

2021:01411 - Åpen

Rapport

STARTRENS – Optimalisert startfôring av rensefisk

Sluttrapport for FHF-prosjekt 901561

Forfattere

SINTEF Ocean: Andreas Hagemann, Arne Malzahn, Bjørn Henrik Hansen, Deni Ribicic & Antonio Sarno.

NTNU Institutt for biologi: Elin Kjørsvik & Tu Anh Vo

Eksterne forfattere: Tjalling Jager



Rapport

STARTRENS – Optimalisert startfôring av rensefisk

Sluttrapport for FHF-prosjekt 901561

RAPPORTNR	PROSJEKTNR	VERSJON	DATO
2021:01411	901561	1.0	2021-12-20

EMNEORD:

beinfisk, rensefisk, rognkjeks, berggylt, utvikling, fysiologi, lipid, lipidomics, fettsyrer, akvakultur, eggkvalitet, dynamisk energi-budsjett, DEBKISS, biometri, fiskelarver, startfôring, vekst, overlevelse, mikrobiota, metabolisme, genuttrykk, vannkvalitet, levendefôr, tidlig ernæring, nutritional programming, lakselus, forbeining, muskulutvikling, histologi, tarm

FORFATTERE

SINTEF Ocean: Andreas Hagemann, Arne Malzahn, Bjørn Henrik Hansen, Deni Ribicic & Antonio Sarno.

NTNU Institutt for biologi: Elin Kjørsvik & Tu Anh Vo
Eksterne forfattere: Tjalling Jager

OPPDRAGSGIVER

FHF

OPPDRAGSGIVERS REF.
Eirik Ruud Sigstadstø

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:
100 sider + 5 vedlegg

GRADERING	GRADERING DENNE SIDE	ISBN
Åpen	Åpen	978-82-14-07699-8

SAMMENDRAG

Dette er den faglige sluttrapporten for prosjektet "STARTRENS – Optimalisert startfôring av rensefisk" som ble finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (#901561). Rensefisk har en sentral rolle i laksenæringen som ikke-medikamentell behandling mot lakselus, og behovet for rensefisk i laksenæringen er langt høyere enn det som opprettes.

De første ukene av fiskeyngelens liv er avgjørende for senere suksess. Berggylt og rognkjeks er veldig forskjellige med hensyn på biologi og livshistorie, og har derfor forskjellige krav til produksjonsmetoder og dyrehold. De tidlige miljøforholdene påvirker gjerne atferd og funksjonalitet i senere stadier hos fisk, og påvirkninger i tidlige larve-stadier kan medføre langvarige endringer i vekst og fysiologiske responser.

I STARTRENS har vi karakterisert eggkvalitet hos rognkjeks og berggylt med mål om å utvikle verktøy for oppdrettere som kan brukes til å velge ut de beste egg-gruppene til sine klekkeri. Vi har også brukt tidligere erfaringer med ulike levendefôr-organismer som bakgrunn for to startfôringsforsøk med rognkjeks og berggylt hvor ulike fôringsregimer ble utprøvd med mål om å optimalisere startfôringsprotokoller.

**UTARBEIDET AV**

Andreas Hagemann



Andreas Hagemann (Dec 21, 2021 11:36 GMT+1)

KONTROLLERT AV

Jan Ove Evjemo



Jan Ove Evjemo (Dec 21, 2021 11:43 GMT+1)

GODKJENT AV

Gunvor Øie



Historikk

VERSJON	DATO	VERSJONSBEKRIVELSE
0.7	2021-12-09	Utkast til sluttrapport for gjennomgang og tilbakemelding fra FHF's referansegruppe i STARTRENS-prosjektet.
0.8	2021-12-10	Sluttrapport sendt til kvalitetssikring
1.0	2021-12-20	Endelig versjon av STARTRENS faglig sluttrapport

Sammendrag (Norsk)

Økt kunnskap om berggyltens (*Labrus berggylta* Ascanius, 1767) og rognkjeksens (*Cyclopterus lumpus* L. Linnaeus, 1758) krav til miljø og ernæring, hos både stamfisk og tidlige livsstadier, er avgjørende for å lykkes med å etablere høykvalitets stamfisk og for å forbedre kvalitet og velferd hos oppdrettede larver og juvenile. I STARTRENS-prosjektet var det overordnede målet å bidra til betydelig forbedring i fiskevelferd og ytelse for oppdrettet rensefisk. Vi hadde som målsetting å etablere kunnskap om hvordan man kan gjenkjenne og måle eggkvalitet i berggylt- og rognkjeksegg, og om hvordan man kan optimalisere startfôringen av larver hos begge arter. STARTRENS-prosjektet har lyktes med å gjennomføre en omfattende kartlegging av biokjemiske, histologiske, gen-relaterte og biometriske parametere hos begge arter, for både embryonalutviklingen og utviklingen i larvestadiene. Prosjektet identifiserte flere lipidkomponenter som potensielt kan brukes som biomarkører for å forutsi eggkvalitet hos begge arter, og viste at disse markørene er unike avhengig av hunnfiskens opprinnelse (geografi) og/eller fôringshistorikk. Hos rognkjeks fant vi korrelasjoner mellom innhold av enkelte fosfatidyletanolaminer (PEs) og fosfatidylcholin (PCs) og klekkesuksess og befruktningsrate. For berggyltegg fant vi spesifikke triacylglyserider (TAGs) som kan fungere som biomarkører for vurdering av eggkvalitet. Videre har prosjektet frembragt ny kunnskap om overføringseffekter av tidlig larveernæring inn i tørrfôrtilvenningen, såkalt ernæringsprogrammering. Berggyltlarver som ble startfôret på naturlige fôrorganismer viste mindre forskjeller i genuttrykk seg imellom, og store forskjeller sammenliknet med larver som ble startfôret på anriket levendefôr, lenge etter larvene var tilvent tørrfôr. Dette viste at det aller første fôret larvene spiser medfører langvarige metabolske endringer i larvene. Til slutt har vi evaluert effekten av å bruke flere av de vanligste levendefôrorganismene og fôringsstrategiene for både berggylt- og rognkjeks larver, og basert på disse resultatene, gitt anbefalinger om hvilke fôringsstrategier som virker fordelaktige for vekst og andre velferdsparametere. Berggyltlarver bør fôres med hoppekreps som en erstatter for rotatorier for å oppnå god vekst og høy overlevelse. Videre kan det oppnås bedre kapasitet for fordøyning og energilagring ved å bytte ut *Artemia* med rurlarver. For rognkjeks ga *Artemia* tidlig rask vekst og god utvikling av larvene, mens fôring med rurlarver ga en relativ høyere veksthastighet i senere stadier og ved tilvenning til tørrfôr. Disse fôrorganismene ga også høyest overlevelse og de største larvene ved avslutningen av forsøket.

Summary (English)

Improving our knowledge about the environmental and nutritional requirements of ballan wrasse (*Labrus berggylta* Ascanius, 1767) and Atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L. Linnaeus, 1758) broodstock and early life stages is paramount to succeed with establishing high quality broodstock and to improve the quality and robustness of farmed larvae and juveniles. The overarching aim of the STARTRENS project was to contribute to significant improvements in fish welfare and -performance for farmed cleaner fish. Herein, we aimed at gaining knowledge on how to recognize and measure egg quality in lumpfish- and ballan wrasse eggs and to optimize start feeding protocols for the early life stages of both species. The STARTRENS project has succeeded in conducting a comprehensive mapping of biochemical, histological, gene-related and biometric parameters for both species in terms of both, embryonic and larval development. The project identified several lipid species with potential for being used as biomarkers to predict egg quality in both species and showed that these markers are unique depending on origin of the female and feeding history. For lumpfish eggs, we found correlations between content of certain phosphatidylethanolamines (PEs) and phosphatidylcholines (PCs) and hatching success and fertilization rates. For ballan wrasse eggs, we identified specific triacylglycerides (TAGs) which can function as biomarkers to predict egg quality. Furthermore, STARTRENS have brought forth new knowledge on the carry-over effects of early nutrition into the weaning stage, so-called nutritional programming, and highlighted the importance of proper early nutrition. Ballan wrasse larvae fed natural feed organisms at the onset of exogenous feeding showed less differences in gene expression between them, and large differences when compared to larvae fed traditional enriched live feed organisms, several weeks into the weaning period. This showed that the very first feed items the larvae eat causes long-term metabolic changes in the larvae. Finally, we evaluated the effects of several, commonly used live feed organisms and feeding strategies for both ballan wrasse and lumpfish larvae and, based on these results, provide recommendations on feeding strategies which seem beneficial for larval growth and health. Ballan wrasse larvae should be fed copepods as a replacer for rotifers to achieve good growth and higher survival. Further on, a higher digestive capacity and energy storage can be achieved by replacing *Artemia* with cirriped larvae. In lumpfish larvae, using *Artemia* caused early fast growth and good development, whereas feeding with cirriped larvae lead to higher growth rates in the later stages and during weaning onto formulated feeds. These two prey items also resulted in the highest survival and the largest larvae by the end of the experiment.

Innholdsfortegnelse

1	STARTRENS-prosjektet	7
1.1	Bakgrunn	7
1.2	Organisering og implementering	7
1.3	Referanser	8
2	Problemstilling og formål	9
3	Metodeutvikling for kvalitetsvurdering av Rognkjeksegg (AP1)	11
3.1	Materialer og metode	11
3.1.1	Prøvetaking, billedtaking og analyser	12
3.2	Resultater	14
3.3	Diskusjon, konklusjon og anbefalinger	19
3.4	Referanser	19
4	Metodeutvikling for kvalitetsvurdering av berggyltegg (AP1)	21
4.1	Materialer og metode	22
4.1.1	Prøvetaking, billedtaking og analyser	24
4.2	Resultater	27
4.3	Diskusjon, konklusjon og anbefalinger	42
4.4	Referanser	42
5	Utvikling av optimalisert startfôringsregime for berggylt (AP2)	44
5.1	Materialer og metode	44
5.1.1	Fôringsregimer	45
5.1.2	Levendefôr og prosedyrer	45
5.1.3	Prøvetaking og analyser	48
5.2	Resultater	49
5.2.1	Dødelighet	50
5.2.2	Vekst	50
5.2.3	Forbeining	52
5.2.4	Histologi	52
5.2.5	Fettsyrer og lipidomics	53
5.2.6	Genuttrykk	56
5.2.7	Mikrobiologi	61
5.3	Diskusjon	61
5.4	Konklusjon og anbefaling	63
5.5	Referanser	63
6	Utvikling av optimalisert startfôringsregime for rognkjeks (AP2)	65
6.1	Materialer og metode	65

6.1.1	Fôringsregimer.....	66
6.1.2	Formulert fôr, levendefôr og prosedyrer	67
6.1.3	Prøvetaking og analyser	67
6.2	Resultater	72
6.2.1	Overlevelse og vekst.....	72
6.2.2	Leverhistologi.....	75
6.2.3	Larvenes muskelvekst.....	78
6.2.4	Beinutvikling	80
6.2.5	Genuttrykk	83
6.2.6	Mikrobiologi.....	87
6.3	Diskusjon	87
6.4	Konklusjoner og anbefalinger	89
6.5	Referanser	90
7	Dynamisk Energibudsjett (DEB) Modelling.....	92
7.1	Resultater, diskusjon og videre anbefalinger	93
7.1.1	DEB Berggylt	94
7.1.2	DEB Rognkjeks.....	94
7.2	Referanser	95
8	Hovedfunn / Main Findings.....	96
9	Leveranser.....	98

BILAG/VEDLEGG

Appendiks A - Ballan wrasse (Labrus bergylta) start-feeding experiment microbiome analysis report. **14 pp.**
Appendiks B – Lumpfish (Cyclopterus lumpus) start-feeding experiment microbiome analysis report. **12 pp.**
Appendiks C – Data analysis for ballan wrasse egg-quality and start-feeding experiments (DEB). **48 pp.**
Appendiks D – Data analysis for lumpsucker egg-quality and start-feeding experiments (DEB). **30 pp.**
Appendiks E – KEGG Pathway map for lumpfish larvae. **4 pp.**

1 STARTRENS-prosjektet

STARTRENS ble finansiert gjennom utlysningen "Åpen utlysning i regi av FHF – Forebygging og kontroll av lus i lakseoppdrett" (saksnummer 18/00218) og var rettet mot målsettingen "Målsetting 1 - Fremskaffe kunnskap om kvalitet på rensefisk – fra stamfisk av berggyllt og rognkjeks til nyklekt yngel til og med startfôring" under "Konkurranssområde 3: Rensefisk".

1.1 Bakgrunn

Norge er den største produsenten av Atlantisk laks (*Salmo salar*) i verden og produserer 55,3 % av den globale produksjonen (Iversen, et al., 2020). Ektoparasitten lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*, Krøyer 1837) fortsetter å være en stor kostnadsdriver for laksenæringen (Iversen, et al., 2017), og lusenivåer setter i dag premissene for videre vekst i produksjonsområder langs norskekysten gjennom reguleringer bestemt av Trafikklyssystemet 'Traffic Light system' (Myksvoll, et al., 2018; Sandvik, et al., 2016). Nedgangen i bruk av kjemiske avlusingsmiddel har resultert i utvikling av en rekke nye avlusingsmetoder det siste tiåret (Greaker, et al., 2020). Bruk av rensefisk i laksemerden for å holde lusenivået nede er en metode som blir stadig vanligere (Erkinharju, et al., 2021), og i dag brukes det mer enn 60 millioner rensefisk i året til formålet (Overton, et al., 2020). De to artene rensefisk det drives oppdrett på i Norge i dag; berggyllt (*Labrus berggylta* Ascanius, 1767) og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L. Linnaeus, 1758), har blitt brukt til biologisk lusekontroll i flere tiår (Bjordal, 1990; Brooker, et al., 2018).

Til tross for store fremskritt innen forskning på disse artene, er mye av biologien hos både berggyllt og rognkjeks fortsatt ukjent. Økt forståelse om artenes krav til miljø og ernæring er en forutsetning for å lykkes med å etablere god stamfisk, og for å forbedre kvaliteten og robustheten for produserte larver og juveniler, for til syvende og sist kunne bidra til å dekke opp laksenæringens økende behov for rensefisk og samtidig redusere omfanget av fangst fra naturlige bestander (Brooker, et al., 2018).

1.2 Organisering og implementering

Prosjektet "Optimalisert startfôring av rensefisk (STARTRENS)" ble finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfinansiering (FHF) for perioden 2019 – 2021. SINTEF Ocean var ansvarlig organisasjon for prosjektet og prosjektleder var seniorforsker Andreas Hagemann. Prosjektet var organisert som et samarbeid mellom forskningspartnere SINTEF Ocean og NTNU og industripartnere DEBTOX Research, Planktonic AS og CFEED AS. Prosjektet omfattet også samarbeid med prosjektet CleanLifeCycle (FHF #901562), ledet av Øystein Sæle ved Havforskningsinstituttet, som gikk parallelt med STARTRENS.

Prosjektet skulle egentlig avsluttes 29. mai 2021, men fikk innvilget en forlengelse av FHF til 15. desember 2021 på grunn av forsinkelser som oppstod på grunn av både redusert bemanning og nedstengning av laboratorier under Covid-19 pandemien. Pandemien skapte store forsinkelser med dataprosessering, analyser av prøvemateriale og tolkning av data, og den satte også en stopper for det planlagte samarbeidet på eggkvalitet hos berggyllt med CleanLifeCycle-prosjektet. Prosjektet inkluderte 10 MSc-studenter, herav 7 studenter som var inkludert i arbeidspakke 2 som alle måtte utsette innleveringen av sine oppgaver på grunn av Covid-19 situasjonen. Studentenes resultater er derfor bare delvis inkludert i denne sluttrapporten, men oppgavene vil bli gjort tilgjengelig gjennom NTNU etter hvert. En liste over studentene og titler for deres oppgaver en oppgitt i Kapittel 9 - Leveranser.

Prosjektet hadde et stort team av forskere, teknikere, laboratoriepersonell og studenter som sammen bidro til å realisere prosjektets ambisiøse arbeidsplan. Navn og roller på nøkkelpersonell i prosjektet var som følger:

SINTEF Ocean: Andreas Hagemann (**Prosjektleder**), Arne Malzahn (**Leder AP2**), Bjørn Henrik Hansen, Deni Ribicic, Stine W. Dahle, Roman Netzer, Bjarne Kvæstad, Jan Ove Evjemo, Åsmund Johansen, Marius Selnæs Andersen, Julia Farkas og Antonio Sarno.

NTNU Institutt for Biologi: Elin Kjørsvik (**Leder AP1**), Frank Thomas Mlingi, Reidun Vadla, Tora Bardal, Tu Anh Vo, Luciana Alves Musialak og Dag Altin.

NTNU Fakultet for Naturvitenskap og Teknologi: Arne Kjørnes og Iurgi Imanol Salaverria-Zabalegui

Industripartnere: Tjalling Jager (DEBTox Research), Maren R. Gagnat og Tore Remman (CFEED AS) og Nils Tokle og Rune Husby (Planktonic AS).

