende EPA+DHA-nivåer i fôret, i overensstemmelse med tidligere observasjon fra *FHF prosjektet 901265 «Ernæringens betydning for skinn-, tarm- og gjellehelse hos laks»*, Berge et al., 2019.

Røntgenanalyser av ryggraden (vertebrae) viste en forekomst av fusjoner på mellom 16 % og 21 % i de ulike diettgruppene. I tillegg til fusjoner var det en lav forekomst av fisk med korstingsgsvirvler i materialet og ingen signifikante forskjeller mellom de ulike diettgruppene.

4.1.7 Filètkvalitet

Diettene påvirket farge, antall melaninflekker og væsketap etter frysing og tining (Figur 12). Disse kvalitetsanalysene av filèt ble utført i samarbeid med FHF 901487 Ex-Spot prosjektet ledet av Turid Mørkøre.



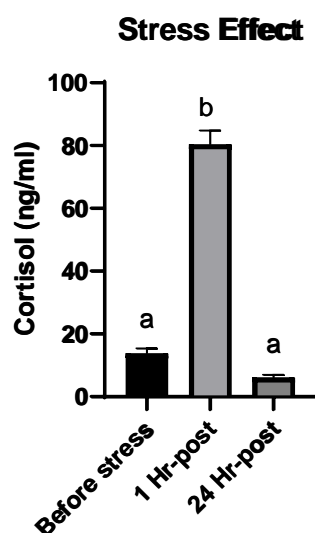
Figur 12 Regresjonsanalyse av filèt fargeintensitet (SalmoFan™) (A) andel fileter med melanin flekker (B) og væsketap etter frysing og tining i rå (C) og røkt (D) Atlantisk laks fôret de ulike eksperimentelle diettene

Filetens rødfarge, registrert med fargevifte, økte med økende prosentandel EPA og DHA i diettene, og var signifikant høyere i laks fôret 3,5 % EPA og DHA i dietten sammenlignet med diettgrupper fôret lavere nivåer av EPA og DHA. Forekomsten av svarte melaninflekker ble betydelig redusert i 3,5 % diettgruppen sammenlignet med 1 % gruppen, noe som er i overensstemmelse med tidligere funn fra laks fôret økt nivå av DHA i dietten [32].

I tillegg ble væsketapet redusert etter frysing og tining av laksemuskel, og etter røyking med økende inkludering av fiskeolje i fôret. Dette kan muligens ikke tilskrives en EPA og DHA effekt. Samtidig som nivået av fiskeolje i dietten økes, så øker ikke bare nivåene av EPA og DHA, men også nivåene av mettede fettsyrer i muskel (Tabell 9). Mettede fettsyrer har lavere smeltepunkt og det kan spekuleres i om disse har betydning for væskeslipp fra muskel.

4.1.8 Effekt av stress

På midtuttaket ble forsøksfisken utsatt for stress i form av en simulert mekanisk avlusning, og det ble tatt prøver av fisken før denne behandlingen for hver merd, samt 1 t og 24 t etter. Plasma kortisolresultater viste at fisken tydelig ble stresset av behandlingen, men det var ingen effekt av fôr på den akutte stressresponsen eller på recovery etter 24 t (Figur 13).



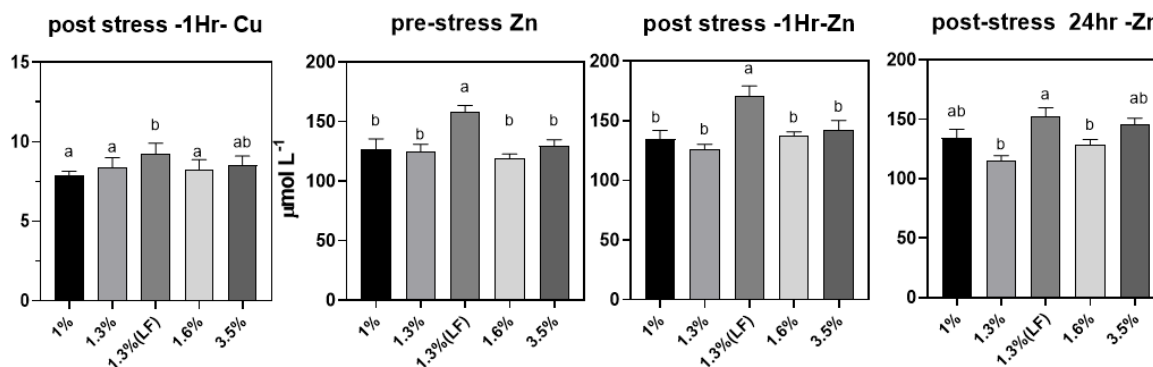
Figur 13 Plasma kortisol før, 1 t etter og 24 t etter stress i form av mekanisk avlusning. Data for alle diettgruppene er vist samlet siden det ikke var signifikante forskjeller mellom disse, og bokstavene viser statistisk signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom tidspunktene

Det viste seg også at stress påvirket mineralstatus i plasma (Figur 14), der innhold av både jern og mangan i plasma gikk ned etter stress, mens kobber og sink gikk opp. Ulikt plasma kortisol, var fisken ikke tilbake til utgangspunktet etter 24 t (med unntak av en delvis recovery for sink), vi så heller at effekten var sterkere 24 t etter stress sammenlignet med 1 t etter.



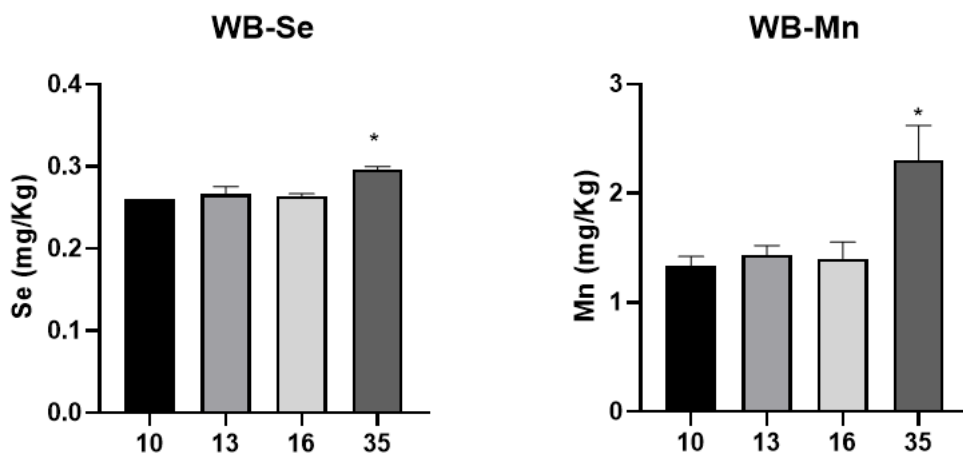
Figur 14 Stresseffekter på mineralstatus i plasma. Alle diettgrupper er vist samlet i denne figuren, og bokstavene viser statistisk signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom tidspunktene

På mineraler i plasma var det imidlertid også noen effekter av diett (Figur 15). Lavfett-diett gruppen 1,3 % LF skilte seg ut med høyere nivå av kobber i plasma 1 t etter stress, samt høyere sink i plasma både før og etter stress.



Figur 15 Signifikante dietteffekter på mineralinnhold i plasma. Bokstavene viser statistisk signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom diettgruppene

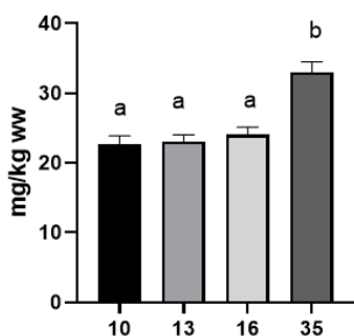
For å se på eventuelle langtidseffekter på mineralstatus ble helkropp fra sluttuttaket analysert. Her var det sink, mangan og selen som skilte seg ut med tydelige effekter av diett. For både selen og mangan var det ingen effekt av fettinnhold (lavfettdietten vs. de andre diettene), mens fettsyreprofilen så ut til å ha innvirkning, der fisken som hadde fått fôr med det høyeste innholdet av EPA og DHA hadde de høyeste nivåene av både selen og mangan i helkropp (Figur 16).



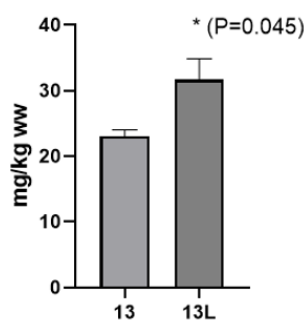
Figur 16 Selen og mangan i helkropp (WB) ved sluttuttaket. Bokstavene viser statistisk signifikante ($p < 0,05$) forskjeller mellom diettgruppene. (X-aksen viser 10, 13, 16 og 35 g/Kg EPA og DHA)

For sink så det ut til å være en effekt både av fettinnhold i fôret og av fettsyreprofilen (Figur 17), da både fisken som hadde fått det høyeste EPA + DHA-innholdet i fôret, og fisken som hadde fått lavt fettinnvå hadde signifikant høyere sink i helkropp på slutten av forsøket.

Effekt av fettsyreprofil:



Effekt av fettinnvå:



Figur 17 Både fettsyreprofil og fettinnvå i fôret hadde signifikant innvirkning på sink-status i helkropp ved sluttuttaket. (X-aksen viser 10, 13, 16 og 35 g/Kg EPA og DHA, 13L er lavfett diettgruppen)

Disse resultatene gir tydelige indikasjoner på at det foreligger et viktig samspill mellom nivåene av EPA+DHA og Zn i dietten. Lavt EPA +DHA nivå påvirker antakelig opptaket av Zn over tarmen og resulterte i redusert nivå av Zn i kroppen, slik det tidligere er observert i rotter [33] og i Atlantisk laks FHF rapport 901265, «*Ernæringens betydning for skinn-, tarm- og gjellehelse hos laks*». Fettinnvået i fôret til oppdrettslaksen er endret i løpet av de siste 25 årene for å gi energi til rask vekst og spare protein, en økning som har skjedd parallelt med økende bruk av planteprotein og planteolje. I løpet av den samme perioden har Zn nivå i slakteklar laks (4-5 kg) gått ned fra 55 mg/kg til 30 - 35 mg/kg [2]. Det er ikke samlet inn systematiske data på dette, og dermed er det vanskelig å si i hvilken grad dette henger sammen med andre endringer i fôret. Det er vist at Zn behovet antakelig er økt med plantebaserte fôr [34], men fettinnvå har ikke blitt studert i denne sammenhengen i laks. Studier med

pattedyr tyder på at høyfettdietter øker fettdeponering samtidig som de reduserer retensjon av Zn og øker behovet for Zn tilskudd [35, 36].

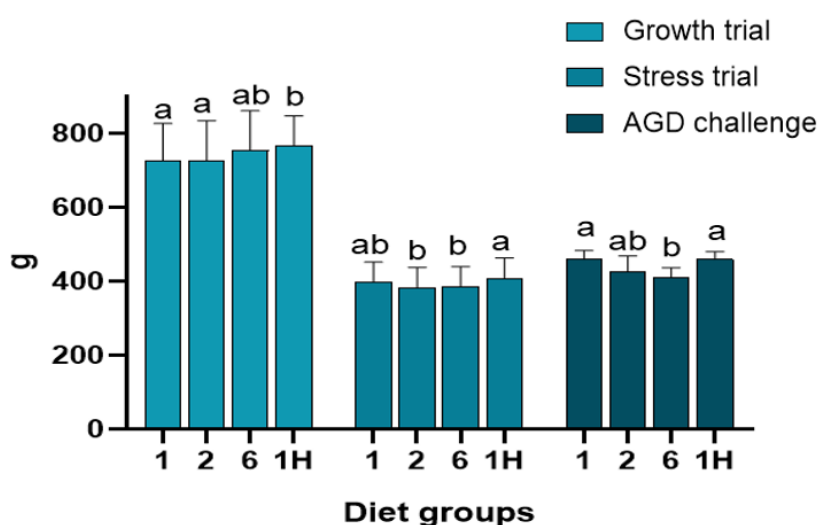
4.1.9 Oppsummering av hovedresultater fra AP 1

- Økende nivåer av EPA og DHA i fôret resulterte i økt tilvekst.
- Økende nivåer av EPA og DHA i fôret ga bedret filetfarge og redusert forekomst av melaninflekker.
- Økende nivåer av fiskeolje/ reduserte nivåer av planteolje i fôret ga redusert fettavrenning fra muskel etter frysing og tining og etter røyking.
- Økende nivåer av EPA og DHA i fôret bedret velferds- og helsescore.
- Redusert fettnivå i fôret påvirket i liten grad kvantitative og relative verdier av EPA og DHA i helkropp, muskel, lever, skinn og tarm.
- Økende nivåer av EPA og DHA i fôret påvirket ikke stressresponsen etter avlusning, men stress påvirket mineralbalansen i helkropp.
- Både økende nivåer av EPA og DHA i fôret og redusert fettnivå i fôret bedret selenstatus og sinksstatus i helkropp.

4.2 AP 2 Resultater og diskusjon

4.2.1 Vekst

I vekstforsøket var det en liten positiv effekt på sluttvekt i gruppen som fikk økt nivå av n-3 fettsyrer i fôret (signifikant høyere enn gruppe 1 og 2, mens gruppe 6 lå midt imellom) (Figur 18). I stressforsøket var bildet noe annerledes; selv om veksten fortsatt var best i gruppe 1H (som fikk høyere n-3 fettsyrer), var den her signifikant bedre enn fôrgruppe 2 og 6, mens gruppe 1 lå midt imellom. I smitteforsøket med AGD var det best vekst i gruppe 1 og 1H, mens gruppe 6 var dårligst og gruppe 2 var i en mellomposisjon. Dette kan tyde på at fisken som har fått høy n-6 i fôret klarer seg bra under optimale forhold (som i vekstforsøket), men tålte dårligere gjentatt stress og kombinasjonen av sykdom og gjentatt stress med ukentlig uttak i AGD-forsøket.



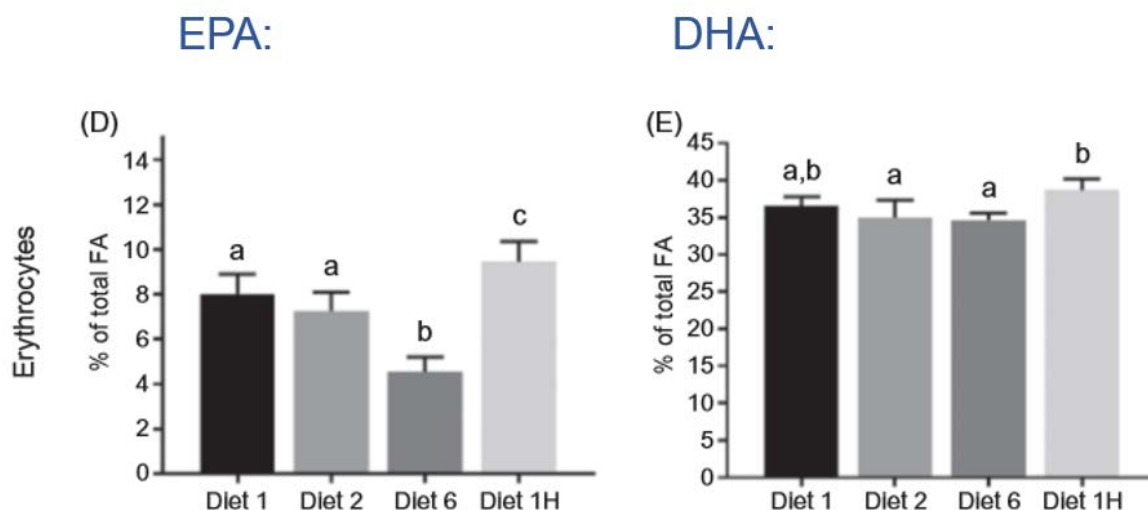
Figur 18 Sluttvekt for de ulike diettgruppene i de tre ulike forsøkene kjørt med de samme fire diettgruppene, med henholdsvis n-6/n-3 ratio på 1, 2, 6 (diett 1, 2 og 6) og ratio på 1 kombinert med høyere innhold av n-3 (diett 1H)

4.2.2 Fett og fettsyresammensetning av røde blodceller og lever fra laks i vekstforsøket

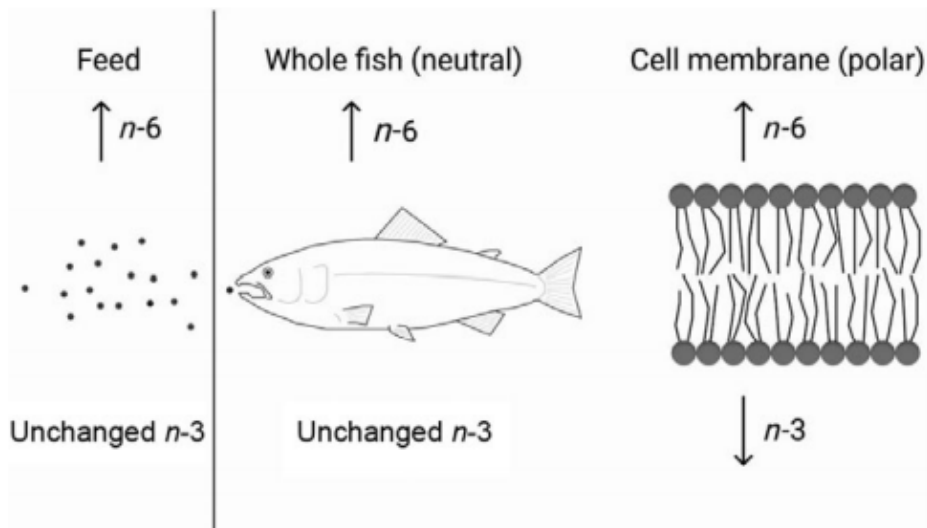
På tross av at de tre første diettene hadde samme innhold av n-3 fettsyrer, så ble n-3 innhold i polare fett-typer redusert med økende innhold av n-6 fettsyrer i fôret. Denne effekten var svært tydelig for EPA, mens DHA ikke ble nevneverdig påvirket (Figur 19). Dette mønsteret var det samme uansett om man så på røde blodceller, eller polart fett i lever eller skinn. Polart fett er ikke lagringsfett, men fett som brukes i bl.a. oppbygging av cellemembranen. Endringer i denne fettsyresammensetningen kan dermed påvirke cellens funksjon. I muskel og i hel fisk (der størsteparten av fett er lagringsfett) førte økt n-6 i fôret til økt n-6 i fisken, men ga ingen endringer i n-3 fettsyrer, i motsetning til cellemembranene der n-3 fettsyrer og spesielt EPA gikk ned (Figur 20).

For fettsyresammensetningen i polart fett spilte fôrets n-6/n-3 ratio en viktigere rolle enn den totale mengden av disse fettsyrene i fôret (Figur 21). I nøytralt fett derimot, altså lagringsfettet, så vi at den absolutte mengden av n-6 og n-3 fettsyrer i fôret var viktigere for fettsyresammensetningen i vevet enn n-6/n-3 ratio. For de tre gruppene med lik mengde EPA, DHA og ARA i fôret, hadde økende 18:2n-6 i fôret tydelig effekt på sammensetning av cellemembraner, med redusert EPA og økende ARA, mens DHA holdt seg ganske stabil. Et viktig resultat fra denne studien er at dersom fôrets innhold av n-6 fettsyrer holdes lavt, så kan det se ut som om laksen har en bedre utnyttelse av de essensielle fettsyrene, og da særlig EPA i cellemembraner.

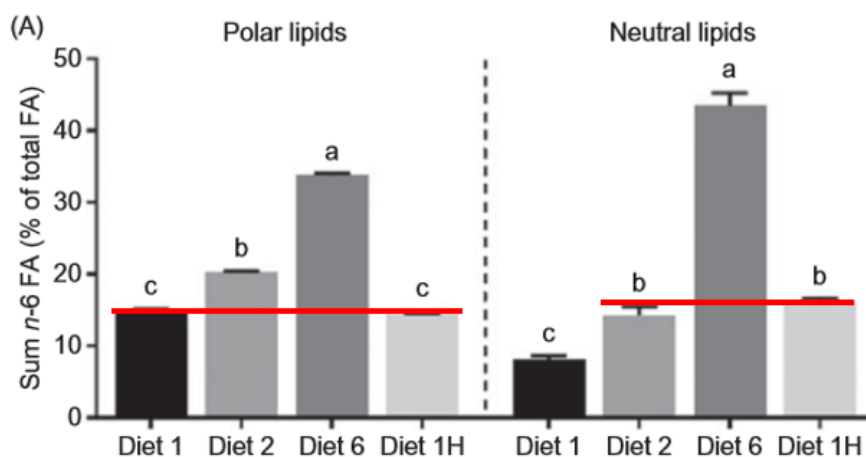
Fettsyreprofilen i både nøytrale (lagringsfett) og polare lipider (cellemembraner) påvirkes av n-6/n-3 ratio i fôret, men i mye sterkere grad for nøytralt fett (ratio fra ca. 1-10) enn for polart (ratio ca. 0.3-1).