MSc studenter: Ole Martin Kulild (AP1), Rebecca Rye (AP1), Fahad Shabbir (AP1), Marte Solli Lindskog (AP2), Saba Akbar (AP2), Sunniva Brevik Kværnø (AP2), Anna Sigrid Norberg Aase (AP2), Laura García-Calvo (AP2), Ann Isabel Carmo Rosvoll (AP2) and Heidi Hagen (AP2).

Referansegruppen som ble oppnevnt av FHF bestod av følgende personer:

Ingrid Overrein (MOWI ASA / Tjeldbergodden Rensefisk AS), Claudia Wittwer (Arctic Cleanerfish AS) og Kjersti Beate Rosland, (Rensefiskgruppen AS; frem til 1. Mai 2021).

Forsøkene ble utført ved SINTEF/NTNU SeaLab innenfor rammene av den nasjonale forskningsinfrastrukturen "Norsk Senter for Planktonteknologi" som er finansiert av Norges Forskningsråd (#245937/F50) hvor SINTEF Ocean and NTNU er verter for infrastrukturen. Protokollene og utstyret som ble brukt til befruktning og fertilisering av berggyllt og rognkjeksegg i Arbeidspakke 1 ble utviklet av SINTEF Ocean i Forskningsrådsprosjektet PW-Exposed (#280511).

1.3 Referanser

- Bjrdal, A., 1990. Sea lice infestation on farmed salmon: possible use of cleaner-fish as an alternative method for de-lousing. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. 1761, 85-89.
- Brooker, A.J., Papadopoulou, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A., Migaud, H., 2018. Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Veterinary Record*. 183, 383-383.
- Erkinharju, T., Dalmo, R.A., Hansen, M., Seternes, T., 2021. Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. *Reviews in Aquaculture*. 13, 189-237.
- Greaker, M., Vormedal, I., Rosendal, K., 2020. Environmental policy and innovation in Norwegian fish farming: Resolving the sea lice problem? *Marine Policy*. 117, 103942.
- Iversen, A., Hermansen, Ø., Nystøyl, R., Hess, E.J., 2017. Cost development in farming of Norwegian Salmon. Tromsø: Nofima Report, 46.
- Iversen, A., Asche, F., Hermansen, Ø., Nystøyl, R., 2020. Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003–2018. *Aquaculture*. 522, 735089.
- Myksvoll, M.S., Sandvik, A.D., Albretsen, J., Asplin, L., Johnsen, I.A., Karlsen, Ø., Kristensen, N.M., Melsom, A., Skardhamar, J., Ådlandsvik, B., 2018. Evaluation of a national operational salmon lice monitoring system—From physics to fish. *PLoS One*. 13, e0201338.
- Overton, K., Barrett, L.T., Oppedal, F., Kristiansen, T.S., Dempster, T., 2020. Sea lice removal by cleaner fish in salmon aquaculture: a review of the evidence base. *Aquaculture Environment Interactions*. 12, 31-44.
- Sandvik, A.D., Bjørn, P.A., Ådlandsvik, B., Asplin, L., Skarðhamar, J., Johnsen, I.A., Myksvoll, M., Skogen, M.D., 2016. Toward a model-based prediction system for salmon lice infestation pressure. *Aquaculture Environment Interactions*. 8, 527-542.

2 Problemstilling og formål

De første ukene i livet til en fiskelarve er avgjørende for senere suksess. Problemer med varierende eggkvalitet, høy og uforutsigbar dødelighet i larvefasen og dårlig yngelkvalitet forblir en flaskehals i marine klekkerier som hindrer en stabil tilførsel av høykvalitets juvenile larver for påvekst. STARTRENS-prosjektet hadde som målsetning å skaffe ny kunnskap om egg- og larvekvalitet og tidligernæring for de to artene rensefisk som det drives oppdrett på i dag; rognkjeks og berggylt, som kan bidra til å skape vekst i produksjonen av oppdrettet rensefisk og på den måten ta av presset og behovet for fangst av rensefisk fra naturlige bestander. Prosjektet var ventet å gi ny innsikt inn i ernæringskrav hos de tidlige livsstadiene for disse artene som kunne brukes av industrien til å optimalisere startfôringsstrategier, koordinere kunnskap om marin larveproduksjon, bidra til sterkere økonomi og økt produksjon for oppdretterne. På lang sikt skulle prosjektet bidra til å øke velferd for rensefisk etter utsett i sjø ved å belyse viktigheten av hvordan god tidligernæring kan bidra for å få sunn og sterk fisk ut i merdene som lusespisere. Ved å inkludere utdanning, undervisning og veiledning av mange studenter i prosjektet, har det bidratt til kunnskapsoverføring og utdanning av neste generasjons forskere og oppdrettere med ettertraktet kompetanse som vil bli en verdifull ressurs for både forskning og industri i årene som kommer.

Det overordnede målet med STARTRENS-prosjektet var å bidra til forbedret fiskevelferd og ytelse for oppdrettet rensefisk. Målet var å skaffe ny kunnskap om hvordan man kan gjenkjenne og vurdere eggkvalitet i berggylt- og rognkjeks egg og prøve å etablere metoder for dette. Prosjektet skulle også studere effekten av ulike ernæring og fôrtyper i larvefasen med mål om å utvikle prosedyrer for optimalisert startfôring av begge artene. Alle forsøkene ble utført under kontrollerte laboratoriebetingelser med bruk av moderne analyseverktøy. For å oppnå disse målene var det definert to delmål (DM):

- DM1 – Karakterisering av fysiologiske og biokjemiske mekanismer under embryonalutviklingen i egg med høy og lav levedyktighet, samt dokumentasjon av hvordan eggkvalitet påvirker yngelproduksjon og funksjonalitet i larver og yngel (AP1)
- DM2 – Dokumentere fôrpreferanser og energikrav for rognkjeks- og berggylt yngel gjennom bruk av ulike levendefôr-organismer og kombinasjoner av disse under kontrollerte, eksperimentelle forhold (AP2).

Forskningsspørsmålene og målsettingene i STARTRENS-prosjektet ble adressert gjennom to arbeidspakker:

AP1 - Utvikle metodikk for kvalitetsvurdering av egg fra rognkjeks og berggylt.

Målet med denne arbeidspakken var å studere en rekke morfometriske og biometriske parametere hos egg og larver og vurdere om disse parametere kunne knyttes opp mot kvalitet. Ideen var å anskaffe prøver av egg fra både villfangede og oppdrettede individer for å sikre et bredt genetisk og biologisk grunnlag for disse vurderingene. Denne arbeidspakken hadde mål om å utvikle en screening-metodikk som kunne brukes til å vurdere kvaliteten på en egg-gruppe umiddelbart etter gyting ved å korrelere molekylære parametere til morfologiske og fysiologiske trekk. Innhentede data fra både egg og larver skulle til sist bli brukt til å utvikle en "dynamic energy budget (DEB)-modell" for rognkjeks (**Kapittel 3**) og berggylt (**Kapittel 4**) som dekket hele perioden fra befruktning, gjennom embryonalutviklingen og frem til fisken begynner å ta til seg eksternt føde for å få en bedre forståelse av de fysiologiske prosessene artene går gjennom i de tidlige larvestadiene.

AP2 – Utvikling av optimaliserte startfôringsregimer for berggylt og rognkjeks larver

Denne arbeidspakken omfattet to startfôringsforsøk med berggylt (**Kapittel 5**) og rognkjeks (**Kapittel 6**) som begge ble avsluttet etter at larvene var ferdig med tørrförtilvenning. Målet var å undersøke hvordan fiskelarvene ble påvirket av alternative fôr sammenliknet med det som blir brukt av oppdrettere i dag, hvordan fôr kvalitet og fôrorganismer påvirker ulike kvalitetsparametere i fiskelarvene, og til slutt, å identifisere nøkkelfaktorer som kan bidra til å produsere sterkere og mer hardføre fiskelarver i et oppdrettsmiljø. Data fra denne arbeidspakken ble kombinert med DEB-data fra AP1 og brukt til å utvikle en bioenergetisk modell som dekker hele perioden fra egg-befruktning til tørrförtilvenning.

Metoder, resultater og vurdering av funnene fra dette prosjektet er beskrevet i de påfølgende kapitlene. Grunnet den svært omfattende mengden data, metoder og resultater arbeidet har omfattet, og at deler av arbeidet fortsatt er i ferd med å bli ferdigstilt i flere MSc-oppgaver, og/eller inngår i artikler som er under publisering, har det ikke vært mulig å inkludere alt i denne rapporten. Mer detaljert informasjon vil bli å finne i kommende vitenskapelige artikler og masteroppgaver som alle er listet i Kapittel 9 – Leveranser.

3 Metodeutvikling for kvalitetsvurdering av Rognkjeksegg (AP1)

Den biokjemiske sammensetningen i fiskeegg reflekterer dietten til moren under kjønnsmodningen, og både lipid- og fettsyresammensetning er kritiske faktorer for levedyktigheten til eggene hun produserer (Izquierdo et al., 2001). Særlig innholdet av flerumettede fettsyrer som dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA) ser ut til å være viktig for eggkvaliteten hos flere arter marin fisk (Pickova et al., 1997; Furuita et al., 2000; Fuiman and Ojanguren, 2011). Hvordan lipidsammensetningen i eggene påvirker yngelkvalitet og -utvikling er verdt å undersøke, både for å identifisere mulige markører for eggkvalitet, men også for å få indikasjoner på ernæringskravene til stamfisk av rognkjeks. I fiskeegg er lipider ikke bare viktige som hovedkilden til energi for embryoet, men lipidsammensetningen påvirker også flere fysiologiske prosesser i embryonale membraner som hvor godt membranene tåler stress som endringer i temperatur, trykk og peroksidasjon av membranstrukturer (Parrish, 2013). Heterogeniteten til lipider og deres relasjon til befruktning og fysiologiske mekanismer gjør de til attraktive biomarkører for å vurdere eggkvalitet.

Bruk av biomarkører for å vurdere eggkvalitet i beinfisk utgjør en tidseffektiv forbedring sammenliknet med tradisjonelle metoder slik som å studere utviklingen til fiskelarver i en eller flere kohorter i sanntid, hvilket er både tidkrevende og vanskelig (Bobe, 2015). Dette arbeidet er et første steg mot å utvikle molekylære markører som kan brukes til å vurdere kvaliteten i en egg-gruppe og de påfølgende larvene hos rognkjeks. Så vidt vi vet er dette det første forsøket på å bruke lipidomics til dette formålet. Hovedmålet i dette forsøket var å undersøke om fettsyresammensetning og lipidomics kan bli brukt til å forklare variasjoner i egg og larvekvalitet hos rognkjeks.

3.1 Materialer og metode

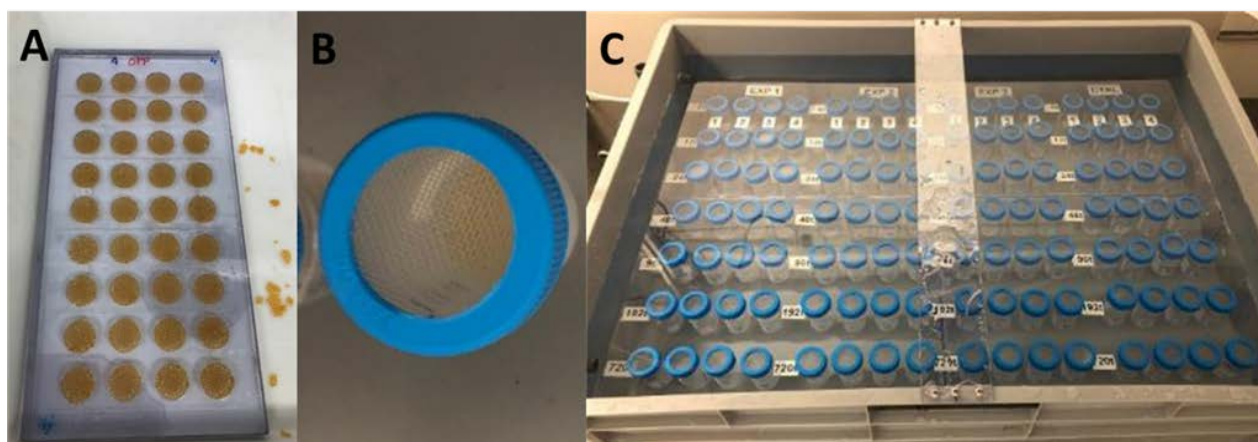
Forsøk og analyser ble utført ved SINTEF og NTNU SeaLab i perioden september 2019 – november 2021. Rognkjeksegg ble anskaffet fra 3 ulike kilder; villfangede hunner fra Namdal Rensefisk AS (heretter kalt "NR") og Skjerneset fisk (heretter kalt "RK2"), og egg fra stamfisk ble anskaffet fra en 1. generasjon med stamfisk hos Nofima AS, Avd. Sunndalsøra, som var frembragt i FHF-prosjektet CleanLifeCycle (#901562). Eggene fra Nofima kom fra tre ulike grupper med stamfisk som ble føret forskjellige eksperimentelle fôr med varierende lipid- og karbohydratinnhold (heretter kalt "LS-BS-1", "LS-BS-2" and "LS-BS-3"). Informasjon om fôrsammensetningen kan leses i CleanLifeCycle's faglige sluttrapport (<https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901562/>). For å utelukke paternale effekter i forsøket ble det brukt kryopreservert melke fra en enkelt rognkjekshann (levert av Cryogenetics AS) til å befrukte alle egg-gruppene. Alle grupper med egg ble anskaffet ved å stryke morfisken samme dag som de ankom SINTEF SeaLab. En oversikt over de ulike gruppene er vist i Tabell 3-1.

Tabell 3-1: Oversikt over de ulike gruppene med rognkjeksegg som ble brukt i forsøket, inkludert opprinnelse og kort beskrivelse av stamfiskfôr.

Gruppe	Antall grupper	Kilde	Fôr/fôrkarakteristikk
NR-#1-3	3	Namdal Rensefisk, villfanget	Naturlig fôr
RK2-#1	1	Skjerneset Fisk, villfanget	Naturlig fôr
LS-BS-1-1 to LS-BS-1-3	3	Stamfisk fra Nofima, Tank 1	18.7% lipid, 7.6% karbohydrater
LS-BS-2-1 to LS-BS-2-6	6	Stamfisk fra Nofima, Tank 2	13.9% lipid, 13.5% karbohydrater
LS-BS-3-1 to LS-BS-3-4	4	Stamfisk fra Nofima, Tank 3	7.3% lipid, 18.00% karbohydrater

Befruktning og inkubering av rognkjeksegg:

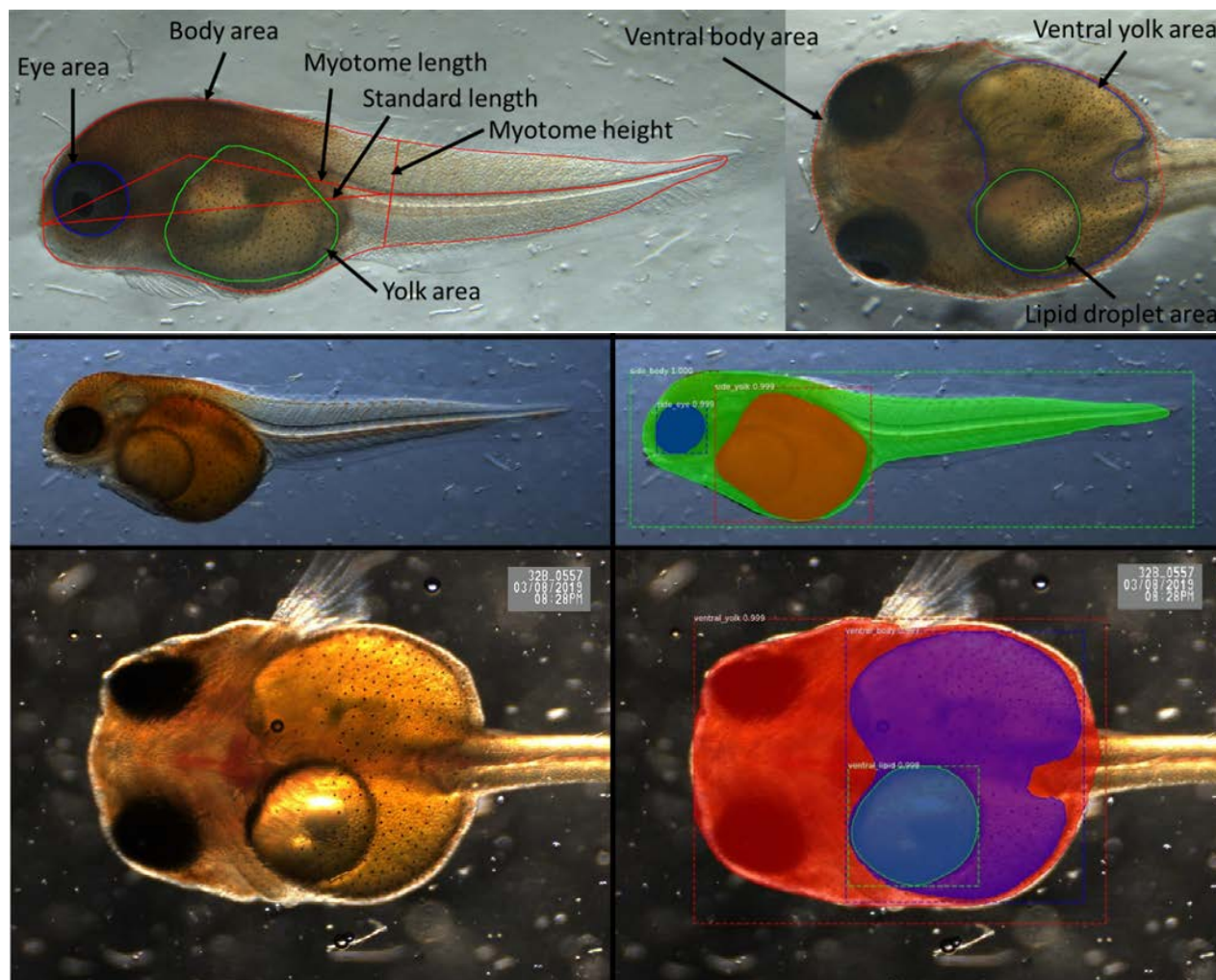
Ubefruktede egg (50 mL) ble overført til et begerglass for å bunnfelle (1 minutt) før overflødig væske ble helt av og melke (1 mL) ble tilsatt. Løsningen ble deretter omrørt forsiktig i tre minutter før 50 mL med filtrert sjøvann ble tilsatt og løsningen ble rørt om i ytterligere 2 minutter og deretter ble eggene plassert i en form for å lage egg-kaker bestående av ett-lags sirkler med 80-90 rognkjeksegg. Eggene fikk stå i 15-20 minutter for å herde før de ble overført til plastrør med planktonduk (SEFAR NITEX) i topp og bunn med 7 – 12 replikater per egg-gruppe. Plastrørene med egg ble overført til en egenprodusert inkubator med vanngjennomstrømning, konstant temperatur (9-10 °C), et lysregime på 12 timer lys og 12 timer mørke (12:12 L:D) hvor eggene fikk utvikle seg frem til klekking (29 – 30 dager etter befruktning). Forsøkeriggen er vist i Figur 3-1. Befruktning ble estimert etter andel befruktete egg sammenliknet med totalt antall egg, og klekkesuksess ble beregnet ut fra andelen egg som klekket sammenliknet med det totale antallet befruktete egg.



Figur 3-1: A: Formen brukt til å støpe "egg-kaker" B: Plastrøret med planktonduk i topp og bunn brukt til å inkubere egg-kakene i individuelle klekkekammer. C: Eurobox med 112 individuelle plastrør, hver og en med gjennomstrøm av sjøvann.

3.1.1 Prøvetaking, billedtaking og analyser

Gjennom forsøksperioden ble det undersøkt en rekke responsvariabler hos rognkjekseggene slik som oksygenopptak (respirasjon), biometri, utviklingsstadium, totalt lipid, fettsyresammensetning, karbon- og nitrogeninnhold, tørrvekt og forbeining. Ubefruktede egg ble benyttet for lipidanalyser (snap-fryst og lagret på -80 °C). For billedtaking ble det benyttet et makroobjektiv (Leica Z4, Leica Microsystems, Germany) og et CMOS kamera (MC170HD, Leica Microsystems, Germany). Alle larver ble bedøvet med en overdose av tricaine methane sulfonate (MS-222 Finquel®, Agent Chemical Laboratories Inc., USA) løst i sjøvann for prøvetaking. ImageJ software (Schneider et al., 2012) ble brukt til biometriske målinger av egg, og biometriske analyser av larver ble utført på bakgrunn av et treningssett med manuell annotering av bilder og automatiserte bildebehandlingsteknikker som Topological Structural Analysis (TSA) (Fitzgibbon and Fisher, 1996), ellipse fitting (Zhang and Suen, 1984) and skeletonize (Fig. 3-2).



Figur 3-2: Topp: Biometriske parametere som ble målt ved bruk av automatiserte analyser av standardiserte bilder av rognkjeslarver fra siden og ovenfra på dag 1 etter klekking. **Midt til venstre:** Tatt bilde. **Midt til høyre:** Utdata fra fil med automatisert analyse som viser gjenkjente områder av interesse på larven (ROI): Grønn: Kroppsareal; Brun: Plommesekkareal; Blå: Øyareal. **Bunn venstre:** Tatt bilde. **Bunn høyre:** Utdata fra automatisert analyse som viser gjenkjente områder av interesse (ROI): Rød: Kroppsareal. Lilla: Plommesekkareal. Blå: Lipiddråpeareal.

Respirasjon og tørrvekt:

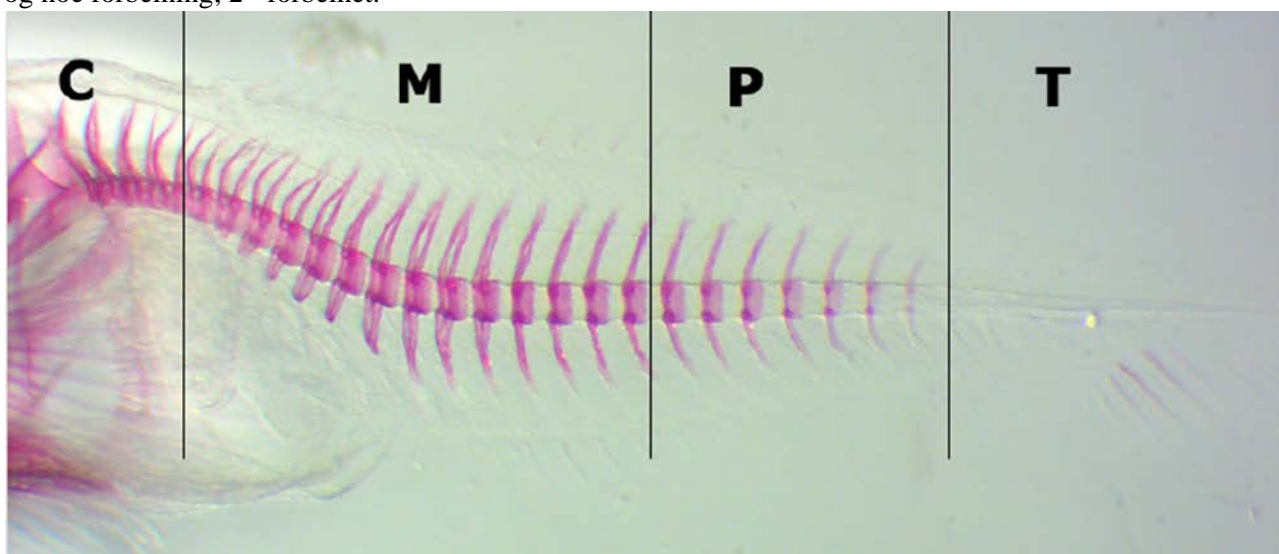
Respirasjon ble målt ved bruk av et MicroRespiration System (Unisense, Denmark) bestående av to oksygensensorer (OX-MR) koblet til et MicroSensor Multimeter og et MicroRespiration Rack (MR2-Rack) utstyrt med en MicroRespiration Stirrer controller (MR2-Co). Alle målinger ble utført ved 10°C på enten (i) 5 egg eller (ii) en larve. Respirasjonsrater ble kalkulert med SensorTrace Rate software (application version 2.8.200.21688). Etter måling ble egg eller larver pipetert over i destillert vann for fjerning av saltvann og deretter over i forhåndsveide tinnkapsler for veiing og elementanalyser. Etter tørking ved 60°C ble larvene sendt til NC Technologies (Milan, Italia) for analyser av karbon- og nitrogeninnhold.

Lipidekstraksjon, totallipid, lipidomics og fettsyresammensetning:

Lipider ble ekstrahert i henhold til Folch-metoden (Folch, et al., 1957) og totallipid ble bestemt gravimetrisk ved veiing av lipidekstrakt. Fettsyresammensetning ble bestemt ved transmetylering av fettsyrer til fettsyremetylestere (FAMES) og GC-FID analyse. Lipidklasser ble analysert ved bruk av gasskromatografi som beskrevet av Khroomrung et al. (2013), og prøver for lipidomics ble analysert med en Agilent 1260 UPLC koblet til en 4670 triple quadrupole mass spectrometer med en electrospray ion source. Data fra LC-MS/MS analyser ble analysert ved bruk av Agilent MassHunter Quantitative Analysis software package.

Forbeining:

Larver ble fiksert i 4% paraformaldehyde (PFA) i en phosphate buffered saltløsning (pH 7.4, Apotekproduksjon AS; Norway) og lagret ved 4 °C. Beinfarging ble utført med Alizarin Red i henhold til Kjørsvik et al. (2009), og etter farging ble larvene avbildet med bruk av et stereomikroskop (Leica MZ75, Germany or Leica M205 C, Germany) utstyrt med et kamera (Zeiss Axiocam ERc 5S). Grad av forbeining i ulike kroppsdeler ble bestemt i henhold til et klassifiseringsskjema for forbeining av Kjørsvik et al. (pers. comm.). Forbeining av ryggrad ble klassifisert i henhold til grad av farging av segmenter med følgende kategorier (se Fig. 3-3): Transparent (T) = ingen farging av ryggvirvel; Partly (P)= farging dekker ikke hele segmentet eller har mindre intens farge; Moderate (M) = farging dekker hele omrisset av ryggvirvelen med mindre mettet farge enn for kompakte segmenter; Compact (C) = mettet farge som dekker hele segmentet, Forbeining av sugekopp ble vurdert på en skala fra 0 til 2: 0= ingen synlig forbeining; 1= svakt synlig farge og noe forbeining; 2= forbeinet.



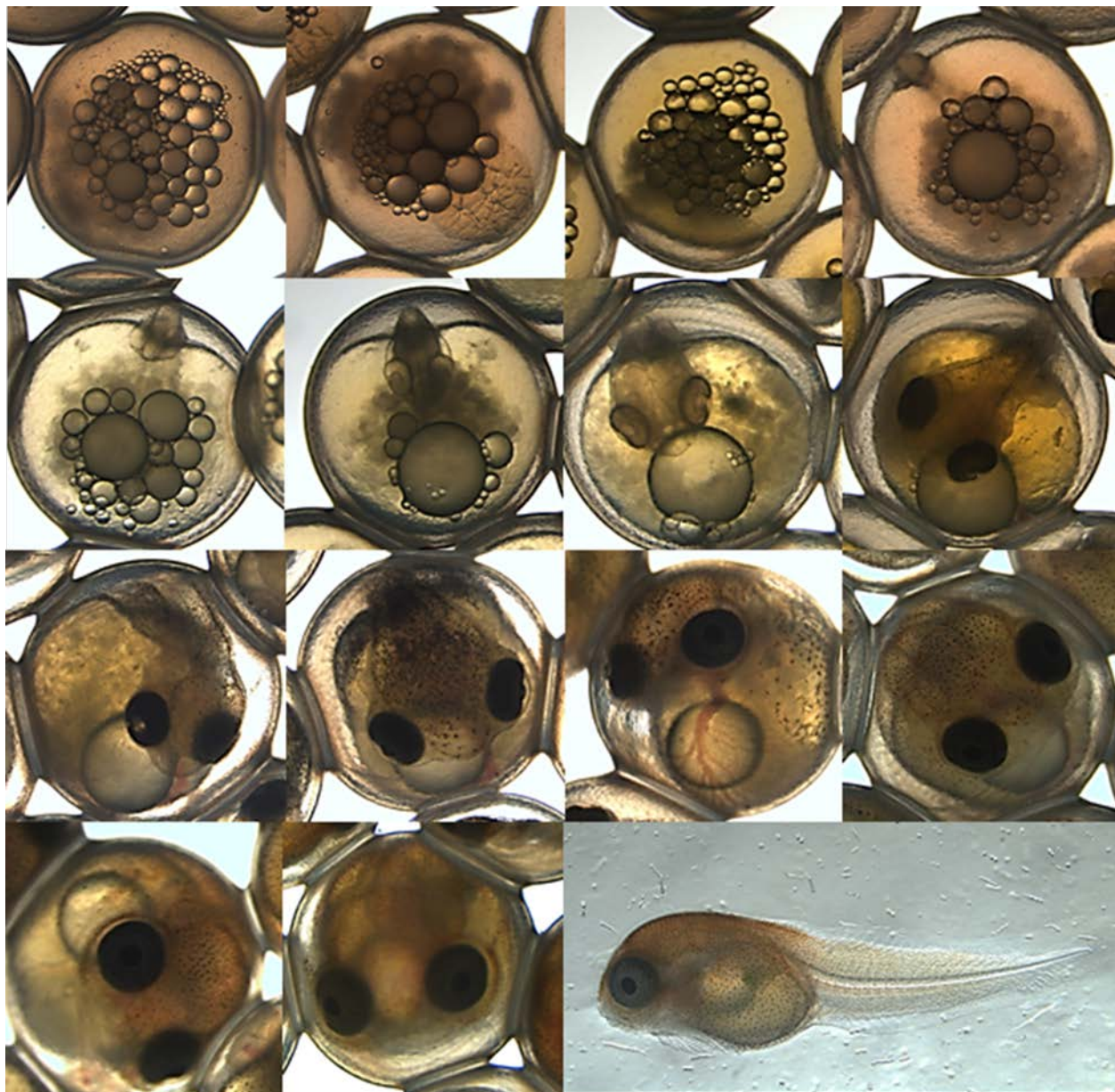
Figur 3-3: Forbeiningsgradiet for ryggvirvler i en nylig klekket rognkjekslarve kategorisert til Compact (C), Moderate (M), Partly (P) og Transparent (T). Klassifiseringen var basert på fargemetning og dekningsgrad i hvert segment av ryggvirvlene.

Statistikk:

GraphPad ver. 9.0 ble brukt til å visualisere data og for å vise variasjonen i individuelle datasett, inkludert variansanalyse (ANOVA). Dataanalyser og multivariat statistikk ble gjennomført ved å bruke mixOmics R package (Lê Cao, et al., 2009; Rohart, et al., 2017).

3.2 Resultater

Observasjoner og bilder av rognkjekseggene under embryonalutviklingen ble gjennomført minst hver 2.-3. dag. Ubefruktede egg inneholdt flere oljedråper (Fig. 3-4, bilde 1) som gradvis vokste sammen til en stor dråpe (Fig. 3-4, bilde 5 og 6). Perivitellin-rommet var synlig en dag etter befruktning (Fig. 3-4, bilde 3), og gastrulering ble observert på dag 4 etter befruktning (Fig. 3-4, bilde 3). Begynnelsen på formasjon av øyer var svakt synlig på dag 6 etter befruktning (Fig. 3-4, bilde 4) og økte gradvis i størrelse frem til pigmentering var noe synlig på dag 12 etter befruktning (Fig. 3-4, bilde 7) og var fullt pigmentert på dag 14 etter befruktning (Fig. 3-4, bilde 8). Blodårer med røde blodceller var synlig rundt plommesekken ved dag 16 (Fig. 3-8, bilde 9), og hulvenen (vena cava) kunne observeres ved dag 19 etter befruktning (Fig. 3-8, bilde 10). De siste 10 dagene før klekking ble embryoet gradvis større, fikk økt pigmentering på kropp og ble gradvis mer aktive frem mot klekking som inntraff på dag 29 etter befruktning (Fig.3-4, bilde 15). Alle målte parametere for rognkjekslarvene er oppsummert i Tabell 3-2. For resultater av beinfarging henviser vi til MSc-oppgaven til Rye, R.Z. 2020 og Hansen et al. (*in prep*).



Figur 3-4: Bilder av rognkjeksembryo tatt på 15 forskjellige dager under embryonalutviklingen ("NR"-gruppen) ved 9 °C. Nummerert fra venstre til høyre, rad for rad og fra topp til bunn: 1: Ubefruktet egg 0 dpf (17/10). 2: 1 dpf (18/10). 3: 4 dpf (20/10). 4: 6 dpf (22/10). 5: 7 dpf (23/10). 6: 9 dpf (25/10). 7: 12 dpf (28/10). 8: 14 dpf (30/10). 9: 16 dpf (01/11). 10: 18 dpf (03/11). 11: 19 dpf (04/11). 12: 22 dpf (07/11). 13: 26 dpf (11/11). 14: 28 dpf (13/11) og 15: Klekket larve 30 dpf (15/11). Dpf= dager etter befruktning

Tabell 3-2: Gjennomsnittsverdier for alle fysiologiske og morfologiske målinger gjennomført på rognkjeksegg og -larver fra alle gruppene som inngikk i forsøket og som ble inkludert i de multivariate statistiske analysene. Oversikten viser vekt og lengde av hunner som ble strøket for egg, befruktningsrater og klekkesuksess, vekt, karbon- og nitrogeninnhold for egg og larver (basert på tørrvekt), egg-diameter, larvebiometri (standardlengde, fraksjon av plommesekkareal av totalt kroppsareal, antall lipiddråper), hjerterate og respirasjonsrater.