Figur 19 Innhold av henholdsvis EPA og DHA i røde blodceller fra fisk i de fire diettgruppene. Mønsteret man ser her er representativt for polare lipider fra alle vev som ble analysert, der EPA i cellemembranene gikk ned med økende n-6 i fôret (gruppe 1-6), mens DHA forble relativt stabil. Gruppen med mer n-3 i fôret (1H) hadde noe økt nivå av både EPA og DHA i cellemembranene ift de tre andre gruppene

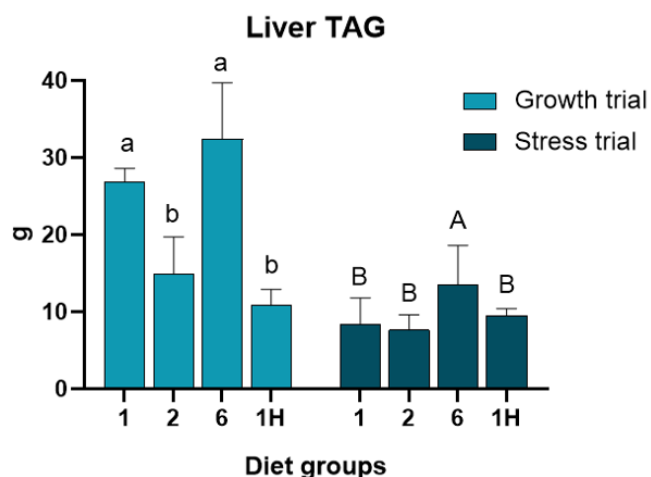


Figur 20 Å holde $n-3$ fettsyrer konstant mens $n-6$ fettsyrene økes fører til høyere $n-6$ innhold både i hele fisken og i dens celleder. Imidlertid blir ikke $n-3$ nivået i hele fisken påvirket, mens $n-3$ nivået i celleder (spesielt EPA) vil gå ned på tross av at $n-3$ holdes konstant i fôret



Figur 21 Sum av $n-6$ fettsyrer i polart og nøytralt fett i lever fra fisk gitt de fire ulike diettene. Den røde linjen illustrerer at ratio har mest å si for fettsyresammensetningen i de polare lipidene, mens mengden har mer å si for de nøytrale lipidene. Diettgruppe 1 og diettgruppe 1H har samme mengde $n-6$ i polart fett i lever, på tross av at 1H har dobbelt så mye $n-6$ i fôret, men de har lik ratio i fôret. I nøytralt fett ser vi derimot at diettgruppe 2 og 1H har ca. like mye $n-6$ i lever; disse har også lik mengde $n-6$ i fôret, mens ratioen er ulik

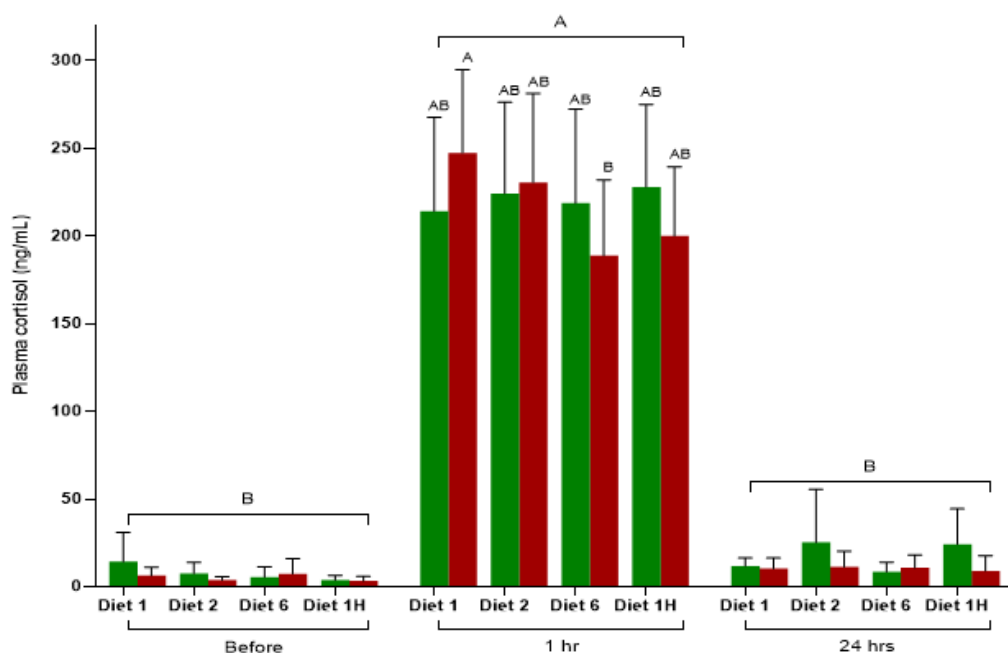
Det var forskjell mellom diettgruppene i fettakkumulering i lever (mengde triacylglycerol) i både vekstforsøket og stressforsøket (Figur 22). Nivåene lå generelt høyere i vekstforsøket, noe som er naturlig da denne fisken var større. Felles for begge forsøkene var at de høyeste fettnivåene i lever ble funnet i diettgruppe 6. Dette kan muligens ha sammenheng med redusert EPA i vevet og dermed endret eikosanoid-produksjon.



Figur 22 Triacylglycerol (TAG) i lever hos de fire ulike diettgruppene med n-6/n-3 ratio på 1, 2 og 6, samt ratio på 1 og høyere innhold av n-3 (1H), i henholdsvis vekstforsøket og stressforsøket

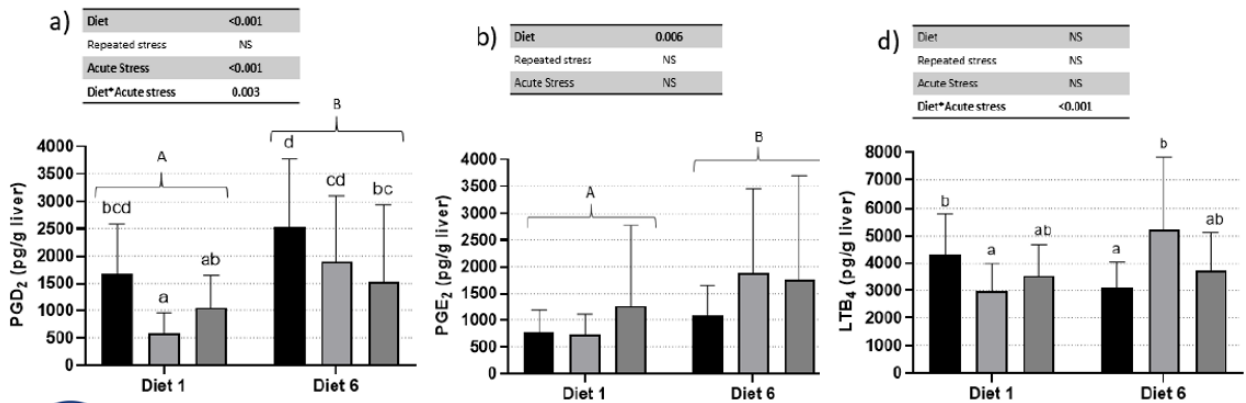
4.2.3 Stressrespons

Resultater fra plasma kortisol, glukose, klorid og hematokrit viste tydelig at fisken i alle gruppene ble stresset av det akutte stresset på slutten av forsøket. Det var en svak interaksjonseffekt mellom diett og gjentatt stress på plasma kortisol etter akutt stress, der fisken med høyest n-6/n-3 ratio (diett 6) og eksponert for gjentatt stress muligens hadde en noe redusert kortisol-respons (Figur 23). Det var imidlertid høy individuell variasjon, og diettgruppe 6 var kun signifikant forskjellig fra diettgruppe 1, ikke fra 1H som hadde den samme n-6/n-3 ratioen som gruppe 1, dermed er det vanskelig å tolke disse resultatene som en direkte konsekvens av n-6/n-3 ratio.



Figur 23 Plasma kortisol før akutt stress, 1 t etter akutt stress og 24 t etter akutt stress. Innenfor hver diettgruppe er dataene inndelt for fisk som gjennom forsøket ikke har blitt eksponert for gjentatt stress (grønne stolper) og fisk som har blitt eksponert for gjentatt stress (brune stolper)

Økt n-6 i føret ga økte nivåer av eikosanoidene PGE₂ og PGD₂ i lever, og det var også en effekt av akutt stress på begge disse (Figur 24). For LTB₄ var det en interaksjonseffekt mellom diett og akutt stress, mens det kun var effekt av akutt stress på LTB₅.

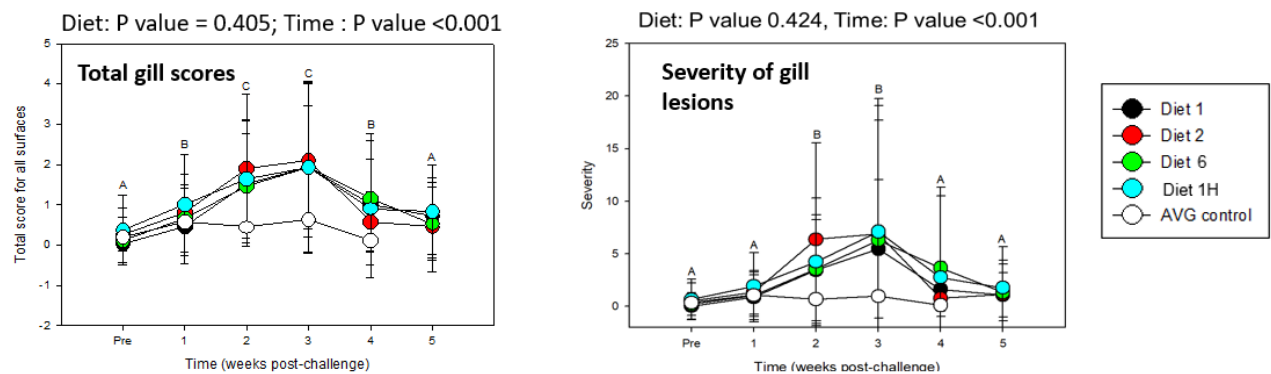


Figur 24 Eikosanoider med n-6 fettsyrer som forløper. n-3 eikosanoider er ikke vist da det ikke var dietteffekter på noen av disse

Genutrykksanalyser fra lever viste tydelige stresseffekter av akutt stress og noen interaksjonseffekter mellom diett og stress (data ikke vist her, se publisert artikkel for alle detaljer [26]). Analyser av metabolitter relatert til serotoninproduksjon og genuttrykk i hjerne viste ingen forskjeller mellom diettgruppene.

4.2.4 Smitteforsøk med AGD

AGD smitten påvirket ikke fiskens vekst i 5-ukers perioden, bortsett fra for fisken som fikk den høyeste n-6/n-3 ratioen som hadde redusert vekst sammenlignet med de andre gruppene (se Figur 18). Total gjellescore for alle gjelleoverflater og alvorligheten av gjellelesjoner økte signifikant over tid fram til 3 uker etter smitte (Figur 25). Smitteforsøket ga ingen forskjeller mellom diettgruppene i gjellescore, og disse lå på et lavere nivå enn hva man ville forventet, og gikk overraskende nedover igjen mot slutten av forsøket (gjaldt alle grupper), antakelig relatert til at vi hadde en fiskegruppe med god genetisk bakgrunn ift AGD. Smittemodellen fungerte ikke som planlagt.



Figur 25 Total gjellescore og alvorlighetsgrad av gjellelesjoner hos fisk i fem uker etter eksponering for AGD

AGD smittet påvirket mRNA transkripsjon av viktige gener involvert i immunrespons, men fôrene påvirket ikke uttrykk av disse genene. Analyse av fettsyreprofil i polare lipider fra gjellene viste det samme som i andre vev i vekstforsøket; ARA gikk opp og EPA gikk ned med økende 18:2n-6 i fôret. For å konkludere, så påvirket n-6/n-3 ratio veksten til Atlantisk laks smittet med AGD, men ikke mRNA uttrykk av immungener eller utviklingen av sykdomsbildet.

4.2.5 Oppsummering av hovedresultater AP 2

- Positiv effekt på vekst med mest EPA + DHA i fôret.
- Økt leverfett i gruppen med n-6 / n-3 forhold på 6.
- Forholdet mellom n-6 og n-3 var viktigere enn kvantitative nivåer av fettsyrene for inkorporering av fettsyrer i polare lipider, mens det motsatte var tilfellet for nøytrale lipider.
- Like nivåer av EPA, DHA og ARA og økt 18: 2n-6 i fôret førte til redusert EPA, økt ARA, mens DHA forble ganske stabil i membranlipidene.
- Akutt stress påvirket nivåene av plasmakortisol, glukose, klorid og hematocrit, men ingen dietteffekt bortsett fra gruppen som hadde den høyeste n-6 / n-3 forholdet syntes å ha en redusert kortisolrespons.
- Økt n-6 nivåer i fôr resulterte i økte nivåer av eikosanoidene PGE2 og PGD2 i leveren, og det var også effekt av akutt stress på begge eikosanoider.
- For LTB4 var det en interaksjonseffekt mellom diettsammensetning og akutt stress, mens det bare var effekten av akutt stress på LTB5.
- Infeksjonsstudien med AGD viste ingen forskjeller mellom diettgruppene i sykdomsforløp og uttrykk av gener relatert til immunrespons.

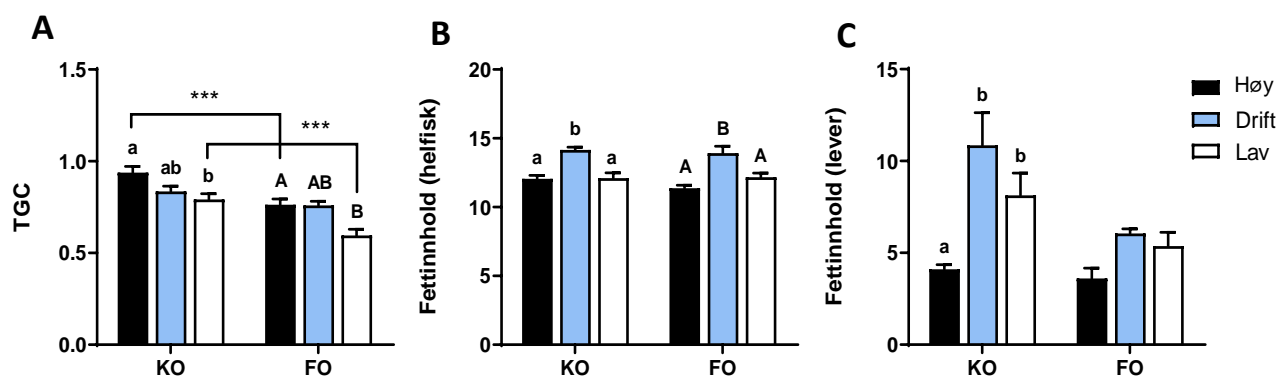
4.3 Resultat og diskusjon AP 3

4.3.1 Ferskvannsperiode: Vekst og totalt fettinnhold i helkropp og lever

Laks fra 3 ulike genetiske grupper, henholdsvis driftsfisk (Drift, ikke selektert for desaturasekapasitet), laks selektert for høy Δ -6 desaturasekapasitet (Høy) og laks selektert for lav Δ -6 desaturasekapasitet (Lav) ble fôret to ulike dietter i ferskvannsfase, enten en diett rik på fiskeolje (FO) eller en kontrolldiett rik på planteolje (miks av rapsolje og kamelinaolje (KO)).

TGC var signifikant lavere i forsøksfisk i FO gruppen sammenlignet med KO gruppen i tidlig ferskvannsfase. Innen hver diettgruppe, viste gruppen selektert for høy Δ -6 desaturasekapasitet signifikant høyere tilvekst sammenlignet med gruppen selektert for lav Δ -6 desaturasekapasitet (Figur 26A). Videre viste høy Δ -6 desaturasegruppen lavere totalt fettinnhold i helkropp og i lever sammenlignet med Driftsfisk (Figur 26B og Figur 26C). Dette tyder på at en diett rik på planteolje i tidlig ferskvannsfase har en positiv effekt på laksens tilvekst, noe som er i overensstemmelse med tidligere observasjoner i gilthead seabream (*Sparus aurata*) [37]. Hypotesen for marine larver er at en diett med lite EPA og DHA til fisk på tidlig yngelstadium fører til oppregulering av veksthormon. I overensstemmelse med denne studien i laks, er det også funnet at seabream selektert for høyere Δ -6 desaturasekapasitet har høyere vekstrate enn lavdesaturase fisk når den fôres med planteolje sammenlignet med fiskeolje [37, 38]. Disse studiene kan tyde på at høyere kapasitet til egensyntese av EPA og DHA fra 18:3n-3 (ALA) i tidlig ferskvannsfase til laksen gir bedre tilvekst.

Det er tidligere vist i en rekke studier at fôring med en diett rik på planteolje kan føre til økt risiko for utvikling av fettlever [12, 13], tilsvarende ser man i denne studien at fôring med planteolje i tidlig livsfase fører til økt nivå av fett i lever i Driftsfiskgruppen og lav Δ -6 desaturasegruppen, mens laks i høy Δ -6 desaturasegruppen som har økt evne til å produsere EPA og DHA har lavere fettinnhold i lever, tilsvarende lavt som i laksen fôret fiskeolje (FO). Dette viser at både økt egenkapasitet til syntese av EPA og DHA i lever og diett rik på EPA og DHA, begge forhindrer utvikling av fettlever i dette forsøket og videre tyder dataene på at laks selektert for høy desaturasekapasitet i lever kan fôres en diett med planteolje uten å utvikle fettlever.

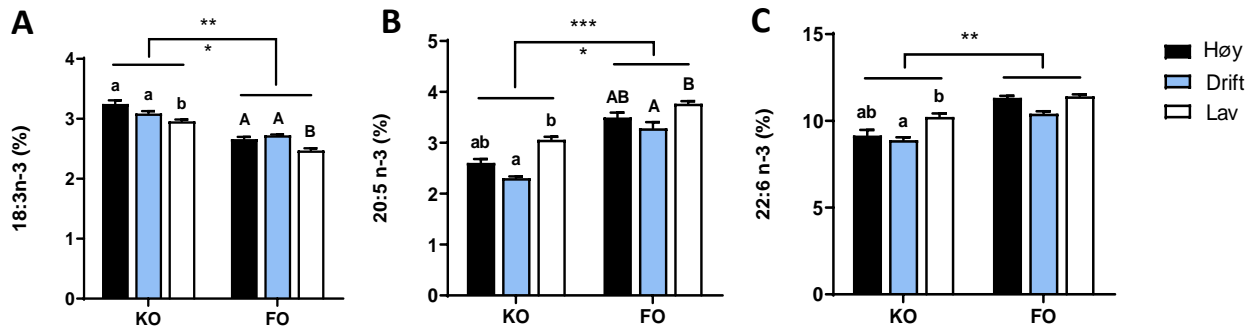


Figur 26 Vekstrate (TGC; A), totalt lipidinnhold i hele kroppen (B) og totalt lipidinnhold i leveren (C) på slutten av ferskvannsperioden (februar 2017). Data vises som gjennomsnittet \pm SEM. Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres med forskjellige bokstaver og ble bestemt ved hjelp av en toveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test. KO = planteoljekontroll, FO = fiskeoljegruppe

4.3.2 Fettsyresammensetning av helkropp og lever

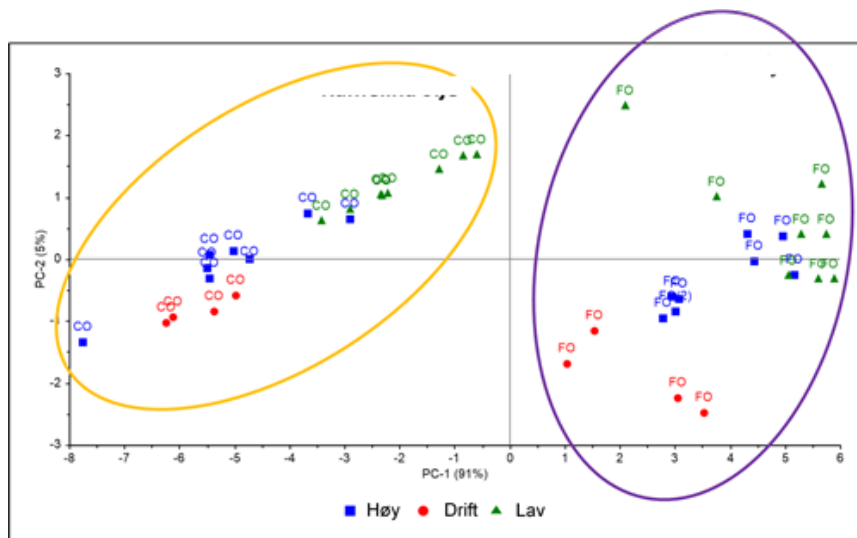
Når det gjaldt effekt av fôr, så hadde FO-diettgruppene signifikant lavere relative nivåer av 18:3n-3 i helkropp enn fisk i KO-diettgruppene, noe som er i overensstemmelse med lavere nivå av 18:3n-3 i FO dietten enn i KO dietten (Figur 27A). Videre var det som forventet høyere nivåer av EPA og DHA i FO-diettgruppene sammenlignet med KO diettgruppene.

Når det gjaldt effekt av genetikk, så var det en tendens til lavere prosentandel EPA og DHA i Driftsfisk enn i de to desaturasegruppene. Dette funnet kan være påvirket av den høyere fettprosenten i Drift gruppen som fører til en fortyningseffekt på prosentandelen av EPA og DHA relativt til andre fettsyrer (Figur 27B og 27C). Så alt i alt var det ingen store effekter på EPA og DHA nivå i helkropp mellom de genetiske gruppene.



Figur 27 18:3n-3 (ALA; A), 20:5n-3 (EPA; B) og 22:6n-3 (DHA; C) (% av totale fettsyrer) i helkropp. Data vises som gjennomsnitt \pm SEM. Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres med forskjellige bokstaver og ble bestemt ved hjelp av en toveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test. KO = planteoljekontroll, FO = fiskeoljegruppe

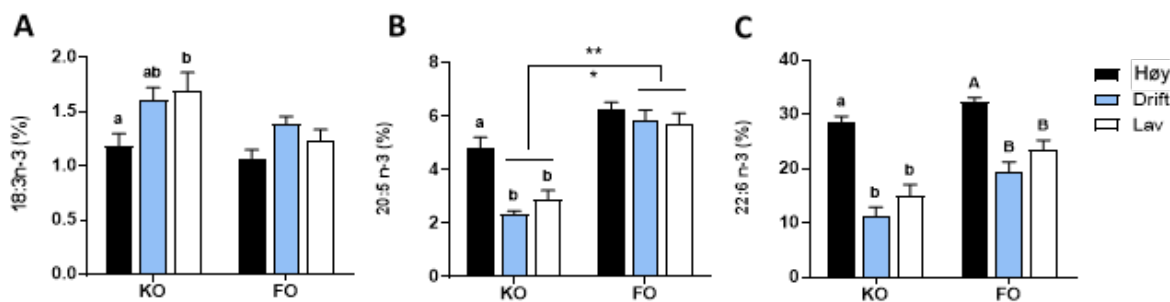
PCA-plottet viser gruppering av diettgrupper med lignende relativ total fettsyresammensetning (Figur 28). Prøver av fisk fra de tre genetiske gruppene innen en diettgruppe, enten FO eller KO dietter ble plassert sammen (markert med henholdsvis gul og blå sirkel). 91 % av variasjonen er forklart av den første hovedkomponenten (x-aksen), som distribuerte prøvene langs aksen fra fisken fôret KO i venstre kvadrant, til de fôret FO, i høyre kvadrant, noe som betyr at fôrsammensetningen har størst innvirkning på fettsyresammensetningen av helkropp. Det er også tydelig at de ulike genetiske gruppene danner clusterer, og har dermed også en påvirkning på fettsyresammensetningen (y-aksen) og forklarer ca. 5 % av forskjellene i fettsyresammensetningen.



Figur 28 Score som viser fordeling av de ulike eksperimentelle gruppene i forhold til deres totale fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i helkropp etter ferskvannsperioden. Plottet viser første hovedkomponent (PC1) v. andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 96 % av variasjonen. De forskjellige fargene i resultatplottet representerer ulike genetiske grupper analysert i de to diettgruppene. CO = planteoljekontroll, FO = fiskeoljegruppe

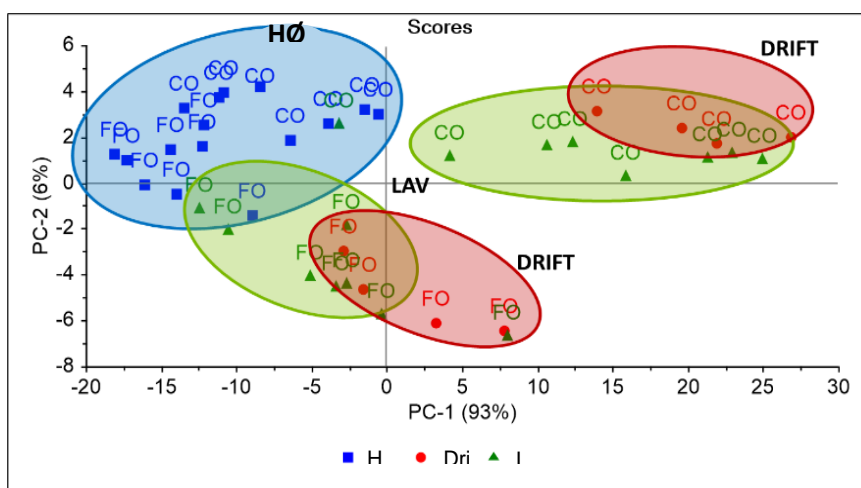
Figur 29 viser relative nivåer av 18:3n-3, EPA og DHA i lever til de ulike eksperimentelle gruppene. Både EPA og spesielt DHA-nivåene i Høy Δ -6 desaturasegruppen var høyere enn i leverne til Drifts fisk og Lav desaturasefisk (Figur 29B og 29C). Forskjellen var spesielt utpreget når forsøksfisken var fôret planteoljedietten KO, noe som tyder på at Høy desaturasefisken har bedre kapasitet til å omdanne

18:3n-3 (gjenspeiles i det lavere nivået av 18:3 i Høy gruppen fôret KO, som tyder på forbruk av denne) og det høyere nivået av EPA og DHA i Høy gruppen fôret KO.



Figur 29 Nivåer på 18:3n-3 (ALA; A), 20:5n-3 (EPA; B) og 22:6n-3 (DHA; C) (% av totale fettsyrer) i lever. Data vises som gjennomsnittet \pm SEM. Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres med forskjellige bokstaver og ble bestemt ved hjelp av en toveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test. KO = planteoljekontroll, FO = fiskeoljegruppe

En oversikt over effekten av diettsammensetning på totale fettsyresammensetning i lever til de tre genetiske gruppene er også illustrert i PCA plottet i Figur 30. Lever viste en mindre tydelig gruppering basert på diett (spesielt i høy Δ -6 desaturasegruppen), og med en mer distinkt fordeling avhengig av genetisk bakgrunn. 93 % av variasjonen er forklart av den første hovedkomponenten (x-aksen), som distribuerte prøvene langs aksen som viste en stor klynge for Høy desaturase (venstre kvadrant), som inkluderer både KO- og FO-diettgrupper. Dette er i overensstemmelse med Figur 29 som viser relativt små forskjeller i EPA og DHA nivåene til lever i høydesaturase fisken fôret FO og KO diettene, antagelig pga laksens høye kapasitet til å omdanne 18:3n-3 til EPA og DHA. Dette betyr at leverne fra laks i høydesaturasegruppen ikke skiller seg nevneverdig fra hverandre i fettsyresammensetning selv om laksen er fôret med henholdsvis planteolje og fiskeolje. Deretter er det to klynger for Drift fisk (høyre kvadrant) og Lav desaturase fisk (i midten) som i større grad er separert avhengig av diettbehandlingen.



Figur 30 Score som viser forholdet mellom genetiske grupper, diettgrupper og total fettsyresammensetning av lever (% av totale fettsyrer) i ferskvannsprøven. Første hovedkomponent (PC1) v. andre hovedkomponent (PC2), oppsummerer 99 % av variasjonen. De forskjellige fargene i resultatplottet representerer ulike prøver analysert. CO = planteoljekontroll KO, FO = fiskeoljegruppe

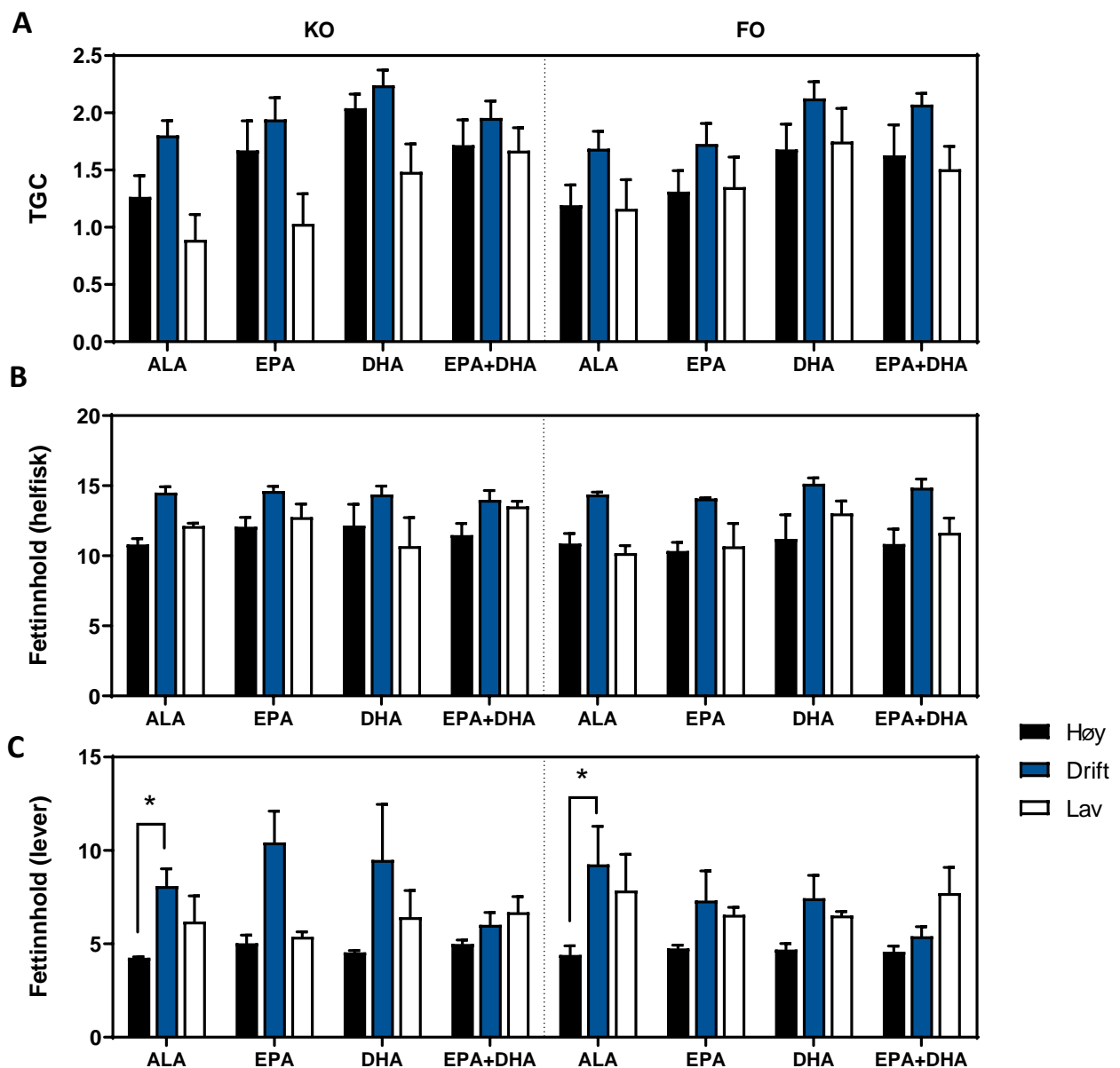
4.3.3 Sjøvannsperiode: Vekst og totalt fettinnhold i helkropp og lever

Etter ferskvannsperioden ble fisk i de ulike genetiske gruppene (tidligere fôret KO og FO diettene) overført til sjøvann og fulgt videre for å studere om det ville være en varig effekt av diettbehandlingene i ferskvannsperioden på tilvekst og kapasitet til å danne EPA og DHA i sjøvannsfasen. Og videre om ulike nivåer av n-3 fettsyrer i dietten i sjøvannsfasen påvirker vekst og fettsyremetabolisme i de ulike laksegruppene. Sagt på en annen måte, om det er en effekt av ulik fettsyresammensetning i ferskvann på senere vekst og fettsyremetabolisme i de ulike genetiske gruppene i sjøvannsfasen – såkalte «*nutritional programming og genetic programming*» effekter når laksen går over på nye kombinasjoner av n-3 fettsyrer i dietten i sjøvannsfasen.

I sjøvannsfasen ble de ulike diett- og genetikkgroppene fra ferskvannsfasen jevnt fordelt på 4 nye dietter, enten en planteoljediett anriket med camlinaolje rik på 18:3n-3 (ALA gruppe), en diett anriket med EPA (EPA gruppe), en diett anriket med DHA (DHA gruppe) og en diett anriket med en 1:1 mix av EPA:DHA (EPA+DHA gruppe).

Resultatene viste at den høyere TGC som ble funnet i i alle grupper fôret en diett rik på planteolje i ferskvannsperioden, spesielt i Høy Δ -6 desaturasegruppen, ikke ble videreført i sjøvannsfasen. Veksten i høy Δ -6 desaturase gruppen fôret KO dietten i ferskvannsfasen viste en utflating i tilvekst etter sjøvannsoverføring sammenlignet med de andre gruppene (Figur 31A), noe som tyder på at det ikke var en varig effekt av diettbehandlingene og/eller genetikkeffekter i ferskvannsperioden på tilvekst. Det var derimot en tendens til økt vekst med økende EPA og spesielt DHA i alle diettgruppene i sjøvannsfasen, men det var ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom genetiske grupper, diettgrupper og pre-diettgrupper på tilvekst og totalt fettinnhold i helkropp (Figur 31B). Det var heller ingen «*nutritional programming effect*» på fettnivå i lever (Figur 31C).

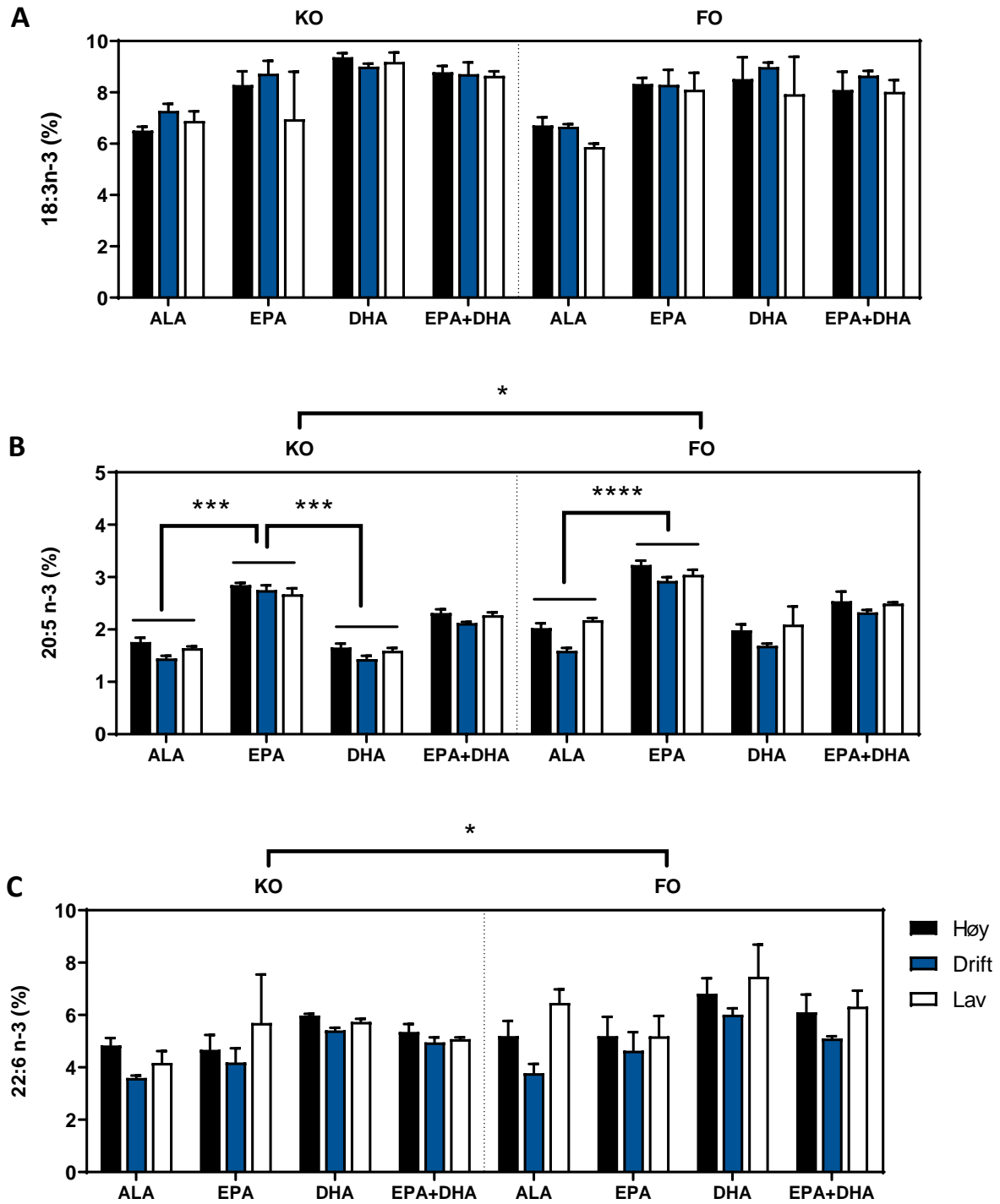
Det var en spennende effekt av genetisk bakgrunn på totalt fettnivå i leveren til laks i alle diettgrupper, og spesielt utpreget i Høy desaturasefisk fôret den planteoljerike ALA dietten. Det totale fettinnhold i lever var betydelig lavere i høy Δ -6 desaturasegruppen enn i Drift- og Lavdesaturase fisk. I Driftsfisk var det også en tendens til lavere fettprosent i lever med økende EPA og/eller DHA i fôret. Resultatene tyder på at både genetisk bakgrunn og diett påvirker fettdeponeringen i lever. Ved å selekere for laks med høy kapasitet til å syntetisere EPA og DHA i lever, så forhindres utviklingen av fettlever når laksen fôres en diett med høyt innhold av planteoljer. Det var ingen pre-diett (KO og FO fôring i ferskvannsfasen) effekt på fettdeponering i lever.



Figur 31 Vekt (TGC; A), totalt lipidinnhold i helkropp (B) og totalt lipidinnhold i leveren (C) på slutten av sjøvannsperioden (juni 2017). Data vises som gjennomsnitt \pm SEM. Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres av stjerner og ble bestemt ved hjelp av en treveis ANOVA. ALA= planteoljediett anriket med camlinaolje rik på 18:3n-3, EPA = en diett anriket med EPA, DHA = en diett anriket med DHA og EPA+DHA= en diett anriket med 1:1 mix av EPA:DHA. KO= planteolje pre-diettgrupper, FO= fiskeolje pre-diettgrupper

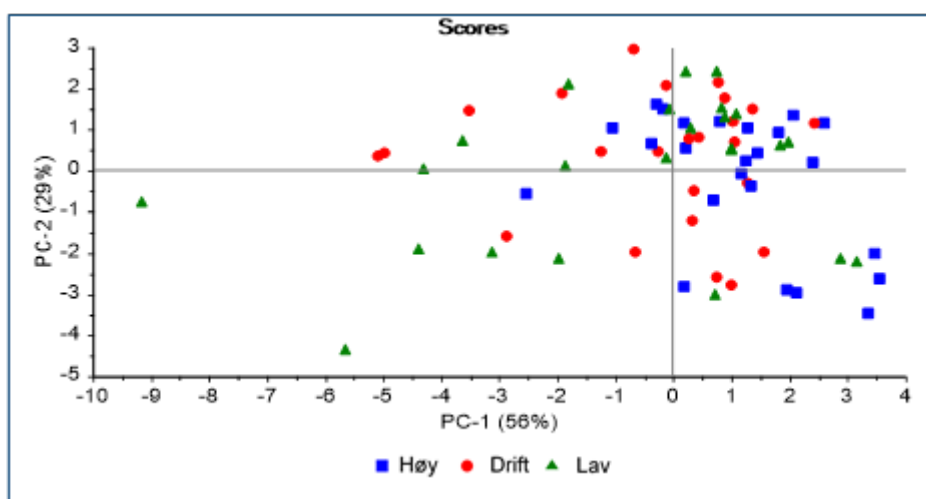
4.3.4 Fettsyresammensetning av helkropp og lever

Nivåene av 18:3n-3, EPA og DHA (i prosent av totale fettsyrer) i helkropp var ikke signifikant påvirket av genetisk bakgrunn til fisken, men nivåene av disse fettsyrene økte i helkropp med økende nivåer av disse fettsyrene i fôret i sjøvannsfasen (Figur 32A, 32B og 32C). Resultatene tydet også på en «nutritional programming effect» på fettsyresammensetning ved at både EPA- og DHA nivåene i helkropp var signifikant påvirket av pre-diett sammensetningen fra ferskvannsfasen (Figur 32B og 32C). Det var høyere nivåer av EPA og DHA i fisk fôret fiskeolje i ferskvannsdietten enn de som var fôret planteolje (KO).



Figur 32 Nivåer av 18:3n-3 (ALA; A), 20:5n-3 (EPA; B) og 22:6n-3 (DHA; C) (% av totale fettsyrer) i helkropp. ALA= planteoljediett anrikt med camlinaolje rik på 18:3n-3, EPA = en diett anrikt med EPA, DHA = en diett anrikt med DHA og EPA+DHA= en diett anrikt med 1:1 mix av EPA:DHA. KO= planteolje pre-diettgrupper, FO= fiskeolje pre-diettgrupper. Data vises som gjennomsnitt ± SEM. Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres av stjerner og ble bestemt ved hjelp av en treveis ANOVA

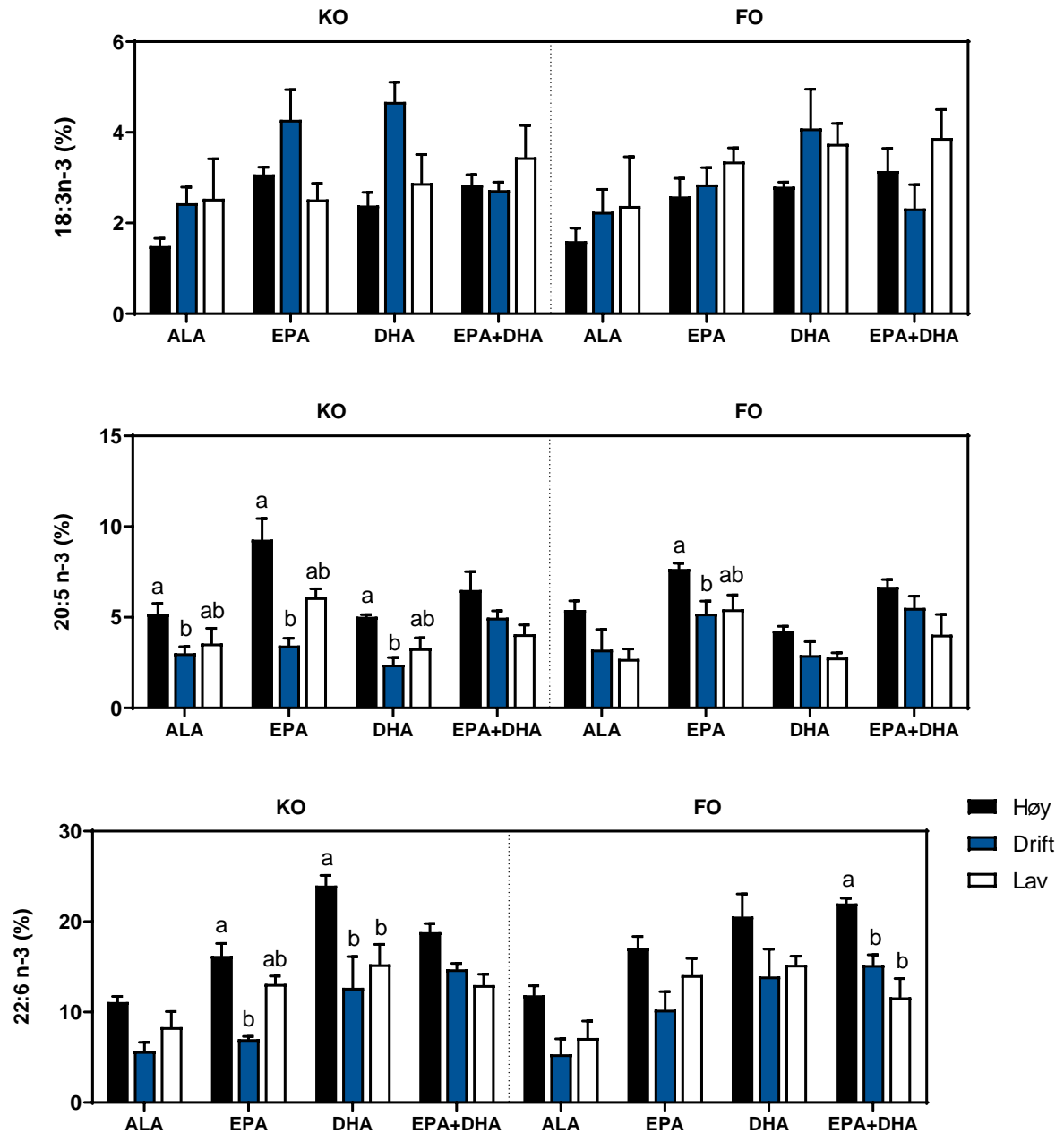
I motsetning til resultatene fra multivariatanalyse av fettsyresammensetningen i helkropp i ferskvannsperioden, viste tilsvarende PCA-plottet fra sjøvannsfasen ingen klar separasjon som følge av genetisk bakgrunn (Figur 33). 56 % av variasjonen ble forklart av den første hovedkomponenten (x-aksen), som distribuerte prøvene langs akse som grupperte de fleste prøvene fra alle genetiske grupper i høyre kvadrant. Dette tyder på at genetisk bakgrunn har større effekt på fettsyresammensetningen i helkropp i ferskvannsfasen enn i sjøvannsfasen. Dette kan tyde på at laksens egenmetabolisme er viktigere for fettsyresammensetningen til helkropp i ferskvann enn i sjøvann. Dette er i overensstemmelse med tidligere studier som viser at laksen har høyere kapasitet til å n-3 fettsyremetabolisme i ferskvann- enn i sjøvannsfasen [39].