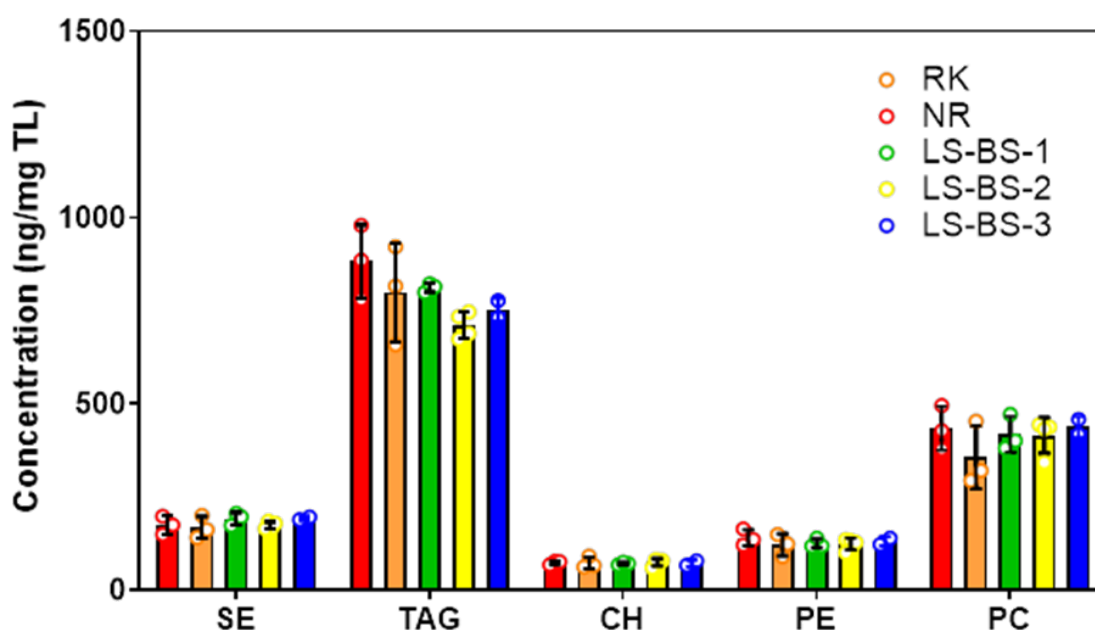
Egg batch	Unit	NR-#1	NR-#2	NR-#3	RK2-#1	RK2-#2	RK2-#3	LS-BS-1-1	LS-BS-1-2	LS-BS-1-3	LS-BS-2-1	LS-BS-2-2	LS-BS-2-3	LS-BS-2-4	LS-BS-2-5	LS-BS-3-1	LS-BS-3-2	LS-BS-3-3	LS-BS-3-4
Mother weight	g	4986	2979	3264	4000	2500	2320	2322	2652	2288	3083	2929	2861	3028	1987	3361	3099	2740	3158
Mother length	cm	47	41	41	37.6	34.2	31.1	34.5	35.5	38	36.2	36.2	34.2	37.2	32.2	37.5	36.5	35.2	37.5
Fertilization success	%	98.5	91.9	91.8	83.6	84.4	67.2	74.2	71.0	46.2	6.5	3.7	2.4	0.0	70.9	24.4	16.3	2.1	85.2
Egg dry weight	µg · ind ⁻¹	1.81	1.54	1.84	1.61	1.90	2.41	1.33	1.52	1.03	1.29	1.18	1.30	NA	1.48	1.35	NA	1.32	1.51
Egg carbon content	µg · ind ⁻¹	0.93	0.78	0.95	0.82	0.97	1.21	0.73	0.85	0.57	0.71	0.67	0.73	NA	0.80	0.73	NA	0.67	0.81
Egg nitrogen content	µg · ind ⁻¹	0.19	0.15	0.19	0.17	0.21	0.26	0.14	0.16	0.12	0.14	0.13	0.15	NA	0.16	0.15	NA	0.14	0.16
Egg C/N-ratio	0	4.60	4.73	4.54	4.42	4.40	4.28	4.82	4.84	4.52	4.62	4.85	4.68	NA	4.72	4.48	NA	4.47	4.79
Hatching success	%	90.9	95.1	87.8	90.6	78.8	44.1	90.7	79.8	57.6	0.0	47.6	0.0	0.0	66.7	89.4	71.5	40.0	83.8
Standard length	mm	5.8	5.6	6.0	5.8	5.9	6.1	5.7	5.8	5.8	NA	5.9	NA	NA	5.9	5.7	5.7	5.8	6.0
Side yolk-fraction	-	0.21	0.18	0.20	0.19	0.22	0.22	0.17	0.22	0.16	NA	0.24	NA	NA	0.19	0.19	0.17	NA	0.18
Number of lipids	number	1.0	1.1	1.0	1.3	1.3	1.0	1.0	1.0	1.1	NA	1.0	NA	NA	1.1	1.0	1.0	NA	1.0
Ventral lipid fraction	-	0.485	0.440	0.476	0.451	0.498	0.475	0.405	0.476	0.386	NA	0.377	NA	NA	0.442	0.419	0.405	NA	0.430
Ventral yolk fraction	-	0.118	0.118	0.109	0.118	0.124	0.126	0.111	0.139	0.108	NA	0.086	NA	NA	0.088	0.086	0.084	NA	0.097
Egg diameter	mm	2.28	2.19	2.27	2.23	2.36	2.50	2.11	2.20	2.16	2.25	2.21	2.21	NA	2.27	2.25	2.33	2.20	2.22
Heart rate	bpm	80.9	80.5	81.7	85.5	84.2	83.7	80.8	80.2	80.5	NA	84.1	NA	NA	95.2	78.5	80.4	83.8	100.3
Dry weight	mg · ind ⁻¹	1.18	1.11	1.25	1.09	1.39	1.66	0.87	1.08	0.65	NA	0.66	NA	NA	0.93	NA	0.85	0.60	0.93
Carbon content	µg · ind ⁻¹	584.8	473.5	571.6	529.8	648.3	760.3	458.7	596.4	341.7	NA	362.9	NA	NA	462.2	NA	409.8	316.0	467.2
Nitrogen content	µg · ind ⁻¹	104.0	77.4	99.0	96.7	112.6	134.8	77.3	92.3	59.0	NA	62.8	NA	NA	85.3	NA	72.8	67.4	82.0
C/N-ratio	-	5.69	6.12	5.78	5.48	5.76	5.65	5.95	6.47	6.02	NA	5.78	NA	NA	5.43	NA	5.63	4.69	5.70
Respiration	µmol O ₂ · ind ⁻¹ · h ⁻¹	0.086	0.068	0.090	0.052	0.057	0.063	0.038	0.065	0.040	NA	0.058	NA	NA	0.078	NA	0.053	0.036	0.055

Totallipid og lipidklasser:

Ubefruktede egg fra villfangede hunner hadde i gjennomsnitt høyere lipidinnhold enn egg fra stamfisk. Et signifikant høyere lipidinnhold ble funnet for gruppen RK2 sammenliknet med LS-BS-3 ($p < 0.05$). Egg fra stamfisk viste en økende trend for høyere lipidinnhold i sammenheng med høyere lipidinnhold i stamfiskfôret, men forskjellen var ikke signifikant (Tab. 3-3). For lipidklasser ble det detektert steryl esters (SE), triacylglycerides (TAG), kolesterol (CH), fosfatidylethanolamines (PE), and fosfatidylcholines (PC) i eggene (Fig. 3-5), hvor eggene hovedsakelig bestod av TAGs som også er vanlig i andre fiskeegg (Wiegand, 1996). Egg fra villfanget fisk hadde høyere innhold av TAG's enn egg fra stamfisk, og det ble funnet en svak korrelasjon mellom innhold av TAG og lipidinnhold i fôret til morfisken.

Tabell 3-3: Lipidinnhold (% av våtvekt) i de ulike gruppene med rognkjeksegg før befruktning.

Gruppe ID	% Lipidinnhold
RK2-#1	3,65%
RK2-#2	3,30%
RK2-#3	4,88%
NR-#1	3,54%
NR-#2	2,99%
NR-#3	3,93%
LS-BS-1-1	3,38%
LS-BS-1-2	3,47%
LS-BS-1-3	3,14%
LS-BS-2-1	3,03%
LS-BS-2-2	3,40%
LS-BS-2-3	3,02%
LS-BS-2-4	3,25%
LS-BS-3-2	2,71%
LS-BS-3-3	2,44%



Figur 3-5: Sammensetning av lipidklasser i ubefruktede rognkjeksegg bestemt av LC-CAD. Søyler viser gjennomsnittsverdier av de ulike lipidklassene for de ulike gruppene av rognkjeksegg og feillinjer viser \pm SD av de tre replikatene (*kun to grupper for LS-BS-3).

Fettsyresammensetning:

Alle prøver var dominert av flerumettede fettsyrer (41 %) etterfulgt av mettede (25,2 %) og enumettede (30,2 %) fettsyrer. Gjennomsnittlig omega-3 innhold var 34,6 %. Den mest dominerende fettsyren var oleic acid (C18:1n9, 19.7%), etterfulgt av palmitic acid (C16:0, 18.0%), docosahexaenoic acid (C22:6n3, 17.9%), og eicosapentaenoic acid (C20:5n3, 13.0 %) (Tab. 3-4).

Tabell 3-4: Fettsyreprofil for forskjellige grupper med ubefruktede rognkjeksegg. Resultater er vist som gjennomsnittlig prosent av totalt FAME-innhold (%) \pm SD for replikater (n=3). Sat= mettede fettsyrer, mono= enumettede fettsyrer, poly= flerumettede fettsyrer.

	NR	RK2	LS-BS-1	LS-BS-2	LS-BS-3
C14:0	1,97 \pm 0,13	1,61 \pm 0,45	1,29 \pm 0,07	1,26 \pm 0,07	0,92 \pm 0,02
C14:1	0,12 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00
C15:0	0,42 \pm 0,08	0,36 \pm 0,08	0,29 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01	0,20 \pm 0,00
C16:0	18,07 \pm 2,65 ^{AB}	16,97 \pm 0,44 ^A	18,49 \pm 0,42 ^B	18,24 \pm 0,40 ^B	18,30 \pm 0,19 ^B
C16:1	2,14 \pm 0,09 ^{AB}	1,80 \pm 0,07 ^A	2,88 \pm 0,25 ^{AB}	2,91 \pm 0,09 ^B	2,80 \pm 0,23 ^{AB}
C17:0	0,76 \pm 0,07	0,70 \pm 0,18	0,41 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03	0,27 \pm 0,00
C17:1	0,38 \pm 0,06	0,35 \pm 0,04	0,37 \pm 0,02	0,37 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02
C18:0	4,79 \pm 0,52	4,66 \pm 0,31	4,76 \pm 0,14	4,77 \pm 0,16	5,14 \pm 0,34
C18:1n9	18,81 \pm 2,31 ^B	17,63 \pm 0,12 ^A	19,12 \pm 0,91 ^B	20,60 \pm 0,64 ^C	23,25 \pm 0,84 ^D
C18:1n7	3,18 \pm 0,23 ^{AB}	3,06 \pm 0,77 ^A	4,32 \pm 0,22 ^C	4,18 \pm 0,38 ^{BC}	4,55 \pm 0,32 ^C
C18:2n6	1,20 \pm 0,05 ^A	1,07 \pm 0,11 ^A	5,80 \pm 0,21 ^B	6,45 \pm 0,35 ^B	10,69 \pm 0,76 ^C
C18:3n6	0,15 \pm 0,05	0,12 \pm 0,03	0,06 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
C18:3n3	0,66 \pm 0,17	0,60 \pm 0,22	0,61 \pm 0,01	0,63 \pm 0,03	0,80 \pm 0,05
C18:4n3	0,87 \pm 0,14	0,88 \pm 0,12	0,56 \pm 0,03	0,53 \pm 0,03	0,41 \pm 0,02
C20:0	0,06 \pm 0,02	0,05 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02
C20:1	3,67 \pm 0,68 ^A	2,89 \pm 0,39 ^{AB}	2,76 \pm 0,15 ^{AB}	2,47 \pm 0,22 ^{BC}	1,45 \pm 0,15 ^C
C20:2n6	0,24 \pm 0,03	0,20 \pm 0,03	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,27 \pm 0,06
c20:3n6	0,10 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02
C20:4n6	0,64 \pm 0,08	0,67 \pm 0,08	0,79 \pm 0,05	0,77 \pm 0,02	0,68 \pm 0,01
C20:3n3	0,13 \pm 0,01	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02	0,10 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01
C20:4n3	0,93 \pm 0,21	0,97 \pm 0,20	0,91 \pm 0,04	0,90 \pm 0,09	0,84 \pm 0,11
C20:5n3	14,73 \pm 2,79 ^B	16,13 \pm 0,96 ^A	12,25 \pm 0,52 ^C	11,61 \pm 0,34 ^C	9,85 \pm 0,02 ^D
C22:0	0,03 \pm 0,01	0,07 \pm 0,06	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
c22:1n11	0,67 \pm 0,12	0,46 \pm 0,13	0,65 \pm 0,04	0,54 \pm 0,08	0,23 \pm 0,00
C22:1n9	0,39 \pm 0,06	0,29 \pm 0,06	0,15 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
C22:2	0,25 \pm 0,04	0,26 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01
C22:3	0,12 \pm 0,10	0,12 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00
C22:4	0,19 \pm 0,03	0,20 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
C22:5n3	1,13 \pm 0,27	1,17 \pm 0,12	1,70 \pm 0,15	1,53 \pm 0,11	1,41 \pm 0,17
C24:0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
C22:6n3	18,61 \pm 3,36 ^B	22,07 \pm 1,42 ^A	16,98 \pm 0,46 ^C	16,89 \pm 0,25 ^C	13,73 \pm 0,64 ^D
C24:1n9	0,20 \pm 0,03	0,19 \pm 0,10	0,21 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01
Sum sat	26,11 \pm 3,39	24,41 \pm 0,14	25,34 \pm 0,36	25,02 \pm 0,33	24,97 \pm 0,53
Sum mono	29,55 \pm 3,24 ^B	26,78 \pm 0,59 ^A	30,54 \pm 1,14 ^B	31,51 \pm 0,63 ^{BC}	33,00 \pm 1,21 ^C
Sum poly	39,94 \pm 6,91 ^A	44,62 \pm 0,19 ^C	40,62 \pm 0,98 ^{AB}	40,33 \pm 0,55 ^{AB}	39,36 \pm 0,58 ^A
Sum omega 3	37,06 \pm 6,61 ^B	41,92 \pm 0,08 ^A	33,10 \pm 1,05 ^C	32,19 \pm 0,46 ^C	27,12 \pm 0,30 ^D

Lipidomics:

På grunn av de overveldende mengdene data som ble generert i LC-MS/MS analysen (hundrevis av signaler per prøve) vil vi ikke vise individuelle verdier her og må henvise til multivariat statistikk og PCA-plott (Hansen et al., in press). Basert på fettsyresammensetning ble egg-gruppene adskilt i henhold til om de kom fra stamfisk eller fra villfangede individer, men også basert på fôret til morfisken. Videre analyse viste at både vekt og lengde på morfisken hadde sterke korrelasjoner til innhold av TAGs i egget, hvilket viser at større hunnfisk allokterer et større energilager av TAGs i eggene deres, i tillegg til at de produserer større egg. Videre viste analysene at det var en sterk korrelasjon mellom innhold av fosfatidylcholin (PC) og både befruktningssuksess og klekkesuksess, og dette indikerer at denne lipidgruppen har en viktig funksjon i utviklingen av embryo hos beinfisk. PCs har også blitt vist å fungere som både et energilager og å være hovedkilden til strukturelle lipider i fiskeegg (Cejas et al., 2004; Rainuzzo et al., 1997; Wiegand, 1996), så det er ikke overraskende at disse lipidklassene korrelerer med klekkesuksess og befruktningssuksess.

3.3 Diskusjon, konklusjon og anbefalinger

Våre data viser at lipidprofilen til rognkjeksegg henger tett sammen med både størrelsen på hunnfisken, klekkesuksess og befruktningssuksess. Vi mener at disse data kan brukes til å lage en liste over lipider som kan brukes som indikatorer for å forutsi levedyktigheten til rognkjeksembryo.

For lipidanalysene har vi kommet frem til tre konklusjoner. Først og fremst viste lipidprofilen at denne kunne separere egg-grupper basert på fôringshistorikk. Observasjoner av at eggene grupperte seg i henhold til parametere som gir mening i en biologisk sammenheng bygger opp om gyldigheten av resultatene. For det andre var lipidomics-profilene indikative for kvalitetsparametere, hvor størrelsen av morfisken og eggenes levedyktighet kunne korreleres til lipidprofilen. For akkurat størrelsen på hunnfisken fant vi hovedsakelig korrelasjoner når vi også inkluderte villfangede individer i analysen. Dette er ikke overraskende siden vi vet at lipidinnholdet i eggene fra villfangede individer vil variere avhengig av hva den spiser, geografisk utbredelse og sesong, og eggene vil reflektere dette. Sist, men ikke minst, viser våre data at følgende lipidkomponenter, som tilhører klasser av fosfolipider som begge er viktige komponenter i biologiske membraner, kan være viktig for embryonalutviklingen hos rognkjeks og kan brukes som molekylære markører for eggkvalitet med hensyn til å forutsi befruktningssuksess og klekkesuksess: fosfatidylcholin 33:1, 34:1, 40:1, 40:6, og 41:6, og fosfatidyletanolaminer 34:1, 36:1, 38:2, og 40:1.