Figur 33 Score som viser forholdet mellom genetiske grupper, diettgrupper og total fettsyresammensetning av helkropp (% av totale FA-syrer) etter sjøvannsperioden. Første hovedkomponent (PC1) v. andre hovedkomponent (PC2), oppsummerer 85% av variasjonen. De forskjellige fargene i resultatplottet representerer ulike prøver analysert

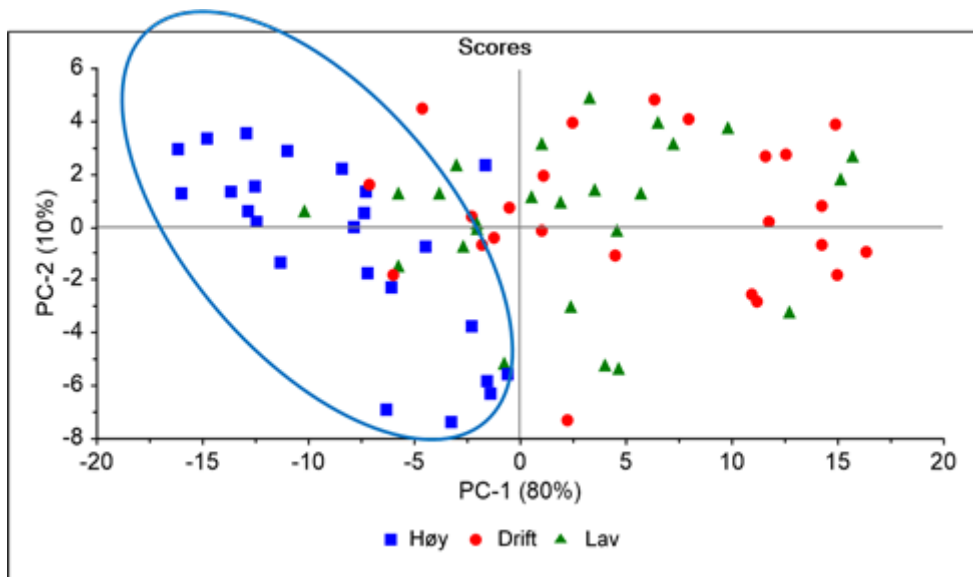
På den annen side viste leverresultatene en tydelig effekt avhengig av genetisk bakgrunn på fettsyresammensetning i sjøvannsfasen i alle diettgrupper (Figur 34). Spesielt viste høy Δ -6 desaturase gruppen betydelig høyere nivåer av EPA og DHA sammenlignet med de andre gruppene som tyder på at laks selekter for høyere Δ -6 desaturase kapasitet har større evne til å produsere EPA og DHA fra ALA i fôret (Figur 34B og 34C).

Diettsammensetning i sjøvannsfasen påvirket også EPA og DHA nivået i lever, med høyere EPA eller DHA nivåer i fisk fôret dietter rikere på EPA og/eller DHA. Det ble ikke observert noen signifikante varige pre-diett effekter av ferskvannsdiettene KO og FO.



Figur 34 Nivåer på 18:3n-3 (ALA; A), 20:5n-3 (EPA; B) og 22:6n-3 (DHA i lever; C) (% av totale fettsyrer) ALA= planteoljediett anrikt med camlinaolje rik på 18:3n-3, EPA = en diett anrikt med EPA, DHA = en diett anrikt med DHA og EPA+DHA= en diett anrikt med 1:1 mix av EPA:DHA. KO= planteolje pre-diettgrupper, FO= fiskeolje pre-diettgrupper. Data vises som gjennomsnitt ± SEM. Signifikante forskjeller ($p < 0,05$) indikeres av stjerner og ble bestemt ved hjelp av en treveis ANOVA

Multivariatanalysen viste en klar separasjon, basert på total fettsyresammensetning, av leverprøver fra høy Δ -6 desaturasegruppen i venstre kvadrant. Leverne fra Drift og Lav desaturasegruppene var hovedsakelig plassert i høyre kvadrant (Figur 35), noe som dermed tyder på få forskjeller i fettsyresammensetning mellom disse to gruppene. 80 % av variasjonen ble forklart av den første hovedkomponenten (x-aksen) og ved at Høy desaturasefisken skilte seg ut fra Drift og Høy.

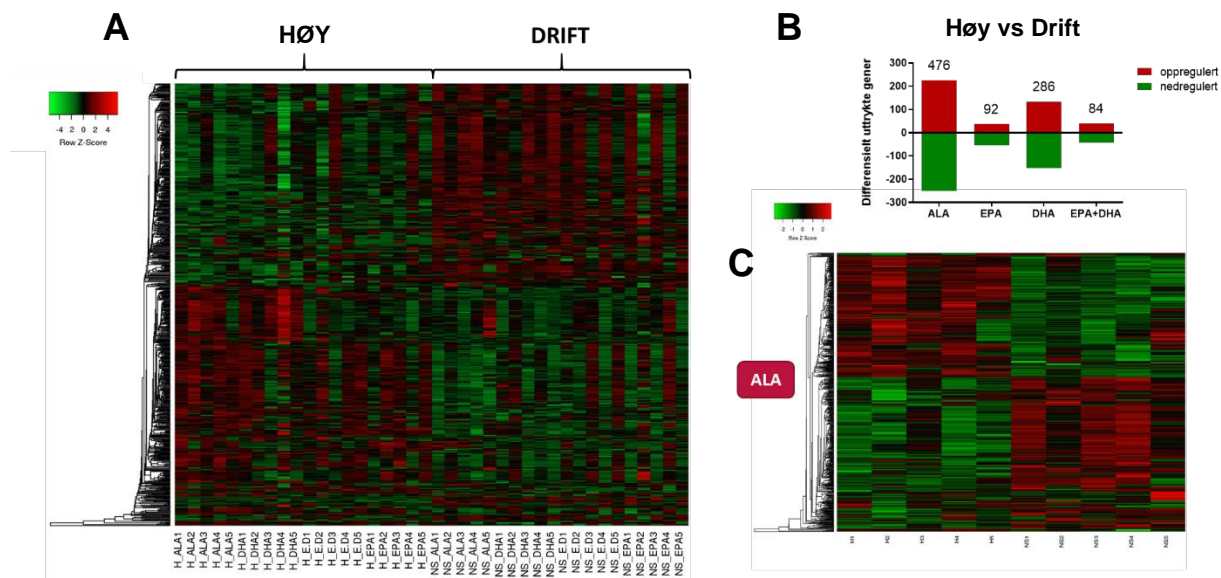


Figur 35 Score som viser forholdet mellom de ulike genetiske gruppene, diettgrupper og total fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i lever etter sjøvannsperioden. Første hovedkomponent (PC1) v. andre hovedkomponent (PC2) oppsummerer 90 % av variasjonen. De forskjellige fargene i resultatplottet representerer ulike prøver analysert

4.3.5 Genuttrykk i lever

Som vist over var det stor forskjell mellom de genetiske gruppenes fettsyresammensetning i lever, og laks selektert for Høy Δ -6 desaturase kapasitet hadde høyere nivåer av EPA og DHA og lavere nivåer av fett i lever sammenlignet med de andre gruppene. Det ble utført en microarray genuttrykksanalyse med alle diettgrupper i sjøvannsfasen og hvor høy Δ -6 desaturase gruppen ble sammenlignet med Drifts fisk (Lav desaturase gruppen ble ikke inkludert i analysen).

Mikroarrayanalysen viste stor forskjell i genuttrykk basert på genetisk bakgrunn til fisken (Figur 36A). Et stort antall gener var henholdsvis opp eller nedregulert i Høydesaturasefisk sammenlignet med Drifts-gruppen. Disse resultatene var spesielt tydelige i laks fôret en planteoljediett rik på fettsyren ALA og med lave diett nivåer av EPA og DHA (Figur 36B). Høy-desaturase fisk fôret ALA dietten viste det høyeste antall forskjellig uttrykte gener (476), etterfulgt av laks fôret den DHA rike dietten (286) og deretter den EPA rike dietten (92) og kombinasjonsdietten med både EPA + DHA (84) (Figur 36C). Mange gener relatert til lipidmetabolisme og immunfunksjon er representert (genuttrykk av enkeltgener ikke inkludert i rapport).

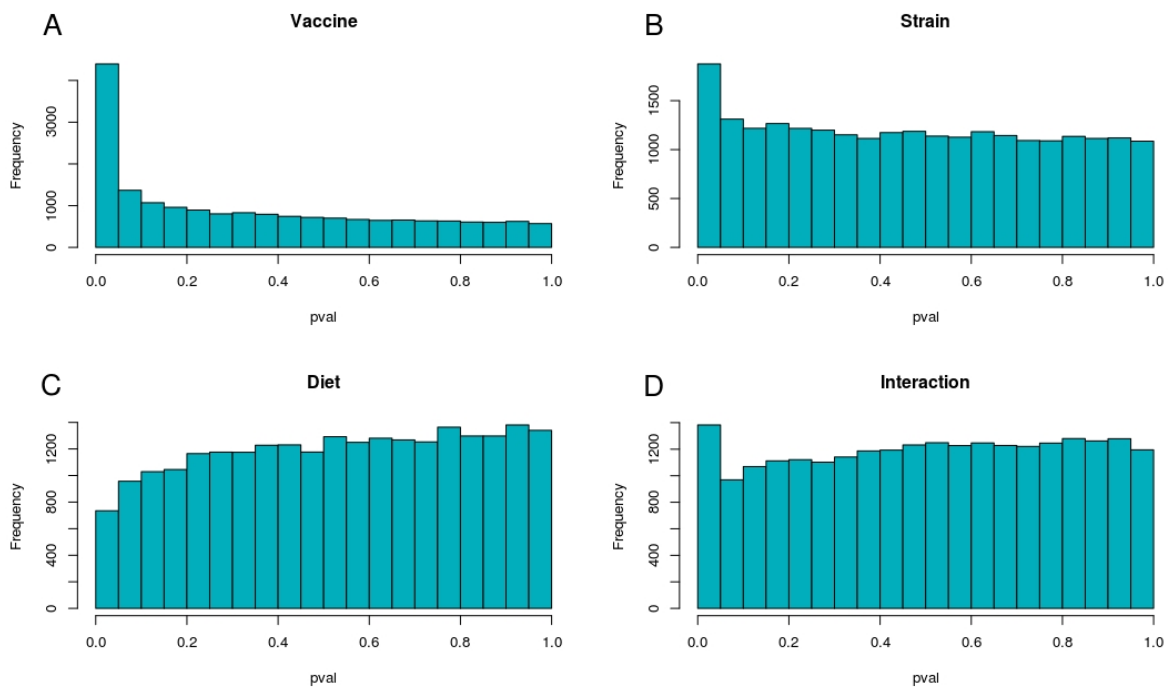


Figur 36 «Heat map» (A, alle dietter; B, ALA diett) av hierarkisk klynge av gener forskjellig uttrykt blant ulike eksperimentelle behandlinger (dietter x genetisk bakgrunn), og forskjellig uttrykte gener mellom Høy og Drift (C). ALA= planteoljediett anrikt med camlinaolje rik på 18:3n-3, EPA = en diett anrikt med EPA, DHA = en diett anrikt med DHA og EPA+DHA= en diett anrikt med 1:1 mix av EPA:DHA. Hver kolonne representerer uttrykk av de forskjellige genene individuelt. Den røde fargen indikerer oppregulerte uttrykksnivåer, mens grønn representerer nedregulerte uttrykksnivåer

4.3.6 Effekter av genetisk bakgrunn og diett på immunrespons etter vaksinerings

For å studere effekten av genetisk bakgrunn og førsammensetning i sjøvannsfasen på immunresponser ble totalt 60 fisk (15 fra hver fôrgruppe) vaksinert med en kommersiell vaksine. PBS ble injisert i 6 fisk som kontroll for vaksinasjon. Ved å måle endringer i genuttrykk i hodenyre (mye immunceller) et døgn etter vaksinasjon vil man kunne evaluere den såkalte medfødte immunresponsen. Resten av fisken gikk videre i 60 dager og vaksinespesifikke immunresponser ble analysert ved ELISA, som mål på den såkalte adaptive immunresponsen.

Det ble gjennomført 4 typer sammenlignende analyser av RNAseq dataene. Effekter av vaksinen, diett, genetisk bakgrunn og interaksjon mellom diett og genetikk ble testet vha programvaren Ballgown i R. Figur 37 viser et såkalt P-distribusjonsplot som sier noe om «signalet» i datasettet (hvor mange transkripter/gener har en lav p-verdi i testen).



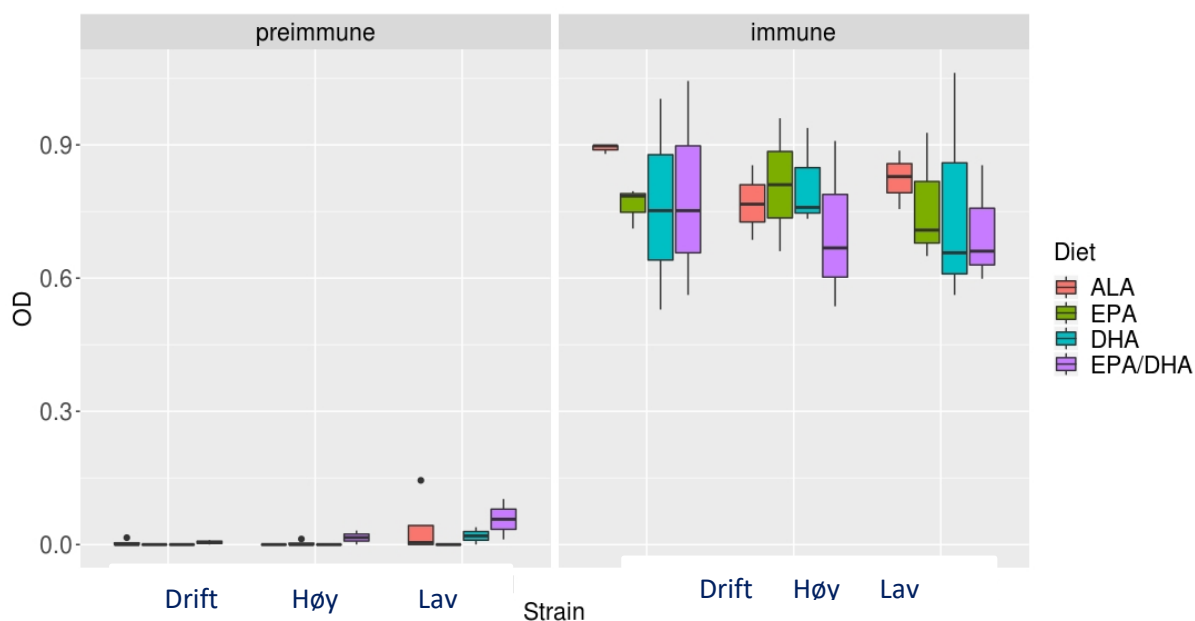
Figur 37 P-verdi fordeling. Ballgown sin stattedest funksjon ble brukt til å spesifisere hvilke variabler som skulle testes. (A) Kontroll fisk mot vaksinert, (B) Effekt av genetisk bakgrunn, (C) Effekt av diett, (D) Interaksjon mellom diett og genetisk bakgrunn

Figuren viser at vaksinasjon gir en overhyppighet av lave p-verdier (gener som er signifikant endret = $q < 0,1$) mens diett ikke resulterte i noen signifikante endringer av genekspressjon. Genetisk bakgrunn alene eller i kombinasjon med diett kunne derimot forklare endringer i en rekke transkripter, inkludert gener involvert i immunresponser (immunoglobuliner, cytokiner) (Tabell 12).

Tabell 12 Gener signifikant påvirket av en interaksjon mellom diett og genetisk bakgrunn 24 timer etter vaksinasjon med Alphaject 6

GeneID	Description	pval	qval	mean
106587643	tripartite motif-containing protein 29-like	2,60E-04	9,43E-02	63,61
100196218	Glutaredoxin-1	1,22E-05	1,33E-02	31,73
106580299	polyubiquitin-like	2,79E-04	9,68E-02	23,01
106597012	Ig kappa chain V-IV region JI-like	1,79E-04	8,55E-02	19,61
106578920	uncharacterized LOC106578920	2,09E-04	8,73E-02	12,86
100194720	uncharacterized LOC100194720	4,83E-05	3,40E-02	12,02
106576033	leukotriene A-4 hydrolase-like	3,05E-04	9,81E-02	10,89
106575428	Ig kappa chain V region K16-167-like	2,89E-04	9,79E-02	10,36
106580350	selenoprotein M-like	2,17E-04	8,79E-02	9,17
100194722	uncharacterized LOC100194722	2,70E-04	9,64E-02	7,17
106561467	uncharacterized LOC106561467	2,54E-06	5,07E-03	5,87
106590951	natterin-like protein	1,94E-04	8,73E-02	5,27
106602317	probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC6	5,49E-06	8,07E-03	5,12
106600446	C-C motif chemokine 4-like	5,46E-05	3,63E-02	4,38
106591921	probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC6	2,48E-04	9,43E-02	4,08
106575836	protein N-lysine methyltransferase METTL21A-like	2,26E-05	2,07E-02	3,91
106599799	uncharacterized LOC106599799	1,49E-05	1,55E-02	3,64
100194614	c20orf149 protein	1,11E-05	1,31E-02	3,53
106593599	uncharacterized LOC106593599	5,14E-05	3,52E-02	3,53
106596688	uncharacterized LOC106596688	3,05E-04	9,81E-02	3,32
106583825	phosphatase and actin regulator 3-like	1,60E-07	1,27E-03	3,29
106568356	fructose-1,6-bisphosphatase 1-like	1,07E-04	5,97E-02	3,05
106576451	uncharacterized LOC106576451	2,54E-06	5,07E-03	2,79
106584776	guanine nucleotide exchange factor for Rab-3A-like	8,37E-06	1,05E-02	2,21
106580462	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2-like	2,17E-05	2,07E-02	2,1
106596610	phosphatase and actin regulator 3-like	2,48E-07	1,49E-03	2,03
106591664	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5-like	3,73E-05	2,88E-02	2,03
106566659	monoacylglycerol lipase ABHD6-like	2,54E-04	9,43E-02	1,7
106588726	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12-like	3,48E-05	2,78E-02	1,54
106589432	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM39-like	2,01E-04	8,73E-02	1,52
106606801	CMRF35-like molecule 8	2,95E-04	9,79E-02	1,45
106577870	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein-like	9,23E-05	5,39E-02	1,32
106595461	putative RNA exonuclease NEF-sp	2,22E-06	5,07E-03	1,26
106591787	uncharacterized LOC106591787	2,05E-04	8,73E-02	1,23

En klar, vaksinespesifikk økning i antistoff mot en av bakteriene i Alphaject 6 vaksinen (*Aeromonas salmonicida*) kunne måles 62 dager etter vaksinasjon (Figur 38). Effekter av diett og genetikk på den adaptive immunresponsen var ikke signifikant for noen av gruppene.



Figur 38 ELISA plot. Sammenligning av *Aeromonas salmonicida* IgM titer i fisk 62 dager etter immunisering med Alphaject 6 vaksine. Plasma fra pre-immun (36 fisk) og vaksinert (immune) (36 fisk) ble brukt i ELISA. ALA= planteoljediett anrikt med camlinaolje rik på 18:3n-3, EPA = en diett anrikt med EPA, DHA = en diett anrikt med DHA og EPA/DHA= en diett anrikt med 1:1 mix av EPA:DHA. Data er målt OD justert for bakgrunn. Effekten av vaksinen var signifikant (T-test, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) mens effekter av diett eller genetisk bakgrunn var ikke signifikant (ANOVA $p = 0,78$ and $0,80$ for hhv diett og genetikk)

4.3.7 Oppsummering av hovedresultater AP 3

- Fôring med økt nivå av planteolje i ferskvannsfasen gav bedret tilvekst.
 - Ikke videreført i sjøvannsfasen (ikke «*nutritional programming effect*» på tilvekst).
 - Det var en pre-dietteffekt fra ferskvannsfasen på nivåene av EPA og DHA i sjøvannsfasen.
- I sjøvannsfasen førte økende EPA og /eller DHA nivå til økt tilvekst.
- Seleksjon for Høy Δ -6 desaturasekapasitet førte til økt syntese av EPA og DHA i laks føret en diett rik på planteolje og redusert nivå av fett i lever.
- Et stort antall gener var forskjellig uttrykt i ulike genetiske grupper laks og responsen på ulike fettsyrer i dietten var forskjellig.

Konklusjon immunrespons etter vaksinerings;

- Laksen synes å være ganske robust med hensyn på effekter av fettsyrer i dietten på immunresponser. Selv relativt lave nivåer av EPA hadde ikke målbare effekter på de målte immunresponser (genekspresjon og antistoff-respons).
- Uttrykket av en rekke gener relatert til immunforsvaret var signifikant påvirket av en interaksjon mellom diett og genetisk bakgrunn 24 timer etter vaksinasjon med Alphaject 6.
- Effekter av diett og genetikk på den adaptive immunresponsen etter 62 dager var derimot ikke signifikant for noen av gruppene.

4.4 Resultat og diskusjon AP 4

Det finnes en rekke studier som omfatter lipidernæring i salmonider, men det er fortsatt uklart om disse næringsstoffene er nødvendige på absolutt eller relativ (prosentvis) basis. I litteraturen har fetttsyrebehovet blitt uttrykt både i forhold til mengden av disse næringsstoffene i dietten (g/ kg) og / eller andelen de representerer av de totale fetttsyrene (%TFA). I denne studien var målet å teste om EPA og DHA behovet, relatert til tilvekst, blir påvirket av fettnivået i fôret. Videre var målet å studere om laks fôret lave diettnivåer av EPA og DHA vil være mindre robuste mot miljømessige stressfaktorer som hypoksi. Målet var videre å studere om fettstoffer og fettnivået i fôret påvirker sammensetning/mangfold av tarmmicrobiota.

4.4.1 Fettnivå og n-3 i fôr og tilvekst

Både fettnivå og n-3 fettstoffer i fôret påvirker vekst og fôrutnyttelse (Tabell 13). Veksten til fisk fôret høyfettdietten med høy n-3, (HL + Hn-3), var høyere enn for fisk fôret høyfettdietten med lavt n-3 (HL + Ln-3 diett), mens veksten til fisk fôret lavfettdietten med lavt n-3 (LL + Ln-3) eller lavfettdietten med høyt n-3 (LL + Hn-3) var lik, dermed viste resultatene at økt n-3 i fôret hadde kun en positiv effekt på tilvekst ved det høye fettnivået i fôret. Proteininntaket var høyere i lavfett diettgruppene og lipidinntak og VSI var høyere i høyfettdiettgruppene, noe som reflekterte makronæringsstoff-sammensetningen i fôret. Fôrintak og FCR var ikke signifikant forskjellig mellom diettgruppene. Økt vekst hos laks fôret høyfettdiettene HL + Hn-3, kan antagelig forklares med en høyere netto energiverdi i disse diettene sammenlignet med de to lavfettdiettene (med høyere protein) og lavere netto energiverdier.

Tabell 13 Vekst, fôrutnyttelse og kroppsindeks til atlantisk laks fôret lave og høye nivåer av lipider og/eller LC-PUFA (n-3). (HL-Ln3 er høy lipid og lave n-3 fettstoffer, LL-Ln3 er lav lipid og lave n-3 fettstoffer, HL-Hn3 er høy lipid og høy n-3 fettstoffer, LL-Hn3 er lav lipid og høye n-3 fettstoffer)

	Dieter				Pooled Sem	p-verdi		
	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3		Lipid	n3	Lipid x n3
Startvekt (g fisk ⁻¹)	187,7	186,4	191,7	185,0	2,3	0,160	0,676	0,293
Sluttvekt vekt (g fisk ⁻¹)	505,3 ^a	525,3 ^{ab}	552,0 ^b	524,8 ^{ab}	7,1	0,923	0,069	0,043
Vektøkning (g fisk ⁻¹)	317,6 ^a	338,9 ^{ab}	360,3 ^b	339,8 ^{ab}	8,2	0,795	0,096	0,079
Vektøkning per dag (g fisk ⁻¹ day ⁻¹)	2,74 ^a	2,92 ^{ab}	3,11 ^b	2,93 ^{ab}	0,07	0,809	0,099	0,086
Fôrintak (g fisk ⁻¹)	280,6	297,0	317,6	283,5	15,2	0,757	0,650	0,226
Protein inntak (g fisk ⁻¹)	125,1 ^a	166,0 ^b	146,5 ^{ab}	159,2 ^b	7,5	0,017	0,549	0,168
Lipid inntak (g fisk ⁻¹)	60,6 ^{ab}	54,3 ^{ab}	64,0 ^b	50,0 ^a	3,0	0,026	0,937	0,221
FCR (feed:gain)	0,88	0,88	0,88	0,83	0,03	0,639	0,618	0,655
Overlevelse (%)	98,6	95,8	97,9	98,6	1,8	0,526	0,526	0,386
HSI*	1,13	1,06	1,13	1,02	0,04	0,079	0,649	0,612
VSI*	8,45 ^b	6,83 ^a	8,67 ^c	6,98 ^{ab}	0,36	0,010	0,715	0,944

*HSI= hepatosomatisk indeks og VSI = visceral somatisk indeks

4.4.2 Helkroppssammensetning, retensjon av næringsstoff og fordøyelighet

Makronæringsstoffsammensetning av helkropp ble påvirket av fettnivået i dietten, men ikke av n-3 fettstoffer i fôret (Tabell 14). Nivåene av aske, lipid og energi var høyere, og protein lavere i

høyfettgruppene enn i lavfettgruppene. Fettsyresammensetningen (% av totale fettsyrer) i helkropp var i stor grad påvirket av fettsyresammensetningen av fôret. Lipid x n-3 interaksjon ble funnet for noen få monoene fettsyrer og n-3 PUFA (Tabell 14). Nivået av totale n-6 PUFA i helkropp ble påvirket av fettnivået i fôret, noe som resulterte i høyere prosent n-6 fettsyrer i helkropp når laksen ble fôret lavfett diettene sammenlignet med høyfett diettene. Høye diett nivåer av n-3 fettsyrer resulterte i høyere prosentandel av EPA og DHA i helkropp.

Tabell 14 Helkropp proksimat ($g\ kg^{-1}$ våtvekt basis) og fettsyre (% av totale fettsyrer) sammensetning av atlantisk laks ($n = 3$, samleprøve per kar). (HL-Ln3 er høy lipid og lave n-3 fettsyrer, LL-Ln3 er lav lipid og lave n-3 fettsyrer, HL-Hn3 er høy lipid og høy n-3 fettsyrer, LL-Hn3 er lav lipid og høye n-3 fettsyrer)

	Initial	Dietter				Pooled		p-verdi	
		HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3	Sem	Lipid	n3	Lipid x n3
Tørstoff	304	315	310	315	313	3,7	0,408	0,707	0,779
Aske	18	16 ^a	18 ^b	15 ^a	18 ^b	0,6	0,002	0,634	0,481
Protein	167	185 ^{ab}	195 ^b	182 ^a	195 ^{ab}	2,2	0,040	0,124	0,655
Lipid	101	92 ^{ab}	83 ^a	102 ^b	89 ^a	4,1	0,021	0,430	0,537
Energi (MJ kg^{-1})	8,1	8,6	8,3	8,7	8,4	1,5	0,094	0,472	0,700
<i>Fettsyrer (% av total)</i>									
14:0	3,7	1,4 ^a	1,6 ^b	1,9 ^c	2,1 ^d	0,02	<0,001	<0,001	0,376
16:0	13,5	12,4 ^a	13,1 ^b	12,8 ^{ab}	13,8 ^c	0,15	0,001	0,008	0,278
18:0	3,1	3,4 ^a	3,6 ^{ab}	3,4 ^a	3,7 ^b	0,05	0,007	0,274	0,532
20:0	0,2	0,3 ^a	0,2 ^{bc}	0,2 ^{ab}	0,2 ^c	0,00	0,002	0,077	0,696
Total mettede	21,2	17,7 ^a	18,7 ^b	18,6 ^b	20,1 ^c	0,18	<0,001	<0,001	0,220
16:1n-9	0,3	0,5 ^b	0,5 ^b	0,4 ^a	0,4 ^a	0,02	0,662	<0,001	0,773
16:1n-7	4,4	2,1 ^a	2,3 ^b	2,6 ^c	2,9 ^d	0,03	<0,001	<0,001	0,078
18:1n-9	29,9	53,1 ^c	49,4 ^b	49,1 ^b	43,6 ^a	0,18	<0,001	<0,001	0,002
18:1n-7	3,8	3,0	3,0	2,9	2,8	0,10	0,844	0,244	0,936
20:1n-9	4,2	3,5 ^b	3,4 ^b	3,2 ^a	3,1 ^a	0,05	0,103	0,001	0,855
22:1n-11	3,7	0,9 ^a	1,0 ^{ab}	1,0 ^a	1,1 ^b	0,04	0,022	0,173	0,449
22:1n-9	0,6	0,4 ^a	0,4 ^b	0,4 ^a	0,4 ^{ab}	0,01	0,014	0,253	0,803
24:1n-9	1,3	0,3 ^a	0,4 ^{ab}	0,4 ^{bc}	0,4 ^c	0,01	0,026	0,005	0,641
Total monoene	48,9	64,5 ^c	61,0 ^b	60,6 ^b	55,6 ^a	0,24	<0,001	<0,001	0,022
18:2n-6	9,8	7,9 ^a	9,4 ^b	8,2 ^a	9,8 ^c	0,11	<0,001	0,022	0,575
18:3n-6	0,2	0,3 ^b	0,4 ^c	0,2 ^a	0,2 ^a	0,01	0,008	<0,001	0,493
20:2n-6	0,7	0,8 ^a	1,0 ^c	0,8 ^b	1,1 ^d	0,02	<0,001	0,001	0,482
20:3n-6	0,2	0,7 ^c	0,8 ^d	0,4 ^a	0,5 ^b	0,02	0,001	<0,001	0,629
20:4n-6	0,4	0,4 ^b	0,5 ^c	0,3 ^a	0,3 ^{ab}	0,01	0,006	0,001	0,406
Total n-6 PUFA	11,5	10,2 ^a	12,2 ^b	10,0 ^a	12,1 ^b	0,11	<0,001	0,370	0,708
18:3n-3	3,0	1,2 ^a	1,4 ^b	2,0 ^c	2,4 ^d	0,03	<0,001	<0,001	0,004
18:4n-3	1,1	0,4 ^a	0,4 ^b	0,5 ^c	0,5 ^d	0,01	<0,001	<0,001	0,123
20:4n-3	0,8	0,3 ^a	0,3 ^b	0,4 ^c	0,5 ^d	0,01	<0,001	<0,001	0,008
20:5n-3	3,7	1,3 ^a	1,3 ^a	1,9 ^b	1,9 ^b	0,03	0,441	<0,001	0,406
22:5n-3	1,3	0,5 ^a	0,6 ^b	0,8 ^c	0,9 ^d	0,01	0,001	<0,001	0,157
22:6n-3	6,9	3,4 ^a	3,7 ^a	4,5 ^b	5,0 ^b	0,17	0,078	<0,001	0,416
Total n-3 PUFA	17,4	7,3 ^a	7,8 ^a	10,4 ^c	11,7 ^d	0,2	0,003	<0,001	0,098
Total PUFA	29,9	17,8 ^a	20,3 ^b	20,8 ^b	24,4 ^c	0,29	<0,001	<0,001	0,151
Total LC-PUFA	14,8	7,6 ^a	8,4 ^b	9,5 ^c	10,8 ^d	0,20	0,001	<0,001	0,258

Retensjonen av makronæringsstoff og totale mettede og monoumettede fettsyrer var ikke påvirket av de ulike diettsammensetningene (Tabell 15). Retensjonen av totale n-3 fettsyrer økte med økt n-3 fettsyrenivå i fôret. EPA, 22:5n-3 og 20:4n-3 retensjonen var høyere i fisk fôret høy n-3 dietter, mens DHA retensjonen var upåvirket (Tabell 15). Økt retensjon av n-3 PUFA, spesielt EPA i helkropp til laks fôret HL + Hn-3 diett, indikerer at både behov for energi og næringsstoff er dekket i denne gruppen.

Tabell 15 Retensjon (%) av makronæringsstoffer og fettsyrer i helkropp til atlantisk laks (n=3, samleprøve per kar). (HL-Ln3 er høy lipid og lave n-3 fettsyrer, LL-Ln3 er lav lipid og lave n-3 fettsyrer, HL-Hn3 er høy lipid og høy n-3 fettsyrer, LL-Hn3 er lav lipid og høye n-3 fettsyrer)

	Dietter				Pooled Sem	p-verdi ¹		
	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3		Lipid	n3	Lipid x n3
Protein	50,2 ^b	43,0 ^a	44,3 ^{ab}	44,8 ^{ab}	2,2	0,055	0,391	0,124
Lipid	46,4	48,2	53,4	57,4	5,4	0,256	0,200	0,807
Energi (MJ kg ⁻¹)	69,4	65,6	66,0	71,4	3,8	0,848	0,768	0,284
<i>Fettsyrer</i>								
14:0	38,5	39,1	47,1	50,0	8,2	0,847	0,296	0,904
16:0	52,9	51,1	56,3	64,0	6,4	0,666	0,258	0,501
18:0	66,4	68,3	63,8	81,4	6,8	0,220	0,494	0,312
20:0	30,2	25,6	33,6	32,7	4,2	0,550	0,265	0,686
Total mettede	53,8	52,7	56,1	64,5	6,5	0,602	0,328	0,498
16:1n-9	184,4	178,1	131,8	140,8	23,2	0,954	0,091	0,751
16:1n-7	39,6	41,2	49,2	55,1	7,0	0,621	0,150	0,778
18:1n-9	56,9	52,2	58,7	68,2	5,7	0,697	0,174	0,265
18:1n-7	40,3 ^a	38,1 ^a	49,3 ^{ab}	64,8 ^b	6,7	0,372	0,034	0,244
20:1n-9	268,7	220,7	223,4	197,1	24,0	0,202	0,233	0,695
22:1n-11	-41,7 ^a	-31,0 ^{ab}	-15,6 ^{bc}	-6,0 ^c	6,5	0,186	0,006	0,939
24:1n-9	-41,0 ^a	-32,5 ^{ab}	6,0 ^{ab}	12,0 ^b	12,6	0,641	0,015	0,936
Total MUFA	57,4	52,7	59,6	69,0	6,1	0,728	0,184	0,300
18:2n-6	37,3 ^a	39,6 ^a	47,4 ^{ab}	56,6 ^c	4,5	0,252	0,020	0,483
20:4n-6	258,8 ^b	289,8 ^b	79,8 ^a	92,9 ^a	27,5	0,529	0,001	0,797
Total n-6 PUFA	49,4 ^a	53,0 ^{ab}	56,8 ^{ab}	68,7 ^b	5,7	0,222	0,084	0,501
18:3n-3	14,9 ^a	17,0 ^a	33,4 ^b	39,7 ^b	2,8	0,245	<0,001	0,549
18:4n-3	7,8 ^{ab}	7,0 ^a	24,7 ^{bc}	25,9 ^c	5,1	0,970	0,862	0,590
20:4n-3	48,9 ^a	54,8 ^a	141,1 ^b	155,1 ^b	15,3	0,590	0,001	0,824
20:5n-3	10,8 ^{ab}	3,2 ^a	24,6 ^b	20,9 ^b	4,1	0,242	0,008	0,675
22:5n-3	72,8	81,0	119,2	125,4	14,8	0,678	0,026	0,955
22:6n-3	113,8	99,1	109,4	109,2	11,3	0,550	0,813	0,559
Total n-3 PUFA	39,4 ^{ab}	35,3 ^a	52,7 ^{ab}	55,3 ^b	5,5	0,895	0,02	0,586
Total PUFA	46,0	47,4	54,6	60,8	5,7	0,537	0,098	0,697
Total LC-PUFA	111,5	103,3	81,0	84,4	11,1	0,838	0,065	0,627
Total Fettsyre	55,2	51,8	58,1	66,1	6,1	0,720	0,210	0,393

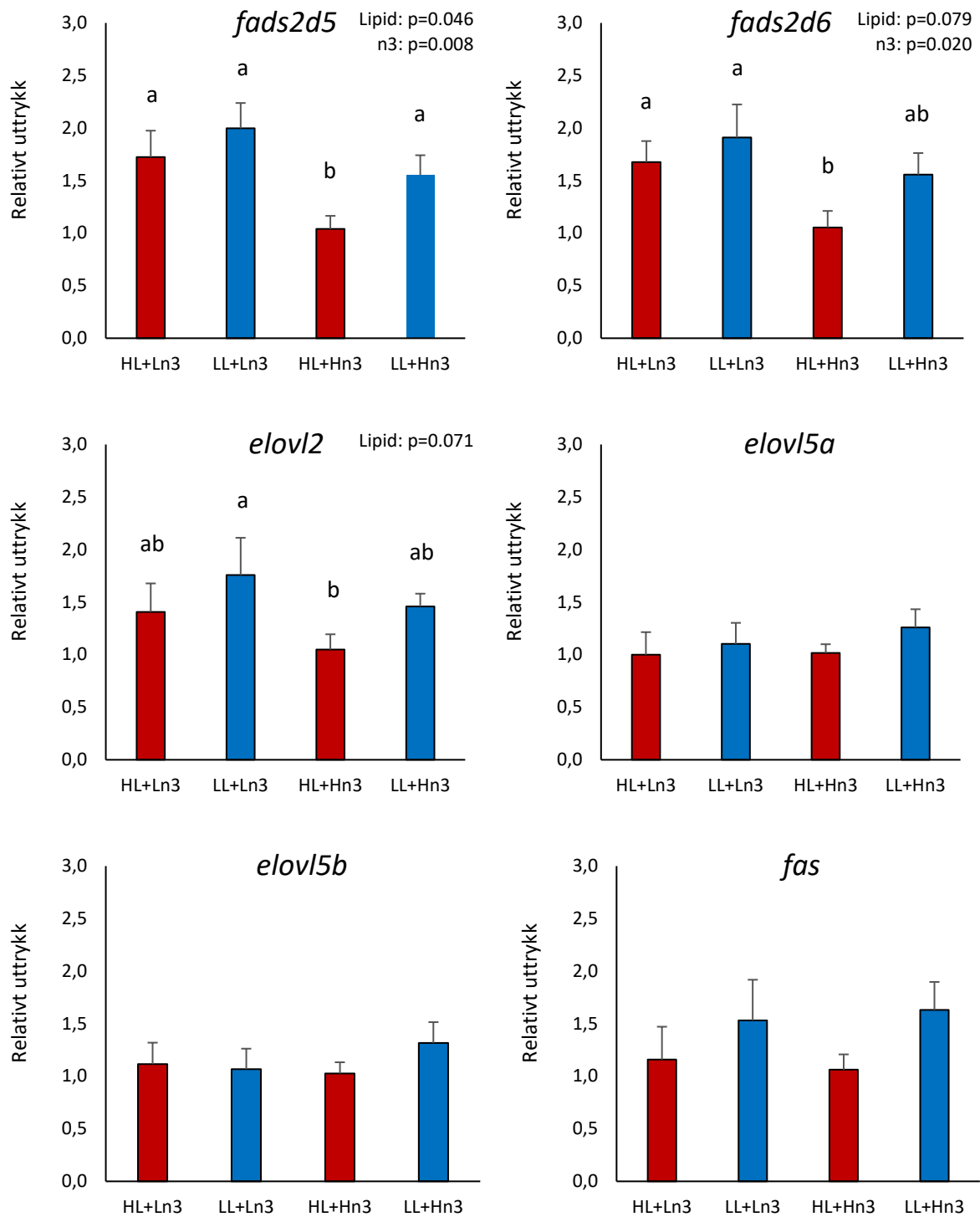
Høyfett diettene førte generelt til økt fordøyelighet av protein og energi sammenlignet med lavfett diettene (Tabell 16). En lipid x n-3 interaksjon ble funnet for protein fordøyelighet og den var signifikant høyere for HL + Hn-3 diettgruppen. Fordøyeligheten av totale n-6, n-3, PUFA og LC-PUFA, inkludert EPA og DHA var ikke påvirket av de ulike diettene.