Videre arbeid bør fokusere på identifisering av sammensetning av disse lipidene, teste om de faktisk kan brukes som indikatorer for å skille gode fra dårlige grupper med rognkjeksegg, og utdype de molekylære mekanismene disse lipidene har i embryonalutviklingen.

3.4 Referanser

- Bobe, J., 2015. Egg quality in fish: Present and future challenges. *Animal Frontiers*, 5(1), pp.66-72.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Felipe, B., Lorenzo, A., 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139, 209-216.
- Fitzgibbon, A.W., Fisher, R.B., 1996. A buyer's guide to conic fitting. University of Edinburgh, Department of Artificial Intelligence.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Fuiman, L.A. and Ojanguren, A.F., 2011. Fatty acid content of eggs determines antipredator performance of fish larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), pp.155-165.
- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraishi, M. and Takeuchi, T., 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 187(3-4), pp.387-398.
- Izquierdo, M., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Khoomrung, S., Chumnanpuen, P., Jansa-Ard, S., Ståhlman, M., Nookaew, I., Borén, J., Nielsen, J., 2013. Rapid quantification of yeast lipid using microwave-assisted total lipid extraction and HPLC-CAD. *Analytical chemistry* 85, 4912-4919.

- Kjørsvik, E., Olsen, C., Wold, P.A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Rainuzzo, J., Olsen, A.I., Øie, G. and Olsen, Y., 2009. Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids on skeletal development and fatty acid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 294(3-4), pp.246-255.
- Lê Cao, K.-A., González, I., Déjean, S., 2009. *integrOmics*: an R package to unravel relationships between two omics datasets.
- Parrish, C.C., 2013. *Lipids in marine ecosystems*. ISRN Oceanography 2013.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.-O., Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2410-2416.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Le Cao, K.-A., 2017. *mixOmics*: an R package for 9omics feature selection and multiple data integration. *bioRxiv*, 108597.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.
- Zhang, T., Suen, C.Y., 1984. A fast parallel algorithm for thinning digital patterns. *Communications of the ACM* 27, 236-239.
- Wiegand, M.D., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in fish biology and fisheries* 6, 259-286.

4 Metodeutvikling for kvalitetsvurdering av berggyltegg (AP1)

Det er begrenset kunnskap om hvordan eggkvalitet hos berggylt påvirker befruktning og klekking, samt utvikling og overlevelse hos larvene, og det finnes per i dag ingen etablerte metoder for å måle eggkvalitet. Berggyltegg er små og sfæriske, og har et klebrig lag (limlaget) som omslutter egget og hjelper egget til å feste seg til ulike overflater. Det eneste detaljerte studiet som omtaler embryonalutvikling hos berggylt, er en *brief communication* av D'Arcy et al. (2012). Her identifiserer og beskriver de åtte embryonalstadier ved å bruke morfologiske nøkkeltrekk i henhold til standardisert nomenklatur (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI and VI+) på egg som ble inkubert ved 12.2 °C. I dette studiet klekket eggene 123 timer etter befruktning, hvilket tilsvarer 62,5 døgngrader (d°). Beskrivelsen av de ulike morfologiske utviklingstrekkene er vist i Tabell 4-1.

Tabell 4-1: Morfologiske trekk i embryonalutviklingen hos berggylt ved 12,2 °C (D'Arcy et al., 2012).

Stage	Stage name	Stage description	Time (h)	Circumference (°)	Morphological features
Ia	Zygote	Fertilization and zygote	0-4		Sticky gelatinous layer with a gap at the micropyle; egg diameter 885 µm excluding this layer; perivitelline space 12–25 µm at vegetal pole and 80 µm at animal pole; single cell c. 700 µm wide and 235 µm high at animal pole
Ib	Cleavage	Early and late morula	4-20.6		First division 3.5–4 h.
II	Blastula	Early and late blastula	20.6-29		An oblong ball of cells four to five layers of cells deep (280 µm high). After further divisions with cells becoming ever smaller, the blastoderm eventually flattens and envelops the yolk to c. one-third way around the yolk. Yolk syncytial layer forms YSL. Oil droplets are evenly dispersed throughout the yolk
III	Gastrula	Pre-early gastrula	29-35		Germ-ring begins outward migration toward the vegetal pole.
		Early gastrula			Blastoderm flattens. Germ-ring clearly visible
		Mid-gastrula			Germ-ring is well defined and steadily envelops yolk.
		Late gastrula			Blastoderm covers three quarters yolk; embryonic body becomes clearly visible; the enveloping layer expands uniformly over the yolk until this point.
		Early neurala		180	Head distinguishable. Oil droplets migrating toward vegetal pole; yolk plug exposed; rudimentary brain. Beak-like mass of cells anterior to head. Kupffer's vesicle (KV) appears.
IV	Segmentation (220-360°)	Late neurala		200	Rudimentary eye vesicle; beak-like mass of cells is still visible; KV enlarge somewhat; blastopore at the vegetal pole starts to close.
				220	Two to four somites; eye vesicle slightly more defined.
				290	Oil droplets migrate closer together; melanophores appear as pigmentation begins; eyes more distinct; eight to 10 somites; KV large; otolith vesicle; beak-like mass of cells disappears from anterior of head. Flat body cavity postero-ventral to the brain appears which contains the heart.
				310	Oil droplets migrate closer together; KV starts to shrink; 16–18 somites; brain has become more distinct; body cavity expands to accommodate the heart which is tubular.
V	Segmentation (360–435°)			330–340	Somites number 24–26, some of which become chevron shaped; tail still entirely attached; KV reduces; brain distinctly yellow; otolith vesicle enlarges; lens and cornea evident.
				360-370	Pigmentation denser; 30–32 somites; KV disappears; cornea and lens distinct; tail begins separation from yolk; beginning of membranes on caudal fin; heart grows.
				380–410	Oil droplets coalesce; 36–38 somites with an increasing number being chevron shaped; heartbeat 82 beats min ⁻¹ ; membrane on tail is more pronounced.
VI	Segmentation (435-510°)			40–44 Somites; tail reached anterior of eyes; tail membrane larger; pectoral fin protruding; heartbeat 87 beats min ⁻¹ ; pigmentation denser.	
				435–480	Melanophores increase in number and location around the body; 46–48 somites; heartbeat steady at 94 beats min ⁻¹ .
VI+	Hatching (510°)			480-510	Oil droplet less conspicuous; 46–48 somites; heartbeat 93 beats min ⁻¹ ; otolith within vesicle are clearly visible; cornea and lens well developed yet eyes without pigmentation.
				510	Pigments very dark and dense; 46–48 somites; heartbeat 98 beats min ⁻¹ . Hatch head-first and swim using short bursts near the surface.

Lipider er den tettteste formen av energi i marine økosystemer og de kan brukes til å måle tilførsel, sirkulering og tap av materialer. I fiskeegg påvirker lipidsammensetningen membraners evne til å håndtere stress slik som endringer i temperatur, trykk og peroksidasjon (Parrish, 2013). Heterogeniteten i lipider og deres relasjon til stress gjør de til attraktive biomarkører for å vurdere og forutsi eggkvalitet. Lipidomics, som er en kvalitativ og kvantitativ undersøkelse av en organismes lipidprofil, har blitt brukt til forskning på helse hos mennesker i over et tiår, med varierende grad av suksess. Et eksempel er en studie hvor det ble laget profiler av 3779 personer og funnet at 32 lipidkomponenter var signifikant forbundet med kardiovaskulære sykdommer og død relatert til hjertesykdom hos pasienter med type 2 diabetes (Alshehry et al., 2016). Innen marinbiologi viste en studie på oppdrettet *Larimichthys polyactis* og *Lateolabrax japonicus* i etterkant av en tropisk storm at lipidprofilene ble signifikant endret i løpet av stormen og indikerte at lipider kan brukes til å forutsi stresstoleranse hos fisk under ukontrollert miljøstress (Yan et al., 2012). Fiskers lipidprofil er hovedsakelig bestemt av dietten, og sammensetningen i eggene er tett knyttet opp til den maternale dietten og energilagre under kjønnsmodningen. Dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA) er ansett som de viktigste essensielle fettsyrene (Fuiman and Perez, 2015; Izquierdo et al., 2001; Pickova et al., 1997), og spesielt DHA ser ut til å spille en viktig rolle i utviklingen og overlevelsen hos marine fiskeembryo.

4.1 Materialer og metode

Forsøkene ble utført ved SINTEF og NTNU SeaLab i perioden september – desember 2019. Forskjellige nylig gytte grupper med egg ble sendt fra MOWI ASA til SINTEF ved to anledninger. Den første forsendelsen inneholdt egg fra et gytekar (heretter kalt "BG-1") samlet inn hos MOWI Rensefisk avd. Stord, og den andre forsendelsen inneholdt egg fra fem ulike gytekar hvor tre av disse ble levert av MOWI Rensefisk avd. Øygarden (heretter kalt "Stord1", "Stord2", "NOV-A", "NOV-B" and "NOV-C"). Idéen var å bruke egg fra fisk med så ulike bakgrunn som mulig for å oppnå størst mulig variasjon i testmaterialet for på den måten å identifisere ulikheter i eggenes biokjemiske sammensetning som kunne relateres til eggkvalitet. Informasjon om opprinnelse, egg-grupper og stamfisk er vist i Tabell 4-2. Eggene ble gytt og befruktet naturlig over natten på gytematter plassert i gytekar kvelden før eggene ble samlet inn og sendt. Stamfisken ble holdt på 11-11.5 °C og et 12:12 lys:mørke lysregime. På morgenen før forsendelsen ble eggene skrapet av gytemattene og plassert i doble plastposer (13 L) med oksygenert sjøvann og transportert i en isoporboks for levering samme dag til SeaLab (Fig. 4-1). Berggylt gyter vanligvis omtrent 3 timer etter at lysene blir slått av for natten, men siden eksakt tidspunkt for gyting er vanskelig å forutsi ble alle eggene bestemt til å være 1 dag etter befruktning ved ankomst (1 dpf).

Tabell 4-2: Informasjon om bakgrunnen for de seks gruppene med berggyltegg som ble levert til SINTEF Ocean, samt temperatur og oksygeninnhold i posene ved ankomst SeaLab. "Rekrutter" viser til stamfisk som er førstegenerasjon av fisk produsert i fangenskap.

Gruppe ID	Ankomst	Kilde	Temp, (°C)	Oksygen (mg/L)	Informasjon
BG-1	10.09.2019	MOWI Stord	14,5	NA	Villfangede hanner, og hunner fra 2016/17 fôret med spesialfôr
Stord1	12.11.2019	MOWI Stord	12,9	23,7	Villfanget i fra 2017
Stord2	12.11.2019	MOWI Stord	10,8	22,5	Villfanget i fra 2017
NOV-A	12.11.2019	MOWI Øygarden	11,0	17,5	Villfanget i fra 2016 og 2017
NOV-B	12.11.2019	MOWI Øygarden	11,8	14,2	Villfanget i fra 2018
NOV-C	12.11.2019	MOWI Øygarden	10,3	14,9	Rekrutter (hunner) fra 2014 og villfangede hanner i fra 2018

Inkubering av berggyltegg:

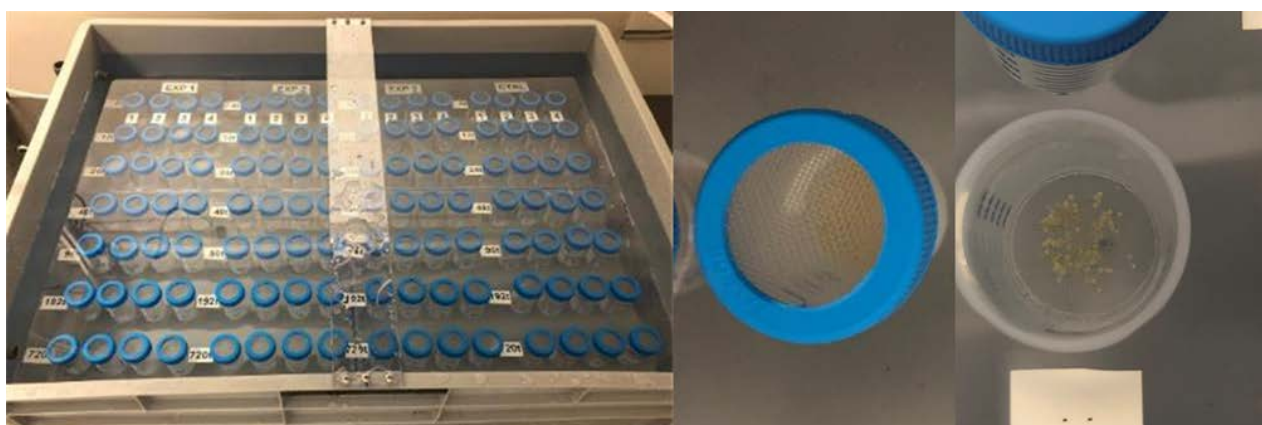
Ved ankomst ble posene, uten å åpnes først, lagt i en tank for temperaturakklimatisering (9.5 °C) i 2-4 timer. Deretter ble innholdet overført til en bøtte hvor det ble forsøkt å fjerne så mye rester som mulig (hovedsakelig plastfragmenter fra gytemattene de ble skrapet av fra) før eggene ble lagt i Eurobokser (<https://www.rslonline.no/kasser-containerer-paller-mm/eurokasser-tette>). Det var ikke mulig å fjerne alt av plastmaterialet som satt fast i limlaget (bildet til høyre i Fig. 4-1). Eggene målte omtrent 1.1 mm i diameter

(Ø) inkludert limlaget, og 0.92 mm uten limlaget, i tråd med hva som ble rapportert av Ottesen et al. (2012). Eggforsendelsene inneholdt egg av ulik utviklingsgrad, fra mid-blastulation til gastrulation (stage 2-3, Tab. 4-1). Vi observerte høy dødelighet for egg ved ankomst (40 – 70 % i snitt for alle forsendelser).



Figur 4-1: Bilder av transportbeholdere og aksjoner etter mottak. Topp venstre: Mottak av egg; under venstre: Innholdet i posene ble forsiktig overført til en bøtte; midt: Inkubering av egg i løpet av den første natten etter ankomst i en Eurobox med konstant vanngjennomstrømming; høyre: Berggyltegg etter forsiktig fjerning av rester og fibre.

Mindre grupper av egg (~200) ble overført til inkubatorer bestående av plastrør med planktonduk (120 µm lysåpning, SEFAR NITEX) i topp og bunn med 8 – 16 replikater per egg-gruppe. Plastrørene med egg ble til slutt overført til en egenprodusert inkubator med vanngjennomstrømming, konstant temperatur (9-10 °C), et lysregime på 12 timer lys og 12 timer mørke (12:12 L:D) hvor eggene fikk utvikle seg frem til klekking. Forsøksriggen er vist i Figur 4-2. Det var umulig å skille mellom befruktete, ubefruktete og døde egg i det eggene ble introdusert til inkubatoren fordi de var klumpet sammen, men eggene ble avbildet ved flere tidspunkt under inkubasjonsperioden i et forsøk på å få estimater på overlevelse og klekkesuksess.



Figur 4-2: Inkubering av berggyltegg. Venstre: Multi-inkubator med til sammen 112 individuelle kammer. Midt: Rør med planktonduk for å holde eggene på plass. Høyre: Bilde av egg etter to dager med inkubering.

4.1.1 Prøvetaking, billedtaking og analyser

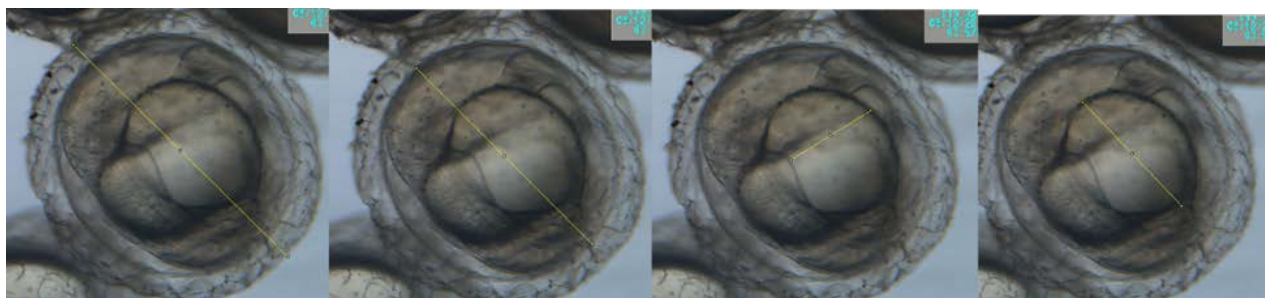
Prøver ble tatt av en rekke endepunkter, inkludert respirasjon, biometri, utviklingsstadier, lipidomics, karbon- og nitrogeninnhold, tørrvekt og bruskutvikling. Tabell 4-3 viser oversikt over hvilke prøver som ble tatt på de ulike dagene gjennom embryonalutviklingen.