Tabell 16 Fordøyelighet (%) av makronæringsstoffer og fettsyrer for atlantisk laks (n=3, samleprøve per kar). (HL-Ln3 er høy lipid og lave n-3 fettsyrer, LL-Ln3 er lav lipid og lave n-3 fettsyrer, HL-Hn3 er høy lipid og høy n-3 fettsyrer, LL-Hn3 er lav lipid og høye n-3 fettsyrer)

	Dietter				Pooled Sem	p-verdi ¹		
	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3		Lipid	n3	Lipid x n3
Protein	93,2 ^c	92,0 ^a	93,5 ^d	92,8 ^b	0,1	<0,001	<0,001	0,032
Lipid	98,3 ^b	97,3 ^{ab}	95,6 ^a	96,2 ^a	0,6	0,517	0,025	0,424
Energi (MJ kg ⁻¹)	89,0 ^b	87,7 ^a	88,9 ^b	88,0 ^{ab}	0,3	0,010	0,718	0,492
<i>Fettsyrer</i>								
14:0	95,0	94,8	86,7	92,0	1,7	0,393	0,104	0,418
16:0	97,8	97,1	92,8	94,4	1,1	0,725	0,043	0,497
18:0	97,1	96,1	92,0	92,9	1,3	0,988	0,045	0,616
20:0	97,3	95,7	93,0	92,8	1,4	0,613	0,051	0,684
Total mettede	97,5	96,7	92,1	93,8	1,2	0,732	0,045	0,500
16:1n-9	99,7	100,0	100,0	99,8	0,1	0,889	0,689	0,264
16:1n-7	99,6	99,3	99,1	99,3	0,1	0,823	0,153	0,202
18:1n-9	99,7	99,3	99,6	99,5	0,1	0,043	0,749	0,365
18:1n-7	99,6 ^b	99,3 ^{ab}	99,2 ^{ab}	98,9 ^a	0,1	0,137	0,042	0,898
20:1n-9	98,8	97,9	98,3	98,3	0,3	0,212	0,648	0,219
22:1n-11	98,9	98,0	98,3	98,4	0,3	0,481	0,718	0,209
24:1n-9	96,0	92,7	90,0	92,7	1,5	0,986	0,165	0,205
Total monoene	99,6	99,3	99,5	99,4	0,1	0,063	0,797	0,386
18:2n-6	99,4	99,2	99,2	99,1	0,2	0,522	0,556	0,774
20:4n-6	97,1 ^a	96,5 ^a	99,6 ^b	98,9 ^{ab}	0,7	0,457	0,017	0,928
Total n-6 PUFA	99,3	99,1	99,1	99,0	0,2	0,565	0,569	0,740
18:3n-3	99,6	99,4	99,7	99,7	0,1	0,416	0,195	0,435
18:4n-3	99,2	99,1	99,4	99,6	0,2	0,726	0,072	0,485
20:5n-3	99,7	99,6	99,8	99,8	0,1	0,707	0,155	0,774
22:5n-3	99,3	98,6	99,8	99,3	0,3	0,209	0,180	0,845
22:6n-3	98,5	98,1	99,2	99,0	0,4	0,529	0,129	0,823
Total n-3 PUFA	99,3	99,1	99,6	99,5	0,2	0,527	0,134	0,701
Total PUFA	99,3	99,1	99,3	99,3	0,2	0,552	0,646	0,676
Total LC-PUFA	98,8	98,5	99,5	99,3	0,3	0,607	0,100	0,807
Total	99,2	98,8	98,1	98,2	0,3	0,767	0,070	0,532

4.4.3 Genuttrykk lever

Uttrykk av gener relatert til lipidmetabolisme i leveren ble påvirket av fettinnhold i fôret, n-3 PUFA og/eller lipid x n-3 interaksjon (Figur 39). Lav lipid og lav n-3 dietter gav økt uttrykk av *fads2d5* ($\Delta 5$ desaturase) og *fads2d6* ($\Delta 6$ desaturase) hvor HL + Hn-3 dietten hadde signifikant lavere uttrykk. Lavfett diettgruppene viste tendens til høyere uttrykk av *elovl2* enn i lavfettgruppene.



Figur 39 Uttrykk for gener (gjennomsnitt \pm SE, n=6/behandling) i forhold til det geometriske gjennomsnittet av to referansegener (hprt og rps5) involvert i fettsyresyntese i leveren av atlantisk laks fôret lave og høye nivåer av lipider og/eller n-3 PUFA (det vil si EPA og DHA). (HL-Ln3 er høylipid og lave n-3 fettsyrer, LL-Ln3 er lavlipid og lave n-3 fettsyrer, HL-Hn3 er høylipid og høy n-3 fettsyrer, LL-Hn3 er lavlipid og høye n-3 fettsyrer)

Konklusjon: Det signifikante samspillet mellom diettnivåer av lipid og n-3 PUFA på vekst i denne studien gir en indikasjon om at behovet for n-3 PUFA i atlantisk laks må sees i forhold til det totale lipidnivået i dietten. Ut fra denne studien anslås det at behovet for EPA og DHA defineres mellom 5 % og 7 % av totale fettsyrer i dietten. Dette behovet er imidlertid basert vekstrespons i forsøk under ideelle forhold, og som tidligere diskutert vil behovet for essensielle fettsyrer kunne variere avhengig av miljøbetingelser [3].

4.4.4 Effekt av hypoksisstress på tilvekst, fôrutnyttelse og microbiota

De 4 ulike diettgruppene, HL-Ln3 (HL), LL-Ln3 (LL), HL-Hn3 (HL+), LL-Hn3 (LL+) ble utsatt for hypoksisstress og effekter av diettsammensetning og stress på tilvekst, fôrutnyttelse og microbiotasammensetning ble registrert. Karene med lavt oksygen (hypoksi) hadde oksygeninnhold på $77,96 \pm 2,32$ % ($6,71 \pm 0,20$ mg/l) sammenlignet med $92,56 \pm 2,66$ % ($8,00 \pm 0,23$ mg/l) i karene med standard oksygeninnhold.

Hypoksisstress førte til redusert vekst i alle diettgrupper, noe som antagelig kan forklares med det reduserte fôrinntaket i disse gruppene (Tabell 16). Høyfettfôrene forbedret derimot både protein- og energiutnyttelsen (Tabell 17) i fisken og høyfettfôr alene eller i kombinasjon med høyt nivå av n-3 fettsyrer bedret tilveksten under hypoksisstress (Tabell 16). Hypoksisstress påvirket ikke fordøyelighet av makronæringsstoff og fettsyrer i de ulike diettgruppene (Tabell 18).

Resultatene tyder på at ytelsen til laksen under hypoksisstress er mest avhengig av energiinntak og i mindre grad inntak av n-3 fettsyrer.

Tabell 17 Vekst, fôreffektivitet og kroppsindeks for atlantisk laks ($n=3$, kar per behandling) fôret lave og høye nivåer av lipider og/eller n3 LC-PUFA under lave- og høye oksygenforhold

	Std, Oksygen HL-Hn3 (kontrol)	Lavt Oksygen				Sem	p-verdi ¹			
		HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3		Lipid	n3	Oksygen	Lipid x n3
Start vekt (g)	191,7 ^a	181,8 ^b	178,5 ^b	181,5 ^b	178,5 ^b	1,8	0,087	0,954	0,003	0,919
Sluttvekt (g)	552,0 ^a	477,6 ^b	435,8 ^c	500,6 ^b	471,4 ^{bc}	10,3	0,015	0,036	0,023	0,611
veiktøkning (g)	360,3 ^a	295,8 ^{bc}	257,4 ^c	319,1 ^{ab}	292,9 ^{bc}	11,3	0,028	0,042	0,065	0,636
Fôrinntak (g fisk ⁻¹)	317,6 ^a	247,2 ^{bc}	210,3 ^c	273,4 ^{ab}	246,8 ^{bc}	12,1	0,054	0,057	0,083	0,728
Protein inntak (g fisk ⁻¹)	146,5 ^a	110,2 ^c	117,6 ^{bc}	126,1 ^{abc}	138,6 ^{ab}	5,8	0,187	0,026	0,097	0,724
Lipid inntak (g fisk ⁻¹)	66,7 ^a	53,4 ^b	38,5 ^c	57,4 ^{ab}	43,5 ^c	2,5	0,001	0,155	0,076	0,871
FCR	0,88	0,84	0,82	0,86	0,84	0,02	0,621	0,492	0,661	0,921
Overlevelse (%)	97,9	100,0	97,2	100,0	100,0	0,7	0,143	0,143	0,163	0,143
HSI ²	1,13	1,14	1,23	1,07	1,07	0,02	0,694	0,301	0,639	0,737
VSI ²	8,67	9,69	9,05	8,54	7,96	0,04	0,454	0,189	0,921	0,971

FCR; feed conversion ratio, HSI; hepatosomatisk indeks; n3 LC-PUFA; n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (EPA og DHA), VSI; viscerosomatic indeks.

Tabell 18 Retensjon (% av våtvekt) av makronæringsstoffer og fettsyrer (% av totale) i helkropp til atlantisk laks (n = 3, samlet per kar) føret høye og lave nivåer av lipider og / eller n-3 LC-PUFA under lave og høye oksygen-nivå

	Høy Oksygen	Low Oksygen				Sem	p-verdi ¹			
	HL-Hn3 (control)	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3		Lipid	n3	Oksygen	Lipid x n3
Protein	44,3 ^{bc}	54,2 ^a	43,5 ^c	49,9 ^{ab}	44,4 ^{bc}	1,8	0,022	0,493	0,064	0,258
Lipid	53,4	55,4	44,1	55,6	44,3	4,3	0,056	0,970	0,775	0,990
Energi (MJ kg ⁻¹)	43,1 ^{ab}	47,7 ^a	40,2 ^b	47,1 ^a	42,0 ^b	1,9	0,040	0,820	0,304	0,663
<i>Fettsyrers²</i>										
14:0	47,1 ^a	42,1 ^a	5,0 ^b	44,7 ^a	31,1 ^{ab}	8,4	0,019	0,144	0,851	0,223
16:0	56,3	57,0	44,1	57,2	46,5	4,5	0,048	0,813	0,904	0,843
18:0	63,8	70,6	61,5	63,1	58,0	4,7	0,212	0,329	0,931	0,714
20:0	33,6 ^a	35,7 ^a	20,2 ^b	33,7 ^a	21,3 ^b	3,3	0,003	0,909	0,996	0,676
Totalt mettede	56,1	58,1	44,7	56,5	46,2	4,7	0,051	0,996	0,957	0,776
16:1n-9	131,8 ^b	182,5 ^a	151,0 ^{ab}	138,5 ^{ab}	112,7 ^b	15,0	0,096	0,025	0,767	0,855
16:1n-7	49,2 ^a	45,1 ^a	23,6 ^b	50,9 ^a	35,3 ^b	6,0	0,019	0,219	0,861	0,668
18:1n-9	58,7	64,2	52,1	60,3	54,6	4,3	0,091	0,890	0,817	0,515
18:1n-7	49,3 ^{ab}	46,9 ^{ab}	32,5 ^b	54,2 ^a	50,2 ^{ab}	6,1	0,183	0,080	0,605	0,436
20:1n-9	223,4 ^{ab}	302,8 ^a	208,2 ^b	217,7 ^b	152,0 ^b	24,3	0,012	0,023	0,883	0,597
22:1n-11	-15,6 ^a	-30,3 ^a	-66,7 ^b	-9,7 ^a	-29,3 ^a	10,9	0,030	0,026	0,715	0,463
24:1n-9	6,0 ^a	-39,0 ^{ab}	-69,9 ^b	2,8 ^a	-28,2 ^{ab}	16,3	0,097	0,033	0,896	0,996
Total monoene	59,6	64,9	51,3	61,4	54,3	4,6	0,071	0,962	0,813	0,544
18:2n-6	47,4	44,0	40,2	50,6	46,7	3,7	0,374	0,142	0,592	0,989
20:4n-6	79,8 ^b	373,8 ^a	318,3 ^a	97,8 ^b	109,2 ^b	27,0	0,559	<0,001	0,734	0,382
Total n-6 PUFA	56,8	58,4	54,2	60,6	57,8	4,9	0,521	0,597	0,621	0,896
18:3n-3	33,4 ^a	20,3 ^{bc}	12,5 ^c	36,2 ^a	31,1 ^{ab}	3,8	0,143	0,002	0,639	0,749
18:4n-3	24,7 ^a	21,8 ^a	-14,8 ^b	30,3 ^a	17,4 ^a	6,5	0,005	0,014	0,572	0,116
20:5n-3	24,6 ^a	11,2 ^b	-10,3 ^c	25,2 ^a	14,6 ^{ab}	3,2	0,002	<0,001	0,915	0,189
22:5n-3	119,2 ^a	109,5 ^a	39,8 ^b	121,0 ^a	96,3 ^{ab}	19,3	0,049	0,138	0,954	0,310
22:6n-3	109,4 ^{ab}	128,9 ^a	72,8 ^b	109,7 ^{ab}	84,1 ^b	11,2	0,007	0,753	0,989	0,240
Total n-3 PUFA	52,7 ^a	47,6 ^a	19,8 ^b	54,3 ^a	42,0 ^a	6,2	0,012	0,052	0,867	0,265
Total PUFA	54,6	54,7	44,0	57,5	48,8	5,3	0,117	0,516	0,729	0,857
Total LC-PUFA	81,0 ^b	131,8 ^a	84,9 ^b	82,4 ^b	66,9 ^b	10,8	0,026	0,018	0,218	0,218
Total	58,1	62,3	48,9	59,8	51,4	4,7	0,064	0,997	0,821	0,647

Tabell 19 Fordøyelighetskoeffisienter (tørrstoffgrunnlag) av makronæringsstoffer og fettsyrer (% av totale) for atlantisk laks (n = 3, samlet per kar) føret lave og høye nivåer av lipider og / eller n-3 LC-PUFA under lave og høye oksygenforhold

	Høy oksygen	Lav oksygen				Sem	p-verdi ¹			
	HL-Hn3 (kontrol)	HL-Ln3	LL-Ln3	HL-Hn3	LL-Hn3		Lipid	n3	Oksygen	Lipid x n3
Protein	93,6	94,3	93,8	94,0	94,0	0,2	0,272	0,887	0,198	0,199
Lipid	96,1 ^a	97,6 ^a	93,6 ^b	96,9 ^a	93,0 ^b	0,5	<0,001	0,242	0,147	0,710
Energi (MJ kg ⁻¹)	88,9 ^b	90,6 ^a	90,4 ^a	89,8 ^a	89,8 ^a	0,2	0,731	0,038	0,077	0,835
<i>Fettsyrer</i>										
14:0	86,7	95,3	91,2	92,8	86,8	2,2	0,114	0,262	0,177	0,768
16:0	92,8 ^{bc}	97,6 ^a	93,5 ^{abc}	95,3 ^{ab}	88,9 ^c	1,2	0,005	0,042	0,250	0,463
18:0	92,0 ^{ab}	96,6 ^a	91,0 ^b	94,4 ^{ab}	85,7 ^c	1,4	0,002	0,046	0,330	0,366
20:0	93,0 ^{ab}	96,4 ^a	86,1 ^{bc}	93,4 ^{ab}	84,7 ^c	2,1	0,002	0,380	0,907	0,736
Total mettede	92,1 ^{bc}	97,3 ^a	92,7 ^{abc}	94,9 ^{ab}	88,0 ^c	1,3	0,006	0,054	0,253	0,501
16:1n-9	100,0 ^a	99,7 ^b	98,7 ^c	100,0 ^a	100,0 ^a	0,1	0,001	<0,001	0,999	0,001
16:1n-7	99,1 ^{abc}	99,5 ^a	98,6 ^{bc}	99,3 ^{ab}	98,4 ^c	0,2	0,006	0,431	0,590	0,918
18:1n-9	99,6 ^a	99,6 ^a	98,7 ^b	99,6 ^a	98,5 ^b	0,2	<0,001	0,569	0,874	0,718
18:1n-7	99,2 ^{ab}	99,5 ^a	98,5 ^b	99,3 ^a	97,3 ^c	0,2	<0,001	0,010	0,768	0,060
20:1n-9	98,3 ^a	98,5 ^a	94,7 ^b	98,2 ^a	95,3 ^b	0,5	<0,001	0,786	0,882	0,467
22:1n-11	98,3 ^a	98,5 ^a	95,5 ^b	98,5 ^a	95,9 ^b	0,6	0,002	0,783	0,810	0,767
24:1n-9	90,0 ^{ab}	95,9 ^a	90,3 ^{ab}	92,6 ^a	85,1 ^b	1,9	0,014	0,081	0,424	0,665
Total monoene	99,5 ^a	99,6 ^a	98,5 ^b	99,5 ^a	98,3 ^b	0,2	<0,001	0,446	0,960	0,697
18:2n-6	99,2 ^a	99,3 ^a	98,4 ^b	99,2 ^a	98,2 ^b	0,1	<0,001	0,435	0,817	0,804
20:4n-6	99,6 ^a	97,5 ^b	90,5 ^c	99,1 ^a	97,3 ^b	0,4	<0,001	<0,001	0,516	<0,001
Total n-6 PUFA	99,1 ^a	99,3 ^a	98,2 ^b	99,2 ^a	98,1 ^b	0,2	<0,001	0,563	0,757	0,983
18:3n-3	99,7 ^a	99,5 ^{ab}	99,0 ^c	99,7 ^a	99,3 ^{bc}	0,1	0,001	0,036	0,755	0,628
18:4n-3	99,4 ^a	99,2 ^a	98,7 ^b	99,7 ^a	99,3 ^a	0,1	0,008	0,006	0,255	0,735
20:5n-3	99,8 ^a	99,6 ^b	99,1 ^c	99,8 ^a	99,5 ^b	0,0	<0,001	<0,001	0,913	0,080
22:5n-3	99,8 ^a	99,8 ^a	98,1 ^b	99,4 ^{ab}	98,7 ^{ab}	0,4	0,036	0,769	0,483	0,278
22:6n-3	99,2 ^a	98,5 ^b	95,5 ^d	99,1 ^{ab}	97,6 ^c	0,2	<0,001	<0,001	0,696	0,003
Total n-3 PUFA	99,6 ^a	99,3 ^a	98,0 ^c	99,6 ^a	98,9 ^b	0,1	<0,001	<0,001	0,972	0,024
Total PUFA	99,3 ^a	99,3 ^a	98,1 ^b	99,4 ^a	98,5 ^b	0,1	<0,001	0,122	0,884	0,331
Total LC-PUFA	99,5 ^a	98,9 ^b	96,6 ^c	99,4 ^a	98,5 ^b	0,1	<0,001	<0,001	0,790	0,001
Total	98,1 ^{ab}	99,2 ^a	97,5 ^{bc}	98,6 ^{ab}	96,3 ^c	0,4	0,001	0,067	0,404	0,451

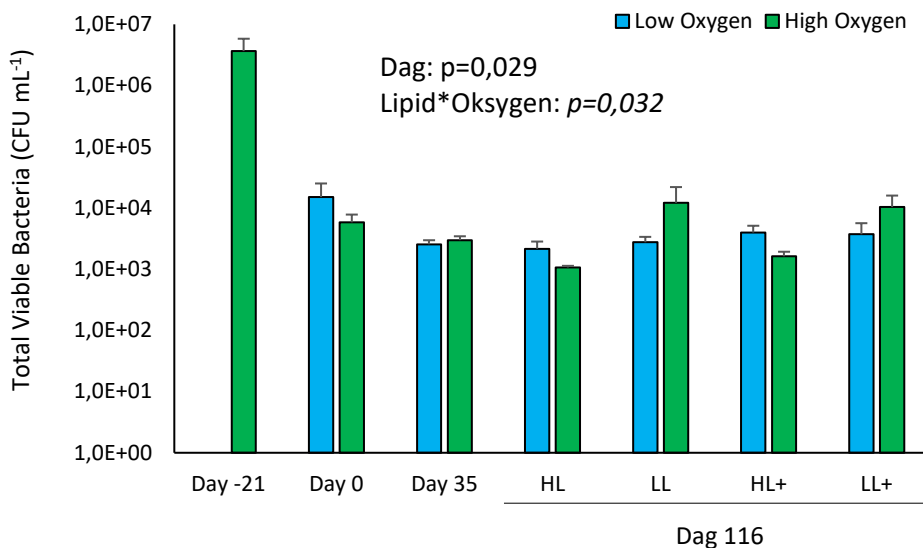
4.4.5 Hypoksisstress og effekter på tarmmikrobiota

De 4 ulike diettgruppene, HL-Ln3 (HL), LL-Ln3 (LL), HL-Hn3 (HL+), LL-Hn3 (LL+) ble utsatt for hypoksisstress og effekter av diettsammensetning og stress på sammensetning av mikrobiota ble analysert.

Levedyktige platetall av bakterier

Totalt antall aerobe bakterier dyrket på tryptone soya agar (TSA) ble signifikant redusert i løpet av eksperimentet fra $3,7 \pm 2,2 \times 10^6$ CFU (Colony-Forming Unit) ml⁻¹ på dag -21 sammenlignet med 4,2

$\pm 1,0 \times 10^3$ CFU ml⁻¹ på dag 116 (Figur 40). Ingen signifikante effekter av fettnivå og n-3 fettsyreinnhold i fôret eller oksygenivå ble funnet, med unntak av en signifikant lipid X oksygeninteraksjon på dag 116. Fisk fôret lavfett diett og holdt ved standard oksygenmetning hadde høyere bakterietall i baktarm. Totalt antall melkesyrebakterier, dyrket på MRS (Man Rogosa and Sharp) Agar, forble det samme gjennom hele eksperimentet (data ikke vist). Ingen signifikante effekter av fettnivå og n-3 fettsyrer i dietten og oksygenivå eller interaksjoner mellom de tre faktorene ble funnet.



Figur 40 Totalt antall levedyktige bakterier dyrket på TSA-plater. Faecesprøver ble samlet fra baktarmen til laks fôret de 4 ulike diettene og holdt ved standard eller lavt oksygenivå. Fisk ble tatt prøve av ved henholdsvis; -21 (N=9), 0 (N=23), 35 (N=48) og 116 dager (N=55). Y-aksen er log-skala. LL-= er lavfett + lav n-3 fettsyrer, LL+= lavfett + høy n-3 fettsyrer, HL+= høyfett + høy n-3 fettsyrer, HL= høyfett og lav n-3 fettsyrer.

Alpha-diversitet av 16S rRNA gensekvenser

Under hypoksisstress, økte generelt alfa-diversiteten («Alpha diversity = Variation of microbes in a single sample») til baktarmsbakteriene når laks ble føret høyfettdietter og alfa-diversiteten ble redusert når laks ble føret med lavfettdietter. Generelt økte også alfa-diversiteten når fisk ble føret lave n-3 dietter (Tabell 20). Fisk føret høyfettdiett med lavt nivå av n-3 fettsyrer i dietten hadde den høyeste alfa-diversiteten både etter 35 dager (Tabell 20) og etter 116 dager under hypoksisstress og etter 116 dager ved standard oksygenivå (Tabell 21).