Tabell 4-3: Oversikt over prøvetakingstidspunkt for de ulike gruppene med berggyltegg gjennom forsøksperioden. DPF= dager etter befruktning; R=respirasjon; M=mikroskopi/biometri; L=lipidomics; C=karbon/nitrogen; W= tørrvekt; B=bein/bruskfarging.

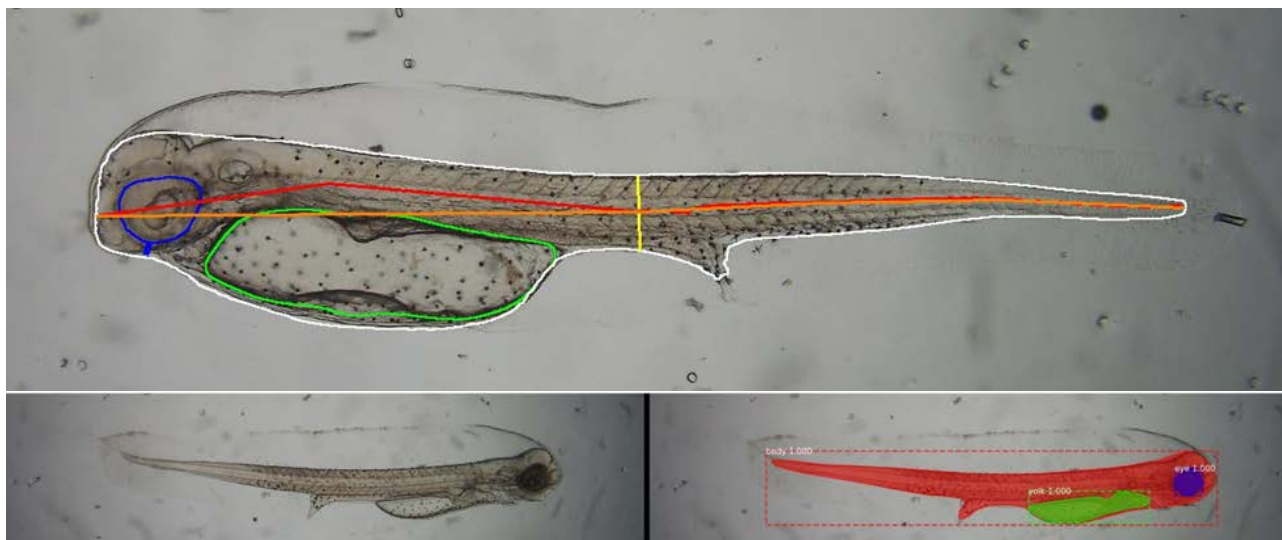
DPF	Dato	BG-1	Dato	Stord1	Stord2	NOV-A	NOV-B	NOV-C
1	10.09	LMRCW	12.11.	M	M	M	M	M
2	11.09	M	13.11.	LMRCW	LMRCW	LMRCW	LMRCW	LMRCW
3	12.09	MRCW	14.11.	M	M	M	M	M
4	13.09		15.11.	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW
5	14.09	M	16.11.	M	M	M	M	M
6	15.09	MRCW	17.11.					
7	16.09	MRCW	18.11.	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW
8	17.09	MRCW	19.11.	M	M	M	M	M
9	18.09	MRCW	20.11.	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW
10	19.09	MRCW	21.11.	M	M	M	M	M
11	20.09	M	22.11.	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW
12	21.09	M	23.11.					
13	22.09	M	24.11.	M	M	M	M	M
14	23.09	MRCW	25.11.	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW
15	24.09		26.11.	M	M	M	M	M
16	25.09	MRCW	27.11.	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW	MRCW

Mikroskopering og avbildning av egg og larver:

Egg og larver ble immobilisert enkeltvis i en petriskål fylt med 3 % metylcellulose før avbildning/filming. Bilder ble tatt med et mikroskop (Eclipse 80i, Nikon Inc., Japan) utstyrt med Nikon PlanApo objektiv (2x for hele larver og 10x nærbilder og video), en 0.5x video adaptor og et CMOS kamera (MC170HD, Leica Microsystems, Germany). ImageJ ble brukt til å måle egg diameter, chorion-diameter og plommesekk hos embryo (se eksempler i Fig. 4-3) Standardiserte bilder av larver ble brukt til biometriske analyser av standardlengde, kroppsareal, plommesekkareal, myotomhøyde, øyareal og øye-til-panne-distanse. De biometriske analysene ble gjennomført automatisk ved bruk av Mask R-CNN nevralt nettverk arkitektur (He et al., 2017) og maskinlæring trent på manuelt annoterte bilder berggyltlarver ved ulike dager etter klekking. Det nevralt nettverket produserte utdata for kropp, øye og plommesekk, mens det for målinger av areal og lengde ble benyttet automatiske bildebehandlingsteknikker som Topological Structural Analysis (TSA) (Suzuki, 1985), ellipse fitting (Fitzgibbon and Fisher, 1996) og skeletonize (Zhang and Suen, 1984). Representative bilder av larver med uthevet sporing av distanse/areal er vist i Figur 4-4.



Figur 4-3: Biometriske målinger av egg ved bruk av ImageJ. Gule linjer representerer parameter som ble målt. Fra venstre til høyre: Total egg diameter, chorion diameter (uten limlag), inste diameter av plommesekk, lengste diameter av plommesekk.



Figur 4-4: Automatiserte biometriske analyser av berggyttlarver. Øverst: Hvit linje viser detektert omriss av hele kroppen. Grønn linje viser omriss av plommesekk, og blå linje viser omriss av øyet. Den gule linjen representerer myotomhøyden, den oransje viser standardlengde, og rød linje viser larvens totale lengde justert for kurving bak hodet. Bunn venstre: Bilde tatt. Bunn høyre: Utdata fra de automatiserte analysene som viser detekterte områder av interesse ("regions of interest"; ROI): Rød=Kroppsareal, Grønn=Plommesekkareal, Blå=Øyareal

Respirasjon og tørrvekt.

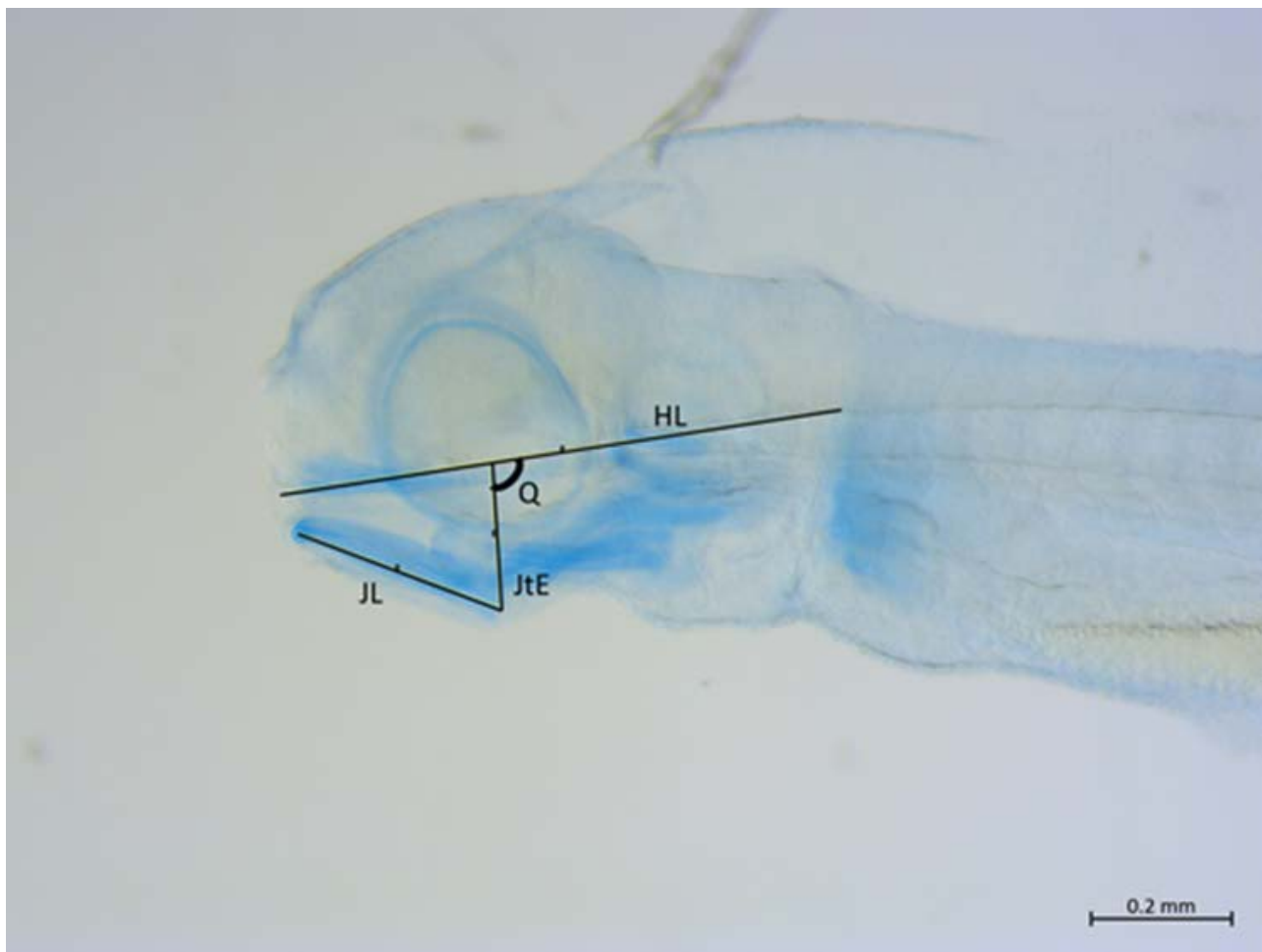
Respirasjon ble målt ved bruk av et MicroRespiration System (Unisense, Denmark) bestående av to oksygensensorer (OX-MR) koblet til et MicroSensor Multimeter og et MicroRespiration Rack (MR2-Rack) utstyrt med en MicroRespiration Stirrer controller (MR2-Co). Alle målinger ble utført ved 10°C på 5-6 egg eller larver. Respirasjonsrater ble kalkulert med SensorTrace Rate software (application version 2.8.200.21688). Etter måling ble egg eller larver pipettert over i destillert vann for fjerning av saltvann og deretter over i forhåndsveide tinnkapsler for veiing og elementanalyser. Larver ble først lagt i en pH-bufret løsning med overdosert MS222 (tricaine methanesulfonate) og sjøvann (500 mg L⁻¹). Etter tørking ved 60°C ble egg og larver analysert for karbon- og nitrogeninnhold.

Lipidekstraksjon, totallipid, lipidomics og fettsyresammensetning:

Levedyktige egg ble separert fra døde egg under et dissekeringsmikroskop og samlet inn. Fra BG-1-gruppen ble det brukt 50 egg i hver prøve, og totalt 12 prøver ble tatt. For de øvrige gruppene ble det brukt 100 egg i hver prøve, og totalt 6 prøver per gruppe. Eggene ble lagret på -80 °C. Lipider ble ekstrahert i henhold til Folch-metoden (Folch, et al., 1957) og totallipid ble bestemt gravimetrisk ved veiing av lipidekstrakt etter tørking. Fettsyresammensetning ble bestemt ved transmetylering av fettsyrer til fettsyre metylestere (FAMES) og GC-FID analyse. Lipidklasser ble analysert ved bruk av gasskromatografi som beskrevet av Khroomrung et al. (2013), og prøver for lipidomics ble analysert med en Agilent 1260 UPLC koblet til en 4670 triple quadrupole mass spectrometer med en electrospray ion source. Data fra LC-MS/MS analyser ble analysert ved bruk av Agilent MassHunter Quantitative Analysis software package

Forbruskning:

Bruskfarging av larver ble gjennomført på dag 10 og 15 etter befruktning. For måling av kjeveutvikling og deformiteter ble det kun brukt larver fra den siste dagen. Bruskfarging ble gjennomført ved bruk av Alcian Blue med en prosedyre tilpasset fra Gavaia et al. (2000), og etter farging ble larvene avbildet med bruk av et dissekeringsmikroskop (Leica MZ75, Germany or Leica M205 C, Germany) utstyrt med et kamera (Zeiss Axiocam ERc 5S). Hodelengde (HL) ble målt fra overleppen til den bakre delen av gjellelokket (operkulum), og kjevelengde (JL) ble målt som lengden av tannbeinet. (Fig. 4-5), med en prosedyre tilpasset berggytt etter Hansen et al (2019). På grunn av dårlig farging og stor variasjon i utviklingsstadier mellom larvegrupper ble HL og JL brukt til å bestemme hovedutviklingsstadiet for hver gruppe (Fig. 4-6)



Figur 4-5: Craniofacial endpoint målinger for berggytlarver 15-16 dager etter befruktning farget med Alcian blue: Hodelengde (HL), kjevelengde (JL) og Kjeve-til-Øye-lengde (JtE).

 <p>NOVC 15dpf</p>	 <p>NOVA 15dpf</p>	 <p>NOVB 15 dpf</p>
<p>D1: Ingen kjeveartikulasjon, lite utviklet kjeve</p>	<p>D2: Noe kjeveartikulasjon, nedre og øvre kjeve noe utviklet</p>	<p>D3: Kjeven er tydelig artikulert og nedre og øvre kjeve er tydelig farget.</p>

Figur 4-6: Karakterisering av tre forskjellige utviklingsstadier observert hos berggytlarver farget med Alcian blue 15 dager etter befruktning, basert på kjeveutvikling og bruskfarging.

Statistikk:

Tester for normalfordeling av data ble gjennomført med Shapiro-Wilk tester. Data for JL og HL var ikke normalfordelt, og forskjeller mellom grupper ble testet med Kruskal-Wallis test. Forholdet mellom JL/HL var normalfordelt, og en Welch's test ble brukt her. En "binomial distribution confidence intervals comparison" ble brukt for å teste mulige forskjeller i utvikling mellom grupper. GraphPad ver. 9.0 ble brukt til å visualisere data og for å vise variasjonen i individuelle datasett, inkludert variansanalyse (ANOVA). Dataanalyser og multivariat statistikk ble gjennomført ved å bruke mixOmics R package (Lê Cao, et al., 2009; Rohart, et al., 2017).

4.2 Resultater


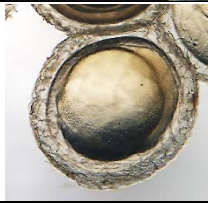
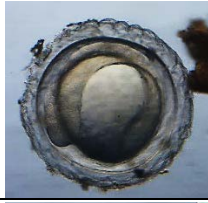




Målet med dette arbeidet var å etablere to datasett fra tidlige livsstadier hos berggylt; ett sett med tradisjonelle eggkvalitetsparametere, og ett sett med lipidomics-profiler for nylig befruktete egg. For å identifisere vitale lipidkomponenter som kan benyttes som markører for å forutsi eggkvalitet ble det brukt multivariate statistiske analyser mellom begge datasett. En serie parametere ble vurdert som kvalitetsparametere for de ulike egg-gruppene, som inkluderte respirasjonsrater for egg, karbon- og nitrogeninnhold, diameter og volum, og endringer av alle disse over tid. Store endringer i disse parameterne kan indikere rask utnyttelse av plommesekk og raskere utvikling og vekst hos larvene. I det følgende er disse kvalitetsparameterne som ble målt beskrevet nærmere.