Tabell 20 Alpha-diversitet til tarmbakterier (n=9) føret høyfett (HL) eller lavfett (LL) med høye eller lave nivåer av n-3 fettsyrer (+) i 35 dager (LL= er lavfett + lav n-3 fettsyrer, LL+= lavfett + høy n-3 fettsyrer, HL+ =høyfett + høy n-3 fettsyrer, HL= høyfett og lav n-3 fettsyrer)

	Dag0*	Std Oksygen				Høyt Oksygen				Pooled Sem	p-verdi			
		HL	LL	HL+	LL+	HL	LL	HL+	LL+		Lipid	n-3	Oksygen	X
Dekning (%)	96,5	96,6 ^{ab}	96,2 ^{ab}	96,4 ^{ab}	97,0 ^{ab}	95,7 ^a	97,2 ^b	96,5 ^{ab}	97,3 ^b	0,4	0,025	0,202	0,467	ns
Antall OTU ¹	478	525 ^{ab}	541 ^b	538 ^{ab}	466 ^{ab}	626 ^b	412 ^a	506 ^{ab}	392 ^a	46	0,009	0,188	0,250	ns
Shannon ²	3,02	4,03 ^c	3,64 ^{abc}	3,68 ^{bc}	3,64 ^{bc}	3,87 ^{bc}	3,18 ^{ab}	3,78 ^{bc}	2,85 ^a	0,21	0,012	0,331	0,081	ns
Chao-1 ³	1202	1232 ^{abc}	1334 ^{bc}	1221 ^{abc}	1019 ^{abc}	1469 ^c	925 ^{ab}	1211 ^{abc}	886 ^a	139	0,020	0,158	0,377	ns

*alle indeksene var like mellom dag 0 og 35, men begge var signifikant forskjellige ($p < 0,05$) i tarmbakterier på dag 116. ¹OTUer = Operasjonell taksonomisk enhet (OTU). OTU brukes til å kategorisere bakterier basert på sekvenslikhet. ²Shannon mangfoldsindeks brukes ofte til å karakterisere artsmangfold i et samfunn. ³Chao 1 Index ("Chao1") = det forventede antallet taxa i et utvalg ved å ekstrapolere ut antall sjeldne organismer som kan ha blitt utelatt.

Tabell 21 Alpha-diversitet til tarmbakterier (n=9) føret høyfettdiett (HL) eller lavfettdiett (LL) med høye eller lave nivåer av n-3 fettsyrer (+) i 116 dager (LL= er lavfett+ lav n-3 fettsyrer, LL+= lavfett + høy n-3 fettsyrer, HL+ =høyfett + høy n-3 fettsyrer, HL= høyfett og lav n-3 fettsyrer)

	Diett	Kar	Std Oksygen				Høyt Oksygen				Pooled Sem	p-verdi			
			HL	LL	HL+	LL+	HL	LL	HL+	LL+		Lipid	n-3	Oksygen	X
Dekning (%)	96,3	66,1	98,0 ^{bc}	98,1 ^{bc}	98,2 ^{bc}	98,5 ^c	96,6 ^a	97,2 ^{ab}	98,6 ^c	98,2 ^{bc}	0,4	0,645	<0,001	0,068	n-3xO
Antall OTU ¹	584	3599	370 ^b	330 ^b	324 ^b	284 ^a	562 ^c	412 ^{bc}	234 ^a	349 ^b	52	0,960	0,001	0,250	ns
Shannon ²	3,62	7,60	2,86 ^{bc}	2,47 ^b	2,38 ^{ab}	2,64 ^b	3,63 ^c	2,43 ^b	1,67 ^a	2,94 ^{bc}	0,24	0,765	0,040	0,857	Lxn-3
Chao-1 ³	994	11548	594 ^{ab}	540 ^{ab}	530 ^{ab}	445 ^a	961 ^c	795 ^{bc}	425 ^a	532 ^a	135	0,818	<0,001	0,061	ns

¹OTUer = Operasjonell taksonomisk enhet (OTU). OTU brukes til å kategorisere bakterier basert på sekvens likhet. ²Shannon mangfoldsindeksen brukes ofte til å karakterisere artsmangfold i et samfunn. ³Chao 1 Index ("Chao1") = det forventede antallet taxa i et utvalg ved å ekstrapolere ut antall sjeldne organismer som kan ha blitt utelatt.

Tabell 22 viser hvilke typer av bakterier OTU (*Operational taxonomic unit*²) som påvirkes av de ulike diettene. Melkesyrebakterier fra Firmicutes phylum, spesielt *Streptococcus* og *Weissella*, ble funnet i høyere konsentrasjoner i tarmen til fisk føret lavfetttdietter og lavt nivå av n-3 fettsyrer. I motsetning hadde fisk føret høyfetttdietter høyere alfa-diversitet av bakterier i tre andre phyla: Actinobacteria, Proteobacteria og Verrucomicrobia.

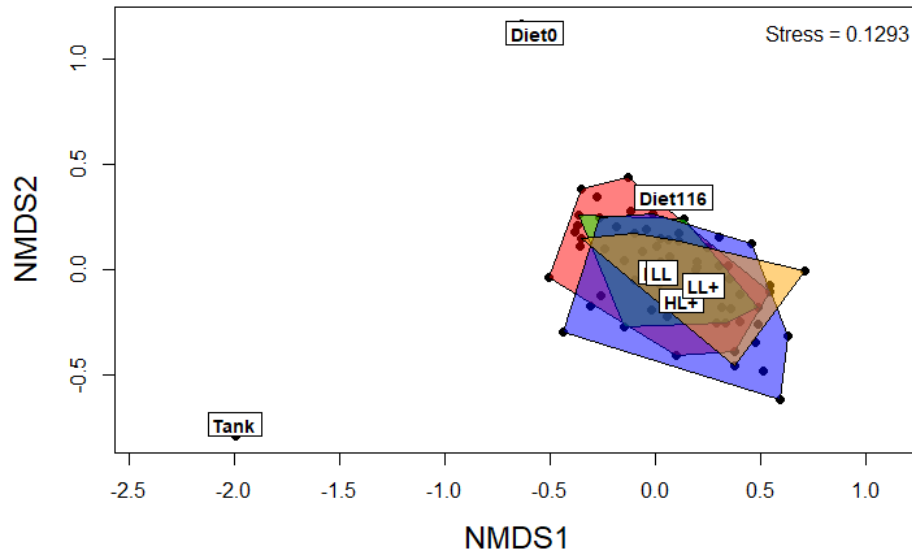
Tabell 22 OUT indikator (*Operational taxonomic unit*) som forklarer forskjeller mellom diettgruppene, identifisert ved LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*)

Phyla	Order	OTU	Diett	LDA	p-verdi
Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae_unclassified	Høy Lipid	2,0	0,033
Firmicutes	Lactobacillales	Lactobacillales_unclassified	Lav Lipid & Lav n-3	2,1/2,3	0,043/0,003
		<i>Lactobacillus</i>	Lav n-3	2,3	0,035
		<i>Leuconostoc</i>	Lav n-3	3,0	0,033
		<i>Streptococcus</i>	LavLipid & Lav n-3	2,3/3,8	<0,001/0,041
		<i>Weissella</i>	Lav Lipid & Lav n-3	2,7/2,9	0,034/0,012
Proteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_unclassified	Lav Lipid	2,4/2,1	<0,001/0,033
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae_unclassified	Høy Lipid	2,4	0,025
	Oceanospirillales	Chromohalobacter	Høy Lipid	2,9	0,048
	Vibrionales	<i>Aliivibrio</i>	Lav Lipid	4,5	<0,001
		<i>Photobacterium</i>	Lav n-3	2,8	0,021
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae_unclassified	Høy Lipid	2,6	0,030

LDA; lineær diskriminant analyse

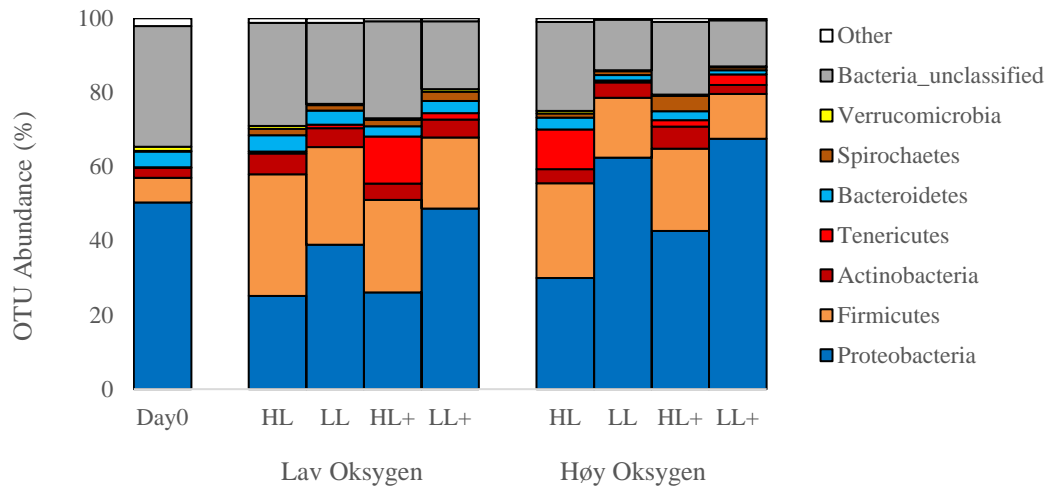
Beta-diversitet av 16S rRNA gen sekvenser

Figur 41 viser effekt på beta-diversiteten («*beta-diversity= Variation of microbial communities between sample*») dvs forskjeller i mikrobiotasammensetning til baktarm, fôr og kar-biofilm. NMDS-plottet (*Non-metric multidimensional scaling*) viser tydelig separasjon mellom mikrobiota i kar, diett og tarmprøver. På dag 116 viser figuren at både fettnivået i fôret ($p=0,009$), n-3 fettsyrer i fôret ($p=0,036$) og en fett X n-3 interaksjon ($p=0,001$) påvirket beta-diversiteten til tarmbakterier, men det ble ikke funnet noen effekt av oksygenivå ($p=0,367$) basert på ANOSIM ($df=71$).

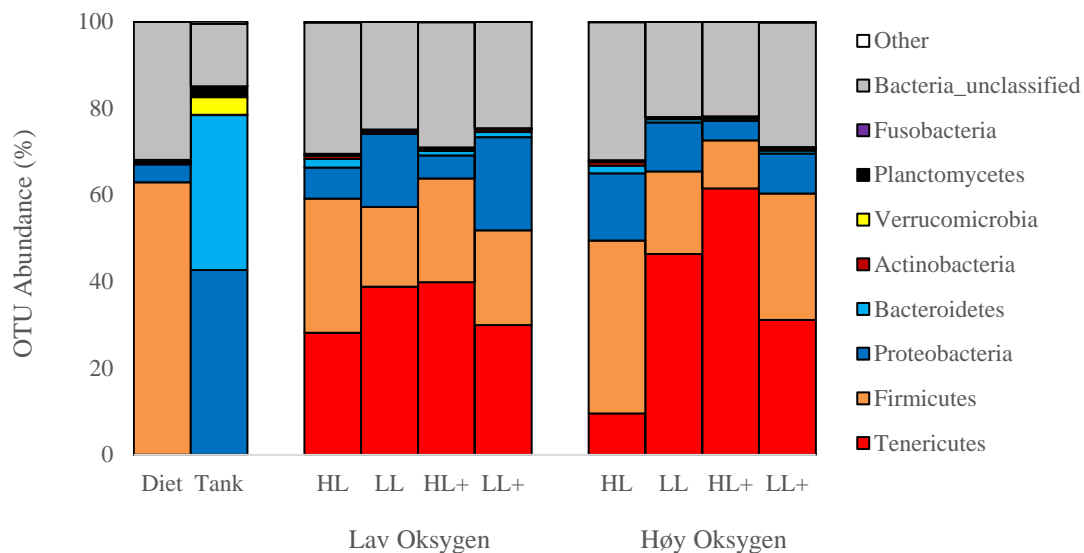


Figur 41 NMDS plott av bakteriell beta-diversitet ($n = 9$). Laks er fôret høyfettdietter (HL) eller lavfettdietter (LL) dietter med høye eller lave nivåer av n-3 fettsyrer i dietten under standard eller høye oksygenivåer dag 116. Tarmprøver ble sammenlignet med bakteriell diversitet i fôr (Diet) og kar-biofilm (Tank). (LL- = er lavfett + lav n-3 fettsyrer, LL+ = lavfett + høy n-3 fettsyrer, HL+ = høyfett + høy n-3 fettsyrer, HL = høyfett og lav n-3 fettsyrer)

a)



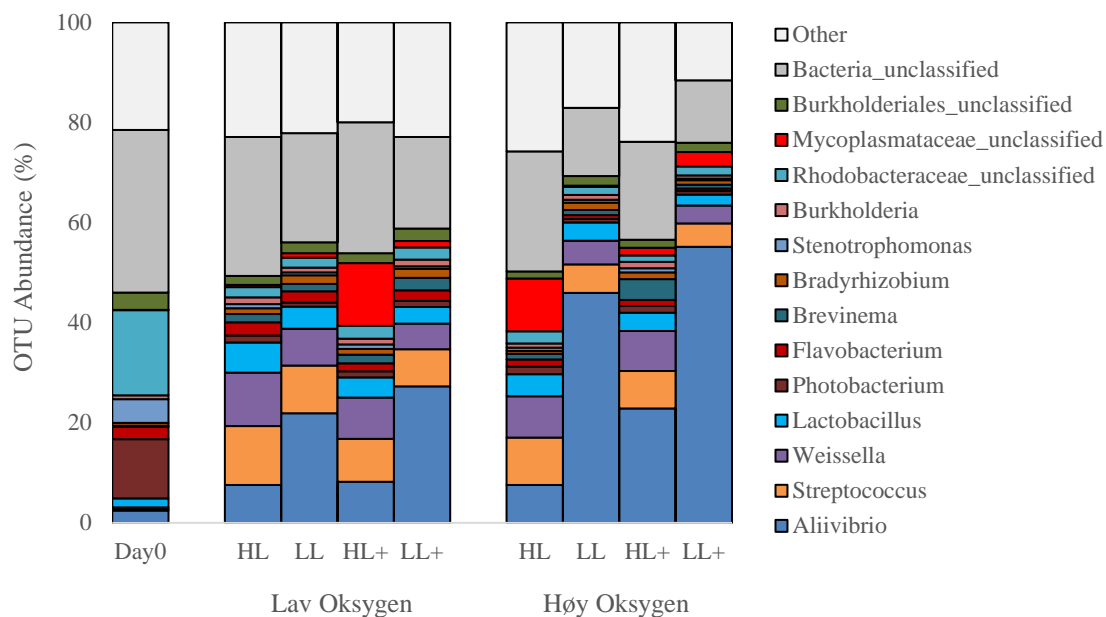
b)



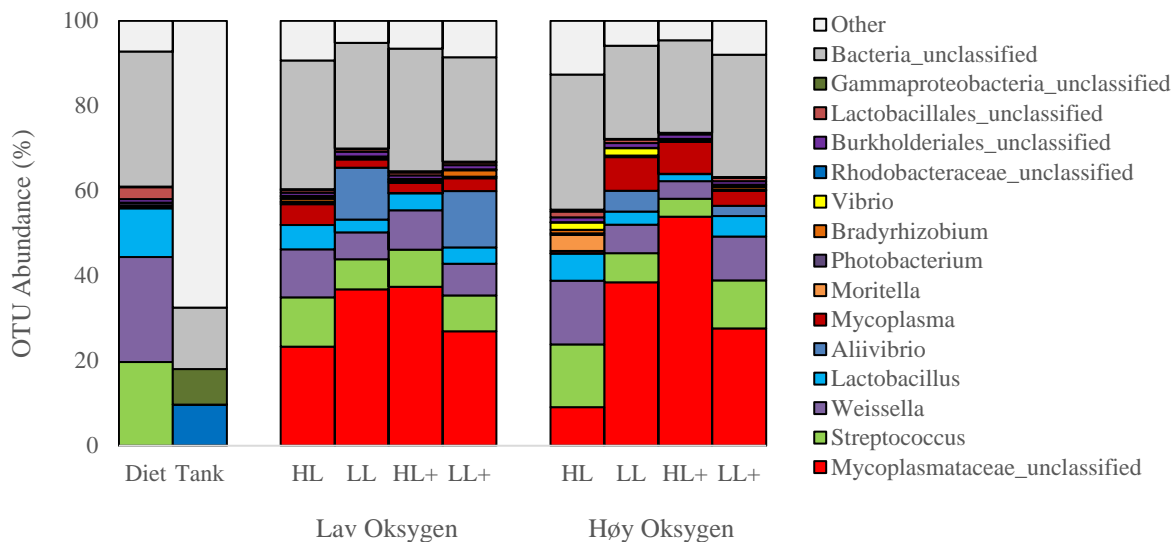
Figur 42 Bakterier (phyla nivå) fra baktarm til atlantisk laks ($n = 9$) fôret høyfettdiett (HL) eller lavfettdiett (LL) med høye eller lave nivåer av $n-3$ fettsyrer og under høye- eller lave nivåer av oksygen på (a) dag 35 og (b) dag 116. (LL= er lavfett + lav $n-3$ fettsyrer, LL+= lavfett + høy $n-3$ fettsyrer, HL+= høyfett + høy $n-3$ fettsyrer, HL= høyfett og lav $n-3$ fettsyrer)

Tarmbakteriene på dag 35 var dominert av Proteobacteria (44 %) etterfulgt av Firmicutes (21 %), Actinobacteria (4 %) og Tenericutes (3 %) (Figur 42a). På dag 116 var tarmbakterier dominert av Tenericutes (36 %) etterfulgt av Firmicutes (24 %), Proteobacteria (11 %) og Actinobakterier (1 %) (Figur 42b). Flertallet av bakteriene i fôrene var Firmicutes mens biofilm i karet besto av Proteobacteria og Bacteroidetes. På slektsnivå var tarmbakterier dominert av *Aliivibrio* (22 %) etterfulgt av *Streptococcus* (7 %), *Weissella* (6 %), *Rhodobacteraceae* (4 %), *Lactobacillus* (4 %) og *Mycoplasmataceae* (3 %) på dag 35 (Figur 43a). På dag 116 var tarmbakterier dominert av *Mycoplasmataceae* (32 %), *Streptococcus* (9 %), *Weissella* (9 %), *Lactobacillus* (4 %), *Aliivibrio* (4 %), *Mycoplasma* (4 %) og *Rhodobacteraceae* (1 %) (Figur 43b). De fleste bakteriene i fôret var *Weissella* og *Streptococcus* mens biofilmen fra fiskekaret besto av *Rhodobacteraceae* og *Flavobacteriaceae*.

a)



b)



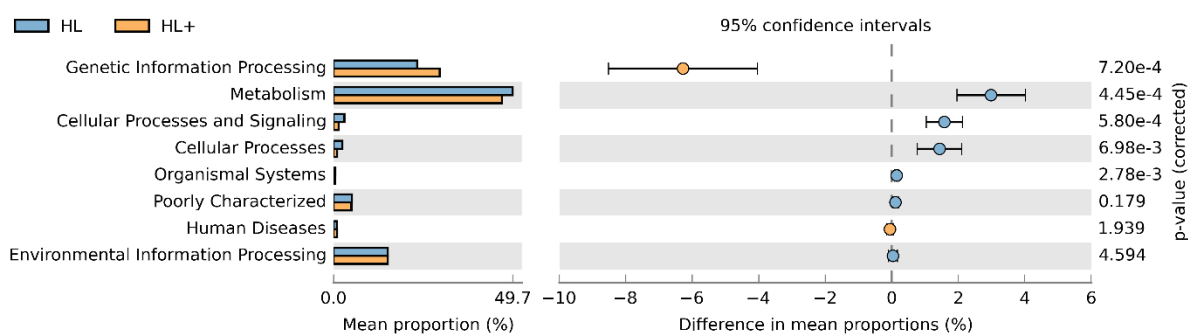
Figur 43 Bakterier (slektsnivå) fra baktarm til atlantisk laks ($n = 9$) føret høyfetttdiett (HL) eller lavfetttdiett (LL) med høye eller lave nivåer av $n-3$ fettsyrer i diettene (+) under standard eller lavt oksygenivå (a) dag 35 og (b) dag 116. (LL- = er lavfett + lav $n-3$ fettsyrer, LL+ = lavfett + høy $n-3$ fettsyrer, HL+ = høyfett + høy $n-3$ fettsyrer, HL = høyfett og lav $n-3$ fettsyrer)

Metagenomisk «pathway» analyse av tarmbakterier, KEGG nivå 1 var dominert av metabolske og cellulære prosesser (Figur 44a). Tarmbakterier fra fisk føret høyfetttdiett med høy $n-3$ fettsyrer viste økning ($p < 0,001$) i funksjonelle «pathways», mens høyfetttdiettgruppen med lav $n-3$ fettsyrer viste aktivering av metabolske og cellulære prosesser. Innen metabolske prosesser, KEGG nivå 2, dominerte metabolisme av karbohydrater, aminosyrer og nukleotider og i mindre grad energiprosesser og metabolisme av vitaminer (Figur 44b). Høyfetttdiett gruppen med høy $n-3$ fettsyre viste økning i ($p < 0,001$) metabolske prosesser knyttet til karbohydrater og nukleotider, mens høyfetttdiett med lav $n-3$ fettsyre viste økning i aminosyre, vitamin og lipidmetabolske prosesser. Innen lipidmetabolske

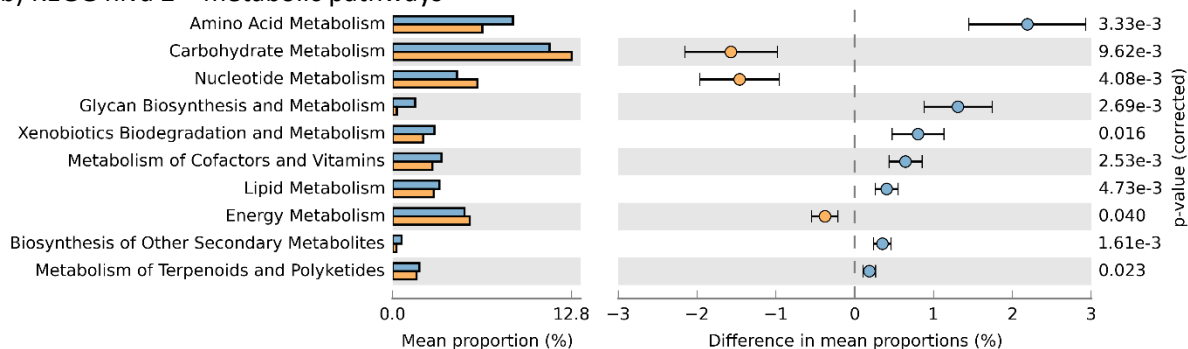
prosesser på KEGG nivå 3, viste høyettdiettgruppen med høy n-3 fettsyre, økning i ($p < 0,05$) metabolske prosesser relatert til glyserolipider, fosfolipider, linolensyre (18:2n-6) og arakidonsyre (20:4n-6; $p = 0,096$), mens høyettdiettgruppen med lav n-3 fettsyre resulterte i økt ($p < 0,05$) biosyntese av fettsyrer, umettede fettsyrer, proteiner og steroider. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de eksperimentelle gruppene mellom høy- og lavfett- eller oksygenivå (data ikke vist).

Tidligere studier har vist at metabolisme bidrar mest til de prediktive prosessene knyttet til tarmmikrobiomet i salmonider, etterfulgt av cellulære prosesser [40, 41]. I overensstemmelse med dette viser våre resultater at en høy andel tilskrives aminosyre, karbohydrat og energimetabolisme og i mindre grad vitamin- og lipidmetabolisme [42]. Svært få studier sammenligner effekten av tarmmikrobiomet på lipidmetabolismen i fisk, til tross for en sammenheng mellom n-3/n-6 fettsyrer og tarmmikrobiota. En studie av Yildirim og Brown [40], fant at en populasjon av vill regnbueørret hadde lavere fettabsorpsjon og høyere aktivering av lipidmetabolisme i tarmbakterier, spesielt linolsyre (18:2n-6) metabolismen. Tarmmikrobiota til vill flyndre (*Paralichthys adspersus*) ble funnet å ha høyere aktivering av fettsyre metabolisme og biosyntese av umettede fettsyrer sammenlignet med oppdrettsflyndre fôret en formulert høyettdiett [43]. I arktisk røye reduserte fôring med marin olje antallet levedyktige tellinger av *Corynebacterium* sammenlignet med fisk fôret planteolje [44].

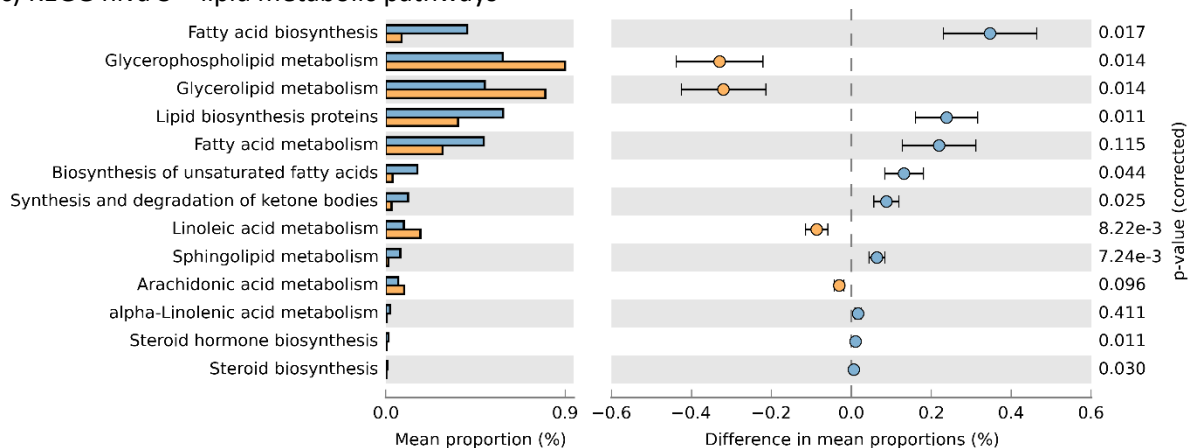
a) KEGG nivå 1 – alle «pathways»



b) KEGG nivå 2 – metaboliske pathways



c) KEGG nivå 3 – lipid metaboliske pathways



Figur 44 STAMP plot av funksjonelle metagenomiske «pathways» (PICRUSt) av baktarmmikrobiomet (n=9) til atlantisk laks på dag 116 fôret høvfettdiett (HL) og høvfettdiett med høy n-3 fettsyrer (HL+) som viser KEGG Nivåer 1 (a), 2 (b) og 3 (c). P-verdier ble generert av Welch's t-test med Bonferroni korreksjon og <0,05 ble ansett som signifikant

Konklusjon: Funnene kan tyde på et mindre sunt tarmmikrobiom i laks fôret høvfettdiett, selv om denne fiskegruppen hadde best tilvekst. PICRUSt analyse viste at metabolismen av mettet og umettet fettsyrebiosyntese var flere ganger høyere i fisk fôret høvfettdietten med lav n-3 fettsyre (HL), muligens for å kompensere for mangelen på n-3 fettsyrer. Oppsummert indikerer våre resultater på at alfa-diversitet, beta-diversitet og prediktiv funksjon av tarmbakterier i atlantisk laks påvirkes av fett:protein ratio i fôret og nivået av n-3 fettsyrer i fôret, men ikke av oksygen-nivå.

4.4.6 Oppsummering av hovedresultater AP 4

- Signifikant samspill mellom nivåene av fett og n-3 fettsyrer i dietten på tilvekst, indikerer at behovet for EPA og DHA må sees i forhold til det totale fettnivået i dietten.
- Behovet for EPA og DHA, basert på vekstrespons under ideelle miljøforhold, defineres mellom 5 % og 7 % av totale fettsyrer i dietten.
- Hypoksisstress gir redusert vekst uavhengig av diettsammensetning, noe som antagelig forårsakes av redusert fôrintak.
- Høyfettfôr (og i mindre grad n-3 fettsyrer) førte til økt tilvekst, protein- og energiutnyttelse under hypoksisstress og resultatene tyder dermed på at laksen under hypoksisstress er mest avhengig av nok energiinntak og i mindre grad inntak av n-3 fettsyrer.
- Alfa-diversitet, beta-diversitet og prediktiv funksjon av tarmbakterier i atlantisk laks påvirkes av fett:protein ratio og n-3 fettsyrer i fôret i fôret, men ikke av hypoksisstress.
- Resultatene indikerer et mindre sunt tarmmikrobiom i laks fôret høyfettdiet enn lavfettdiet, selv om denne fiskegruppen hadde best tilvekst.

5 Hovedkonklusjoner

«Nutritional programming» og genetikk

- Fôring med økt nivå av planteolje i ferskvannsfasen gav bedret tilvekst.
 - Planteoljeeffekten fra ferskvannsfasen ble ikke videreført i sjøvannsfasen (tyder dermed ikke på «*nutritional programming effect*»), da laks i sjøvann vokste best på de høyeste nivåene av EPA og DHA i dietten uavhengig av diettsammensetning i ferskvannsfasen.
 - Det var en pre-dietteffekt fra ferskvannsfasen på nivåene av EPA og DHA i lever og muskel til laks i sjøvannsfasen.
- Genetisk seleksjon for høy kapasitet til syntese av EPA og DHA førte til redusert fettnivå og økte nivåer av EPA og DHA i lever til laks fôret en diett rik på planteolje (bedret leverhelse).
- Immunrespons etter vaksinerings var lite påvirket av fettsyresammensetningen av dietten.

EPA og DHA behov i merder i sjø?

- Økende nivåer av EPA og DHA i fôret fra 10 g/kg til 35 g/kg resulterte i økt tilvekst, bedring i velferds- og helseindikatorer, bedre filetfarge og redusert forekomst av melaninflekker.
- EPA og DHA nivåer i fôret påvirket ikke stressresponsen etter avlusning, men stress påvirket mineralbalansen i helkropp.
- Både økende nivåer av EPA og DHA i fôret og redusert fettnivå i fôret bedret selen- og sinkstatus i helkropp

n-6/n-3 og helse til laks i tidlig sjøvannsfase

- Forhøyet n-6 / n-3 ratio i fôret gav økt leverfett.
- Forholdet mellom n-6 og n-3 var viktigere for inkorporering av fettsyrer i polare lipider enn kvantitative nivåer av fettsyrene, mens det motsatte var tilfellet for nøytrale lipider.
- Økt nivå av 18:2n-6 i fôret og balanserte nivåer av EPA, DHA og ARA, førte til redusert EPA, økt ARA, og stabil DHA i membranlipidene.
- Høy n-6 / n-3 ratio syntes å gi en redusert kortisolrespons i plasma og økte nivåer av eikosanoidene PGE2 og PGD2 i leveren i laksen etter hypoksisstress.
- n-6 / n-3 ratio i fôr påvirket ikke sykdomsforløpet og uttrykk av gener relatert til immunrespons under AGD gjelleinfeksjon.

Samspill fettnivå i fôr og EPA og DHA i tidlig sjøvannsfase

- Dataene viste signifikant samspill mellom fettnivå og n-3 fettsyrer i dietten på tilvekst, og indikerte dermed at behovet for EPA og DHA må sees i forhold til det totale fettnivået i dietten.
- Behovet for EPA og DHA, basert på vekstrespons under ideelle miljøforhold, defineres mellom 5 % og 7 % av totale fettsyrer i dietten.
- Hypoksisstress gav redusert vekst uavhengig av diettsammensetning, noe som antagelig var et resultat av redusert fôrinntak.
 - Høyfettfôr (og i mindre grad n-3 fettsyrer) førte til økt tilvekst, protein- og energiutnyttelse under hypoksisstress, noe som indikerer at laksen er mest avhengig av nok energiinntak og i mindre grad inntak av n-3 fettsyrer under stress.
- Resultatene indikerer et mindre sunt tarmmikrobiom i laks fôret høyfettdiet enn lavfettdiet, selv om denne fiskegruppen hadde best tilvekst.

6 Hovedfunn

- Fôring med økt nivå av planteolje i dietten bedret tilveksten til laksen i ferskvannsfasen, mens økende nivåer av EPA og DHA bedret tilveksten i sjøvannsfasen.
- Behovet for EPA og DHA, basert på vekstrespons under ideelle miljøforhold i tidlig sjøvannsfase ble definert til 5 % - 7 % av totale fettsyrer i dietten, men i senere faser i merder i sjø førte økende nivåer av EPA og DHA i fôret fra 10 g/kg til 35 g/kg til bedret vekst, velferds- og helseindikatorer, muskelkvalitet og mineralstatus.
- Økt energinivå i fôret bedret ytelsen til laksen under hypoksisstress, men resulterte i mindre sunt tarmmikrobiom og hjertehelse og lavere mineral og sinknivå i helkropp.
- Genetisk seleksjon for høy kapasitet til syntese av EPA og DHA førte til redusert fettnivå og økte nivåer av EPA og DHA i lever til laks fôret en diett rik på planteolje (bedret leverhelse).
- Immunrespons etter vaksinerings var lite påvirket av fettsyresammensetningen av dietten.
- Forhøyet n-6 / n-3 ratio i fôret gav økt leverfett og etter hypoksisstress førte økt ratio til redusert kortisolrespons i plasma og økte nivåer av eikosanoidene PGE2 og PGD2 i leveren, men påvirket ikke sykdomsforløpet og uttrykk av gener relatert til immunrespons under AGD gjelleinfeksjon.

7 Referanser

1. Sissener N, Torstensen B, Ruyter B, Østbye T, Waagbø R, Jørgensen S, Hatlen B, Liland N, Ytteborg E, Sæle Ø: **Effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet (Fett for fiskehelse): Oppdatering 2016.** *NIFES and Nofima, Bergen* 2016.
2. Aas TS, Ytrestøyl T, Åsgård T: **Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016.** *Aquaculture Reports* 2019, **15**:100216.
3. Bou M, Berge GM, Baeverfjord G, Sigholt T, Østbye T-K, Ruyter B: **Low levels of very-long-chain n-3 PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diet reduce fish robustness under challenging conditions in sea cages.** *Journal of Nutritional Science* 2017, **6**.
4. Ruyter B, Rosjo C, Einen O, Thomassen MS: **Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass.** *Aquaculture Nutrition* 2000, **6**(2):119-127.
5. Ruyter B, Thomassen MS: **Metabolism of n-3 and n-6 fatty acids in Atlantic salmon liver: stimulation by essential fatty acid deficiency.** *Lipids* 1999, **34**(11):1167-1176.
6. Thomassen MS, Rein D, Berge GM, Østbye T-K, Ruyter B: **High dietary EPA does not inhibit Δ 5 and Δ 6 desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed rapeseed oil diets.** *Aquaculture* 2012, **360**:78-85.
7. Rosenlund G, Torstensen BE, Stubhaug I, Usman N, Sissener NH: **Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period.** *Journal of nutritional science* 2016, **5**:e19.
8. Bou M, Berge GM, Baeverfjord G, Sigholt T, Østbye T-K, Romarheim OH, Hatlen B, Leeuwis R, Venegas C, Ruyter B: **Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity.** *British Journal of Nutrition* 2017, **117**(1):30-47.
9. Ruyter B, Rosjo C, Masoval K, Einen O, Thomassen MS: **Influence of dietary n-3 fatty acids on the desaturation and elongation of [1-C-14] 18 : 2 n-6 and [1-C-14] 18 : 3 n-3 in Atlantic salmon hepatocytes.** *Fish Physiology and Biochemistry* 2000, **23**(2):151-158.
10. Ruyter BØ, Tone-Kari K; Kjær, Marte Avranden; Sonesson, Anna Kristina; Mørkøre, Turid; Berge, Gerd Marit: **Kan nivå av EPA og DHA i fôr i tidlige livsfaser påvirke laksens helse og sammensetning i seinere livsfaser? FHF-prosjekt 900770 – Delrapport 1. 2015.** In: *FHF-prosjekt 900770* vol. Delrapport 1. : Nofima; 2015.
11. Ruyter B, Østbye T-KK, Kjær MA, Sonesson AK, Mørkøre T, Berge GM: **Kan nivå av EPA og DHA i fôr i tidlige livsfaser påvirke laksens helse og sammensetning i seinere livsfaser? FHF-prosjekt 900770–Delrapport 1. 2015.**
12. Ruyter B, Moya-Falcon C, Rosenlund G, Vegusdal A: **Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of temperature and dietary soybean oil.** *Aquaculture* 2006, **252**(2-4):441-452.
13. Sissener N, Torstensen B, Owen M, Liland N, Stubhaug I, Rosenlund G: **Temperature modulates liver lipid accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed low dietary levels of long-chain n-3 fatty acids.** *Aquaculture Nutrition* 2017, **23**(4):865-878.
14. Hundal BK, Liland NS, Rosenlund G, Bou M, Stubhaug I, Sissener NH: **Increasing dietary n-6 fatty acids while keeping n-3 fatty acids stable decreases EPA in polar lipids of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *British Journal of Nutrition* 2021, **125**(1):10-25.
15. Koven W, van Anholt R, Lutzky S, Atia IB, Nixon O, Ron B, Tandler A: **The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change.** *Aquaculture* 2003, **228**(1-4):307-320.
16. Martins DA, Rocha F, Castanheira F, Mendes A, Pousão-Ferreira P, Bandarra N, Coutinho J, Morais S, Yúfera M, Conceição LE: **Effects of dietary arachidonic acid on cortisol production**

- and gene expression in stress response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae.** *Fish physiology and biochemistry* 2013, **39**(5):1223-1238.
17. Sissener NH, Cai C, Sanden M, Waagbø R, Torstensen BE, Rosenlund G: **Stress resistance is affected in Atlantic salmon fed high vegetable oil inclusion.** in prep.
 18. Folch J, Lees M, Stanley GS: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *Journal of biological chemistry* 1957, **226**(1):497-509.
 19. Mason ME, Eager ME, Waller GR: **A Procedure for the Simultaneous Quantitative Determination of Glycerol and Fatty Acid Contents of Fats and Oils.** *Analytical Chemistry* 1964, **36**(3):587-590.
 20. Ruyter B, Sissener NH, Østbye T-K, Simon CJ, Krasnov A, Bou M, Sanden M, Nichols PD, Lutfi E, Berge GM: **n-3 Canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of DHA in feed for juvenile Atlantic salmon.** *British Journal of Nutrition* 2019, **122**(12):1329-1345.
 21. Sainte-Marie G: **A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1962, **10**(3):250-256.
 22. Godoy MG, Kibenge MJ, Wang Y, Suarez R, Leiva C, Vallejos F, Kibenge FS: **First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV.** *Virology journal* 2016, **13**(1):1-15.
 23. Haugland Ø, Mikalsen AB, Nilsen P, Lindmo K, Thu BJ, Eliassen TM, Roos N, Rode M, Evensen Ø: **Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family.** *Journal of virology* 2011, **85**(11):5275-5286.
 24. Mørkøre T, Rødbotten M, Vogt G, Fjæra SO, Kristiansen IØ, Manseth E: **Relevance of season and nucleotide catabolism on changes in fillet quality during chilled storage of raw Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Food chemistry* 2010, **119**(4):1417-1425.
 25. Hundal BK, Liland NS, Rosenlund G, Bou M, Stubhaug I, Sissener N: **Increasing dietary n-6 FA while keeping n-3 FA stable decreases EPA in polar lipids of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*).** 2020.
 26. Hundal BK, Liland NS, Rosenlund G, Höglund E, Araujo P, Stubhaug I, Sissener NH: **Increasing the dietary n-6/n-3 ratio alters the hepatic eicosanoid production after acute stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Aquaculture* 2020:736272.
 27. Huyben D, Grobler T, Matthew C, Bou M, Ruyter B, Glencross B: **Requirement for omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by Atlantic salmon is relative to the dietary lipid level.** *Aquaculture* 2020:735805.
 28. Huyben D, Roehe BK, Bekaert M, Ruyter B, Glencross B: **Dietary Lipid: Protein Ratio and n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Alters the Gut Microbiome of Atlantic Salmon Under Hypoxic and Normoxic Conditions.** *Frontiers in Microbiology* 2020, **11**:3385.
 29. Sissener NH, Ajuro P, Waagbø R, Torstensen BE, Rosenlund G, Sanden M: **Omega-6 / omega-3 ratio affects EPA and DHA content in cell membranes and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** in prep.
 30. Bou M, G.M: B, Bæverfjord G, Sigholt T, Østbye T-K, Romarheim OH, Hatlen B, Leeuwis R, Venegas C, Ruyter B: **Requirements of omega-3 fatty acids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity.** *British Journal of Nutrition* submitted.
 31. Ruyter B, Moya-Falcón C, Rosenlund G, Vegusdal A: **Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of temperature and dietary soybean oil.** *Aquaculture* 2006, **252**(2-4):441-452.
 32. Katerina K, Berge GM, Turid M, Aleksei K, Grete B, Trine Y, Mats C, John S, Bente R: **Microalgal *Schizochytrium limacinum* Biomass Improves Growth and Filet Quality When Used Long-Term as a Replacement for Fish Oil, in Modern Salmon Diets.** *Frontiers in Marine Science* 2020, **7**:57.

33. Lobo AR, Mancini Filho J, Alvares EP, Cocato ML, Colli C: **Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats.** *Nutrition* 2009, **25**(2):216-225.
34. Prabhu PAJ, Lock E-J, Hemre G-I, Hamre K, Espe M, Olsvik PA, Silva J, Hansen A-C, Johansen J, Sissener NH: **Recommendations for dietary level of micro-minerals and vitamin D3 to Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt when fed low fish meal diets.** *PeerJ* 2019, **7**:e6996.
35. Weigand E, Boesch-Saadatmandi C: **Interaction between marginal zinc and high fat supply on lipid metabolism and growth of weanling rats.** *Lipids* 2012, **47**(3):291-302.
36. Tallman DL, Taylor CG: **Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice.** *The Journal of nutritional biochemistry* 2003, **14**(1):17-23.
37. Xu H, Ferosekhan S, Turkmen S, Afonso JM, Zamorano MJ, Izquierdo M: **High broodstock fads2 expression combined with nutritional programming through broodstock diet improves the use of low fishmeal and low fish oil diets in gilthead seabream (*Sparus aurata*) progeny.** *Aquaculture* 2021, **535**:736321.
38. Xu H, Ferosekhan S, Turkmen S, Afonso JM, Zamorano MJ, Izquierdo M: **Influence of parental fatty acid desaturase 2 (*Fads2*) expression and diet on gilthead seabream (*sparus aurata*) offspring *fads2* expression during ontogenesis.** *Animals* 2020, **10**(11):2191.
39. Østbye T-KK, Ruyter B, Sonesson AK, Kjær MA, Baranski M, Bakke H, Thomassen MSS, Sigholt T, Berge GM: **The omega-3 fatty acid metabolism in different Atlantic salmon families changes during the smoltification period.** 2015.
40. Yildirimer C, Brown KH: **Intestinal microbiota lipid metabolism varies across rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phylogeographic divide.** *Journal of applied microbiology* 2018, **125**(6):1614-1625.
41. Lyons P, Turnbull J, Dawson KA, Crumlish M: **Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings.** *Journal of Applied Microbiology* 2017, **122**(2):347-363.
42. Dehler CE, Secombes CJ, Martin SA: **Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.).** *Aquaculture* 2017, **467**:149-157.
43. Ramírez C, Romero J: **The microbiome of *Seriola lalandi* of wild and aquaculture origin reveals differences in composition and potential function.** *Frontiers in Microbiology* 2017, **8**:1844.
44. Ringø E, Lødemel JB, Myklebust R, Jensen L, Lund V, Mayhew TM, Olsen RE: **The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*.** *Aquaculture Research* 2002, **33**(8):591-606.