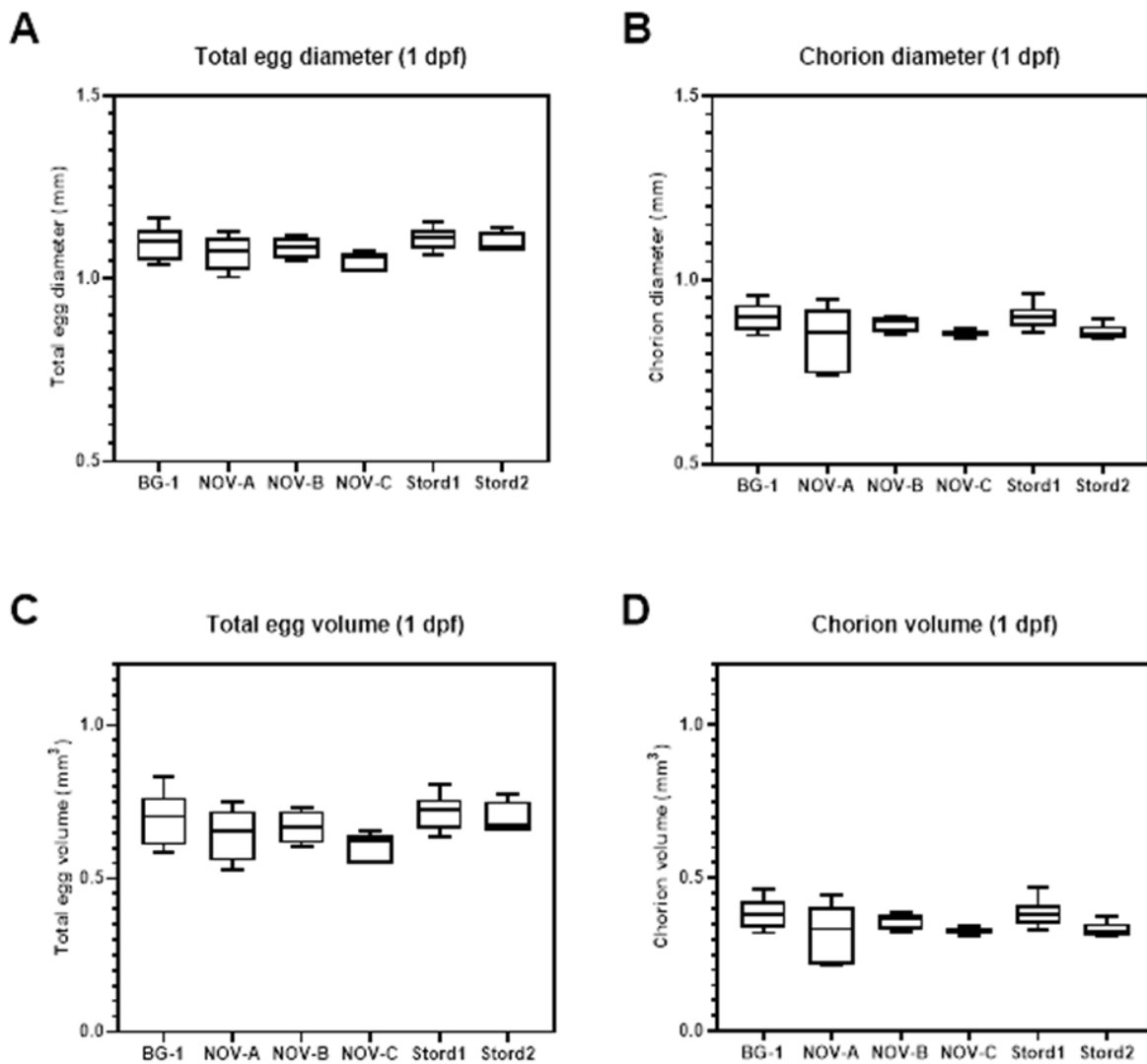
Embryo- og larveutvikling og biometri:

Det ble tatt bilder av et utvalg egg fra alle grupper med berggyltegg ved ankomst som ble brukt til å estimere overlevelse, men på grunn av de store mengdene med partikler som satt fast i limlaget, og at eggene klumpet seg sammen, var det ikke mulig å få noen gode estimater på befruktningsrater og klekkesuksess. Ved ankomst var embryoene i utviklingsstadier som tilsvarte en alder på omtrent 29 – 35 timer etter befruktning. Tabell 4-4 viser bilder fra ulike prøvedager med beskrivelser av utviklingsstadiene i henhold til D'Arcy et al (2012). Klekking inntraff 7-8 dager etter befruktning (DPF) ved 8,5 - 9 °C, som er i tråd med funn i Ottesen et al. (2012) som rapporterte at berggyltegg klekker etter omtrent 72 d°.

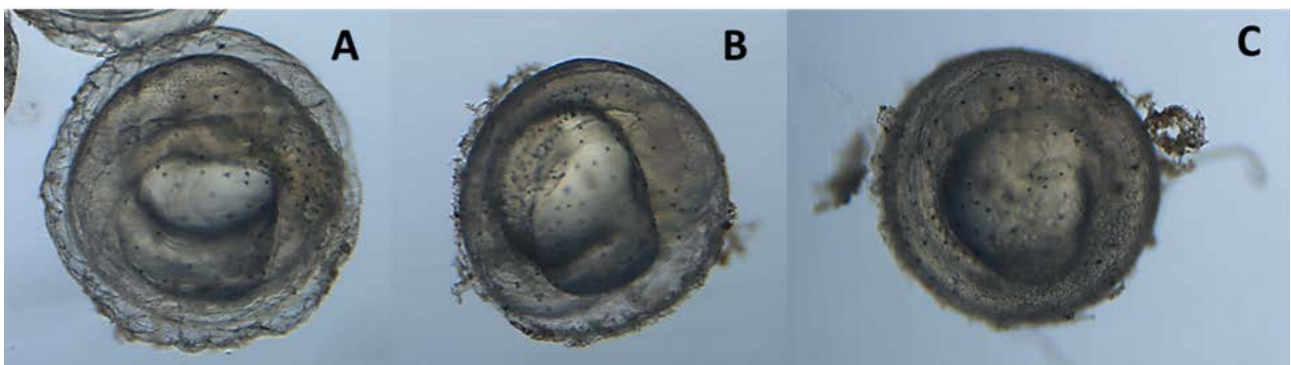
Eggdiameter og -volum ble registrert på dag 1 etter befruktning, med og uten limlaget, som vist i Figur 4-6. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom de 6 gruppene med egg som ble undersøkt, og det var heller ingen signifikante endringer i verken volum eller diameter under embryonalutviklingen. Det ble derimot observert at limlaget ble redusert over tid frem mot klekking, men bare i noen grupper (Fig. 4-7). Limlaget på berggylteggene var omtrent 0,1 mm tykt (Fig. 4-8A) og utgjorde 1/3 av eggvolumet (Fig. 4-7B). Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene for limlagets tykkelse og volum ved ankomst 1 dag etter befruktning.

Tabell 4-4: Beskrivelse av utviklingsstadier og bilder av berggylt under embryonalutviklingen ved 8,5-9 °C

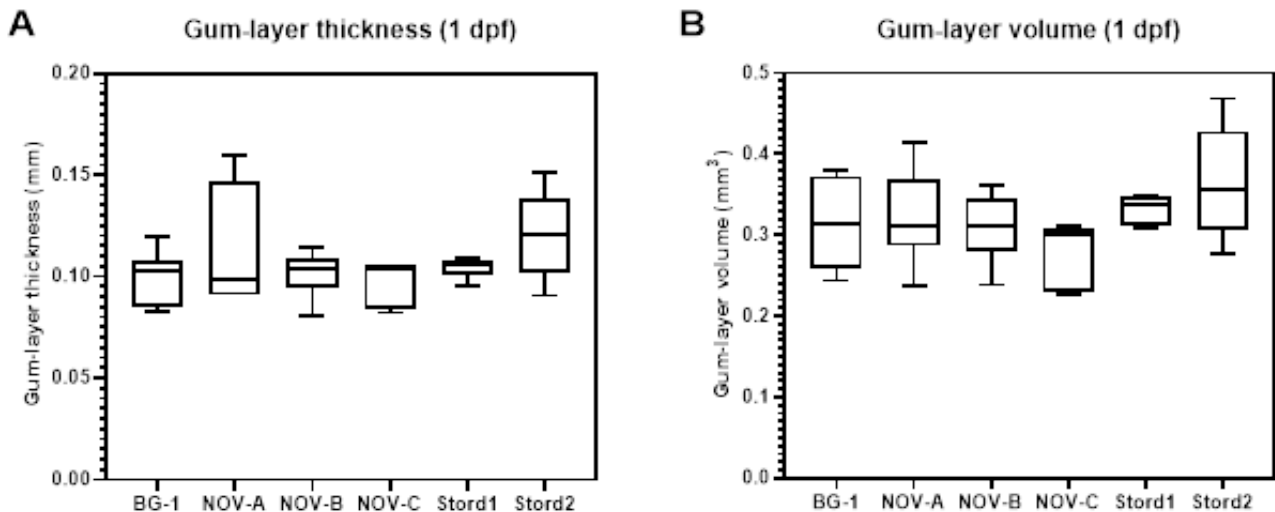
D P F	Utviklingsstadium etter D'Arcy et al 2012	Stadie	Beskrivelse	Bilde (SINTEF)
1	III	Mid-gastrula	Germ-ring is well defined, epiboly about 50% around the yolk.	
2	III	Late gastrula	Epiboly about 75% around the yolk; embryonic body were clearly visible	
3	IV	Segmentation	Two to four somites observed; eye vesicle was slightly defined.	
4	IV		Yolk oil droplets migrate closer together; melanophores appear as pigmentation began; eyes more distinct; 8 to 10 somites; KV large; otolith vesicle. The heart cavity postero-ventral to the brain appeared.	
6	V		Embryo encircles yolk approx. 1,2 times. Pigmentation clearly visible.	
7	VI		Embryo encircles yolk approx. 1.5 times. Pigmentation increases. Tail detached from yolk.	
8	VI+	Hatching	Embryo more pigmented, very active.	



Figur 4-6: Biometriske målinger av berggyltegg fra 6 ulike grupper (jf. Tab. 4-1). Målinger ble gjort på dag 1 etter befruktning. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene. Plottene angir median, 5-96% konfidensintervall og min/max-verdier (N=6).

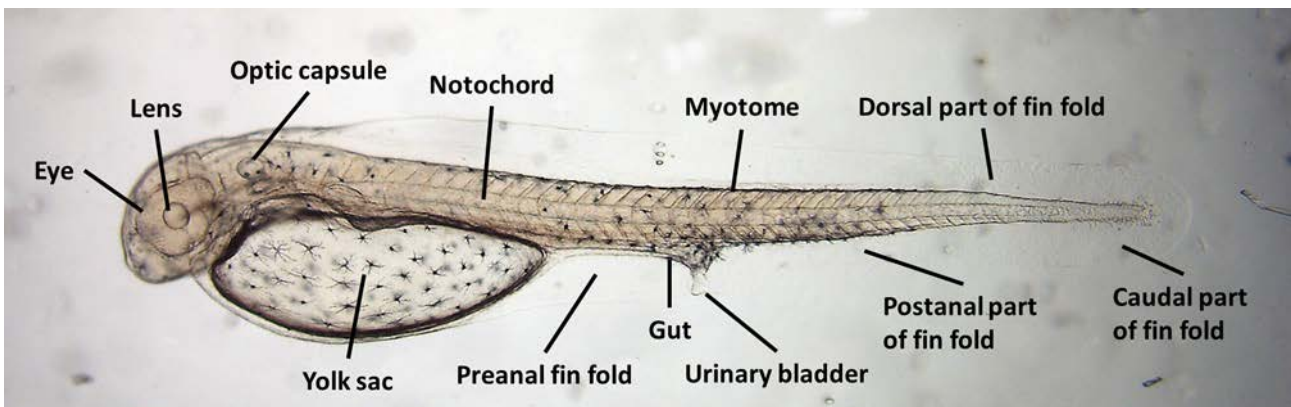


Figur 4-7: Bilder av berggyltegg fra Gruppen BG-1 tatt 7 dager etter befruktning, like før klekking. Bildene viser ett egg med (A) normalt limlag og egg som gradvis har fått et mindre limlag under inkuberingsperioden (B og C).



Figur 4-8: Limlagtykkelse (A) og -volum (B) for seks ulike grupper av berggyltegg 1 dag etter befruktning. Plottene angir median, 5-96% konfidensintervall og min/max-verdier (N=6).

Berggyltlarvene begynte å bevege seg raskt inni egget like før klekking, og frigjorde seg selv ved raske halebevegelser. En dag etter klekking (Fig. 4-9) var larvene gjennomsiktige, oppholdt seg nært vannoverflaten og hadde lite bevegelse. Kroppen var svakt pigmentert, mens øyet og linsen manglet pigmentering og var trolig ikke funksjonell (Ottesen et al., 2012). Plommesekken utgjorde mellom 25-30 % av kroppsarealet ved klekking.



Figur 4-9: Berggyltlarve 1 dag etter klekking. Beskrivelser av kroppsdelene og organer etter Ottesen et al (2012). Foto: SINTEF

Ved dag 3 etter klekking (Fig. 4-10) ble larvene mer aktive og både kroppen og øynene ble gradvis mer pigmenterte. Plommesekken ble gradvis absorbert (jf. Fig. 4-13) og kjeveåpningen ble synlig først ved dag 10 (Fig. 4-10I). På dette tidspunktet var mesteparten av plommesekken absorbert. Utviklingen gikk saktere i dette forsøket enn hva SINTEF har erfart tidligere og i henhold til beskrivelser av Ottensen et al. (2012), men dette var trolig en effekt av at temperaturen var lav. De nyklekte larvene var i gjennomsnitt 3,4 mm lange (SL). De lengste larvene ble funnet for BG-1 gruppen, men denne gruppen hadde også høyest variasjon (Fig. 4-11).

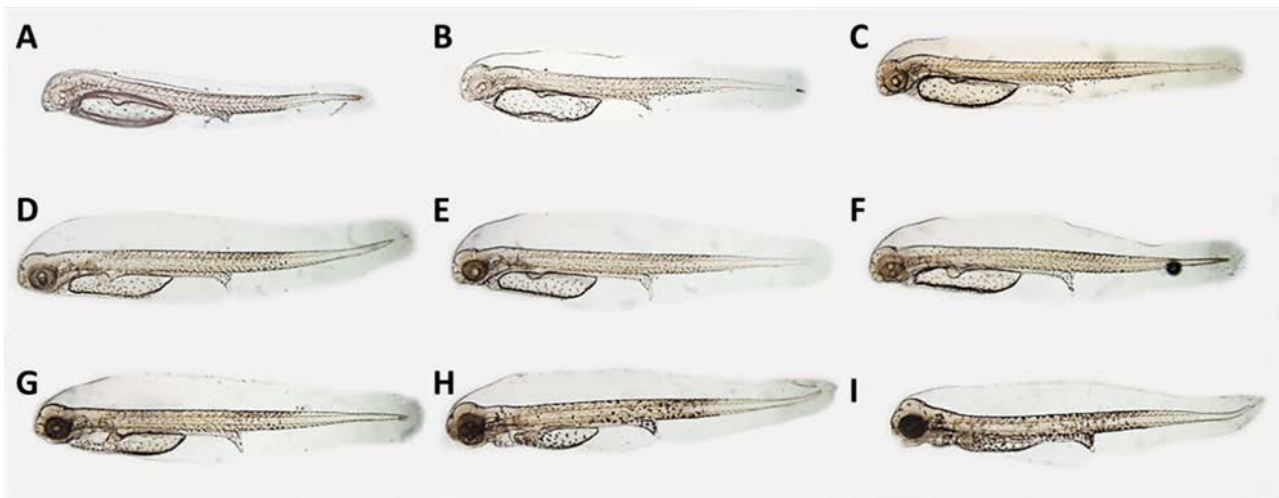


Figure 4-10: Berggylllarver fra BG-1 gruppen avbildet på dag 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H) and 10 (I) dager etter klekking.

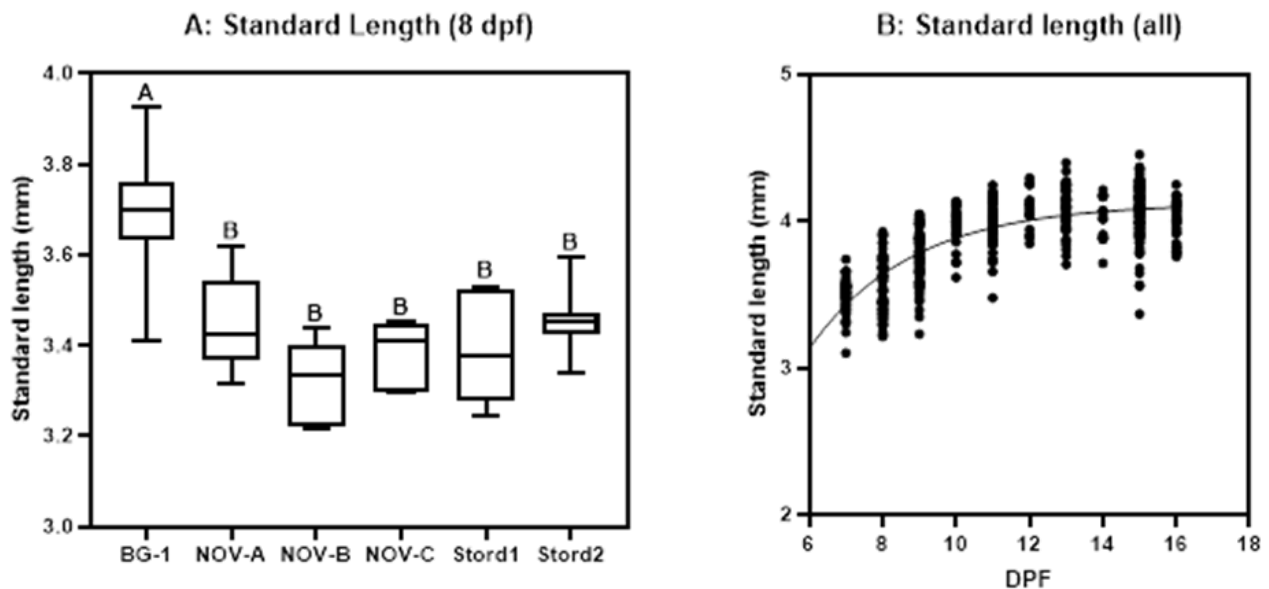
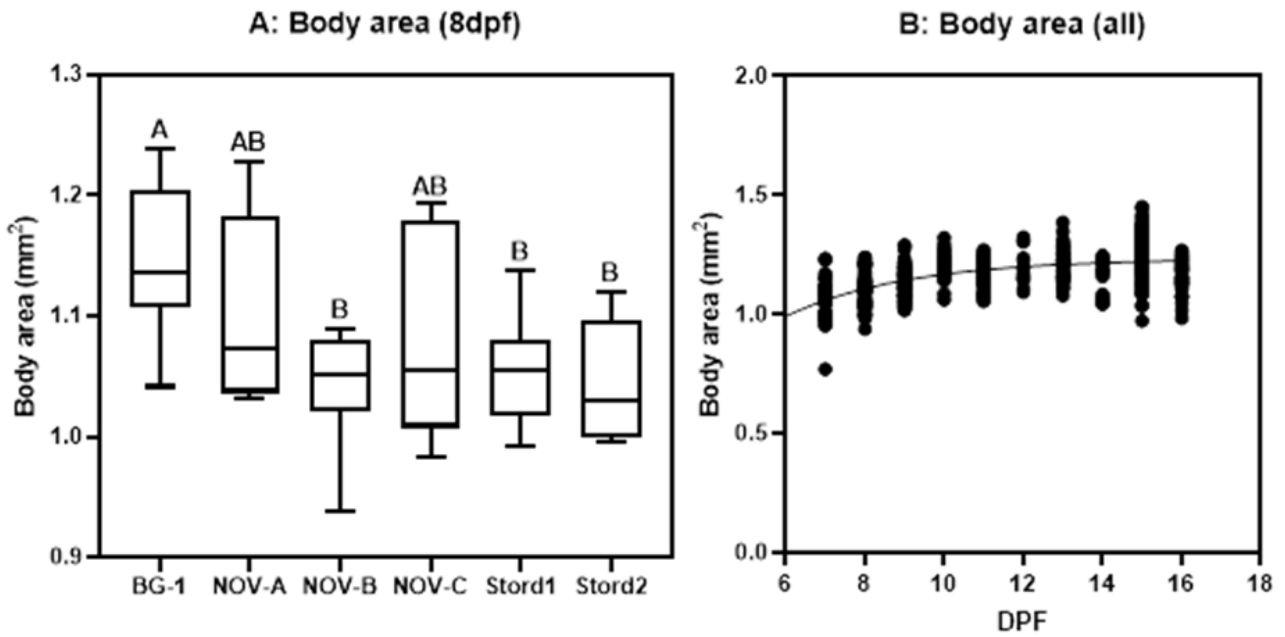
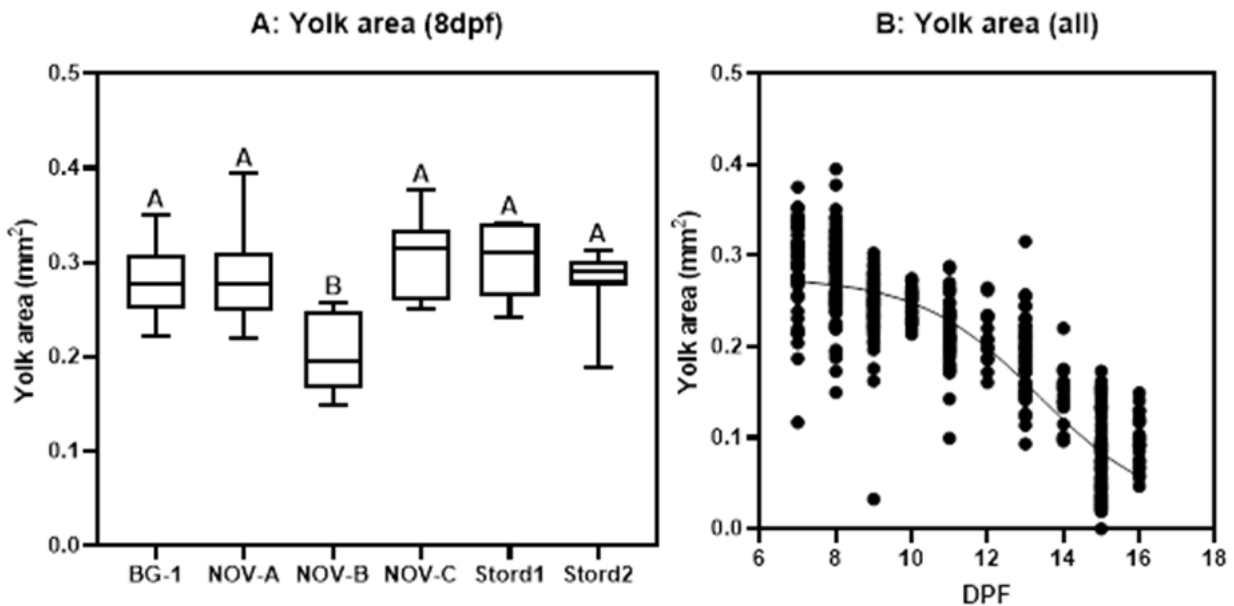


Figure 4-11: (A) Standardlengde av berggylllarver ved dag 8 etter befruktning (tilsvarer 1 dag etter klekking (dph) for NOV-A, NOV-B, NOV-C, Stord1 og Stord2, og 2 dph for BG-1). Plottet angir median, 5-96% konfidensintervall og min/max-verdier (N=24-30). Signifikante forskjeller er vist med bokstaver ($p < 0.05$). (B) Standardlengde gjennom plommesekkkfasen for alle grupper samlet. En ikke-lineær kurve er gitt (one-phase association, $R^2 = 0.62$, N=519).

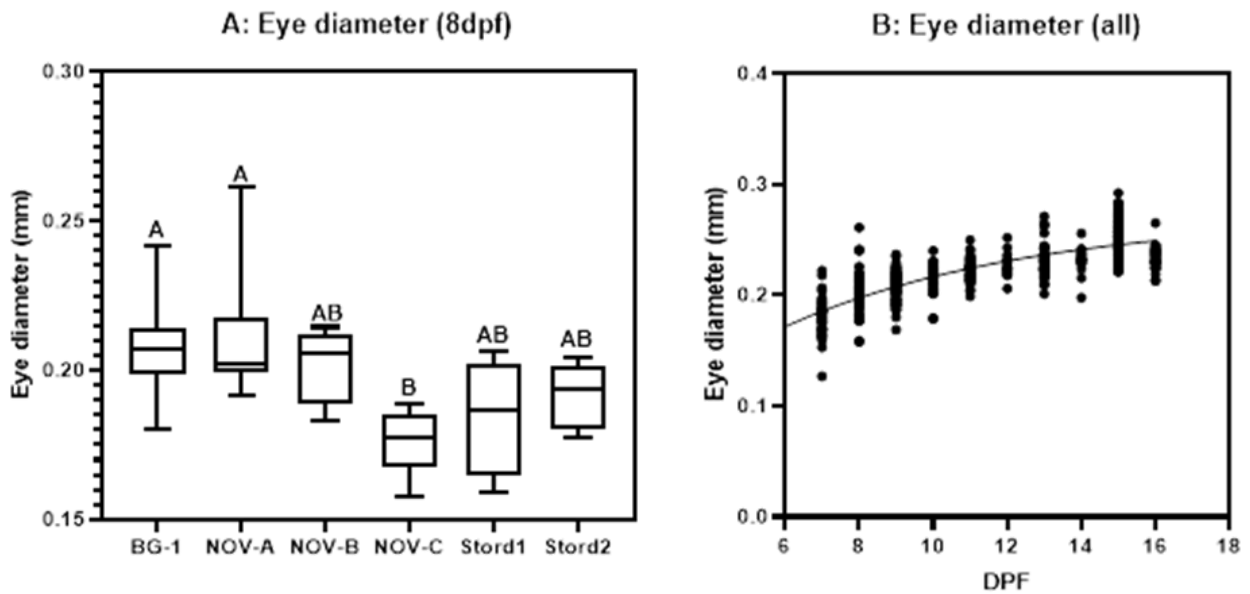
Likt som for SL, var kroppsareal også høyere i BG-1-gruppen sammenliknet med alle andre grupper, og forskjellen var også signifikant sammenliknet med NOV-B ($p < 0.01$), Stord1 ($p < 0.0001$) og Stord2 ($p < 0.0001$) (Fig. 4-12A). Kroppsarealet økte noe over de første dagene av plommesekkkfasen, men flatet senere ut (Fig. 4-12B). Sett bort i fra NOV-B-gruppen var det ingen forskjeller i plommesekkkareal mellom gruppene. NOV-B hadde signifikant mindre plommesekk enn alle øvrige grupper (Fig. 4-13A). Plommesekken var nesten fullstendig absorbert ved dag 16 etter befruktning i alle grupper. Øyarealet økte i løpet av plommesekkkfasen. Det ble observert at larver i NOV-C-gruppen hadde signifikant mindre øyne enn BG-1 ($p < 0.01$) og NOV-A ($p < 0.001$) gruppene, mens det ikke var noen forskjell sammenliknet med de øvrige gruppene.



Figur 4-12: (A) Kroppsareal for berggytlarver ved dag 8 etter befruktning (tilsvarende 1 dag etter klekking (dph) for NOV-A, NOV-B, NOV-C, Stord1 og Stord2, og 2 dph for BG-1). Plottet angir median, 5-95% konfidensintervall og min/max-verdier (N=24-30). Signifikante forskjeller er vist med bokstaver ($p < 0.05$). (B) Standardlengde gjennom plommesekkkfasen for alle grupper samlet. En ikke-lineær kurve er gitt (one-phase association, $R^2 = 0.33$, $N = 517$).



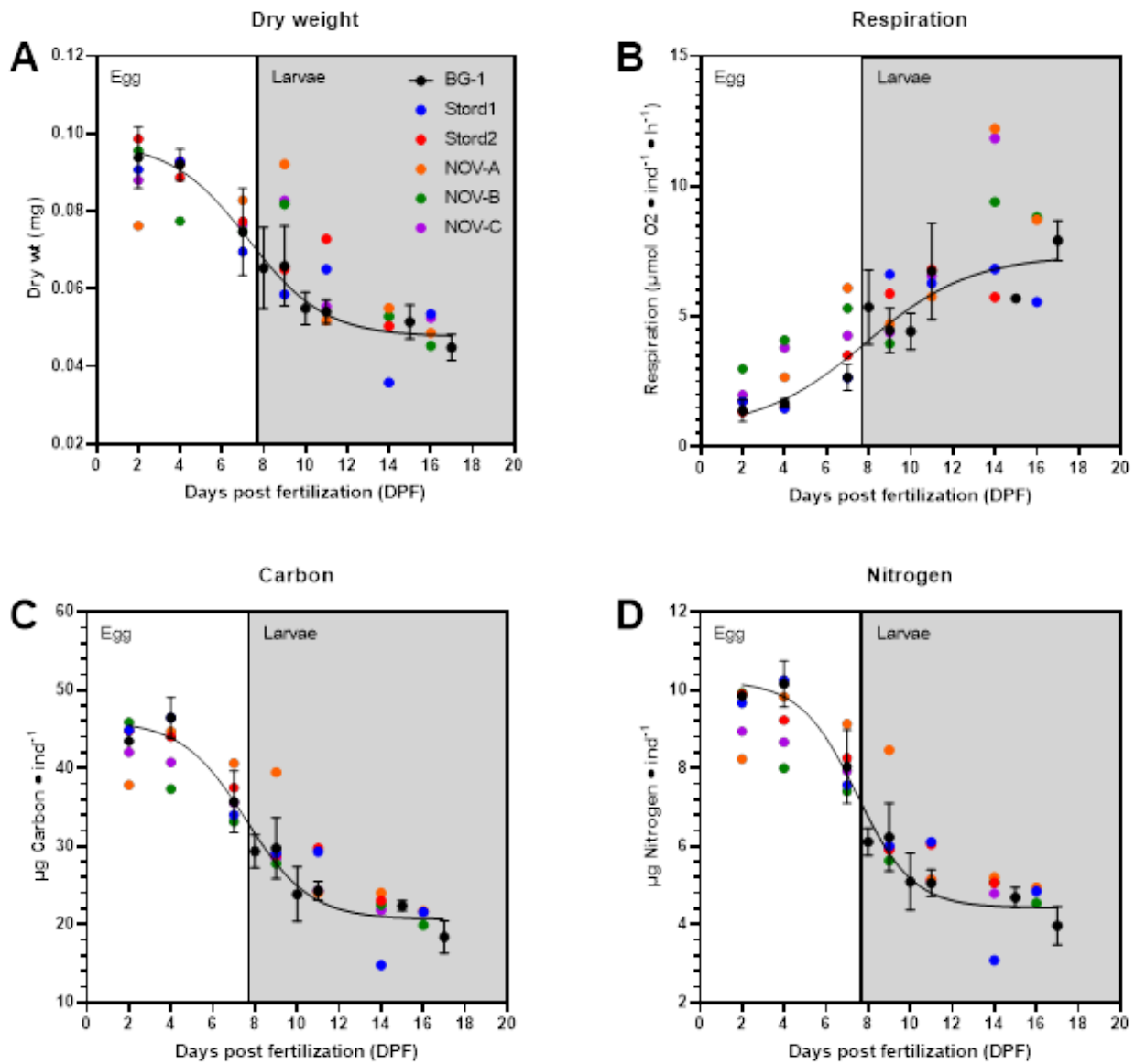
Figur 4-13: (A) Plommesekkkareal for berggytlarver ved dag 8 etter befruktning (tilsvarende 1 dag etter klekking (dph) for NOV-A, NOV-B, NOV-C, Stord1 og Stord2, og 2 dph for BG-1). Plottet angir median, 5-95% konfidensintervall og min/max-verdier (N=24-30). Signifikante forskjeller er vist med bokstaver ($p < 0.05$). (B) Plommesekkkareal gjennom plommesekkkfasen for alle grupper. En ikke-lineær kurve er gitt (variable slope, four parameters), $R^2 = 0.78$, $N = 520$).



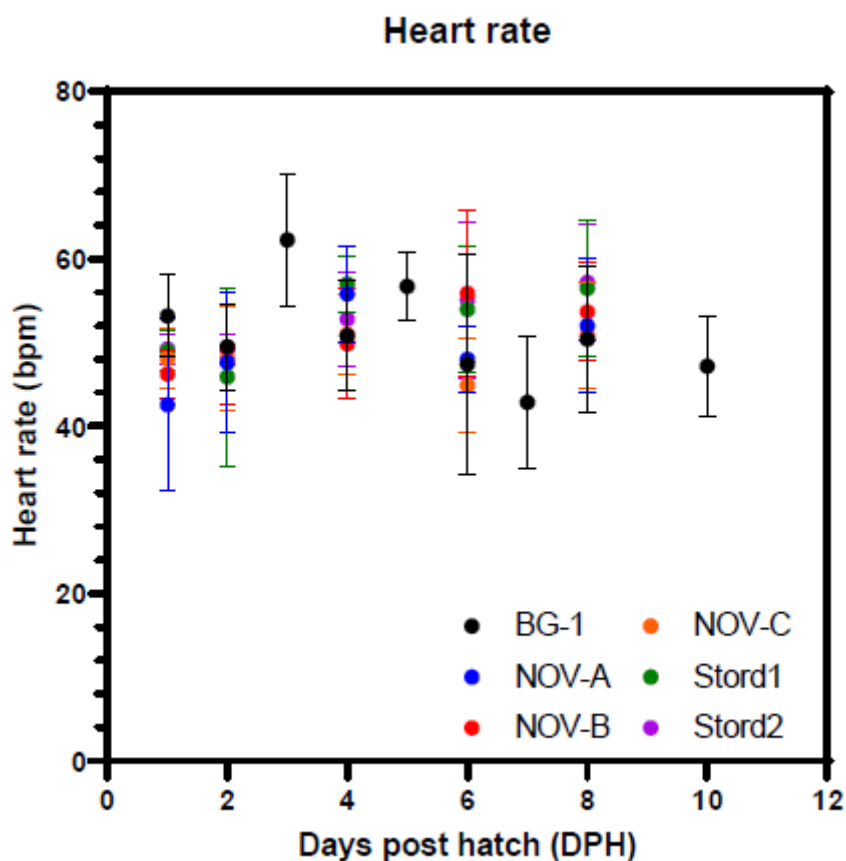
Figur 4-14: (A) Øyediometer for berggylltlarver ved dag 8 etter befruktning (tilsvarende 1 dag etter klekking (dph) for NOV-A, NOV-B, NOV-C, Stord1 og Stord2, og 2 dph for BG-1). Plottet angir median, 5-95% konfidensintervall og min/max-verdier (N=24-30). Signifikante forskjeller er vist med bokstaver ($p < 0.05$). (B) Øyediometer gjennom plommesekkfasen for alle grupper. En ikke-lineær kurve er gitt (one-phase association, $R^2 = 0.65$, N=499).

Tørrvekt, elementanalyse og oksygenforbruk:

Under embryonalutviklingen ble tørrvekten redusert med nesten 50 % (Fig. 4-15A) og respirasjonsraten økte gradvis (Fig. 4-15B). Karbon- og nitrogeninnholdet fulgte samme kurve som tørrvekten (Fig. 4-15C og D), og for alle parametere flatet kurven ut etter klekking. Det ble ikke funnet noen forskjeller i hjerterate mellom gruppene, og hjerteraten var relativt konstant over de 10 dagene etter klekking hvor dette ble registrert (Fig 4-16).



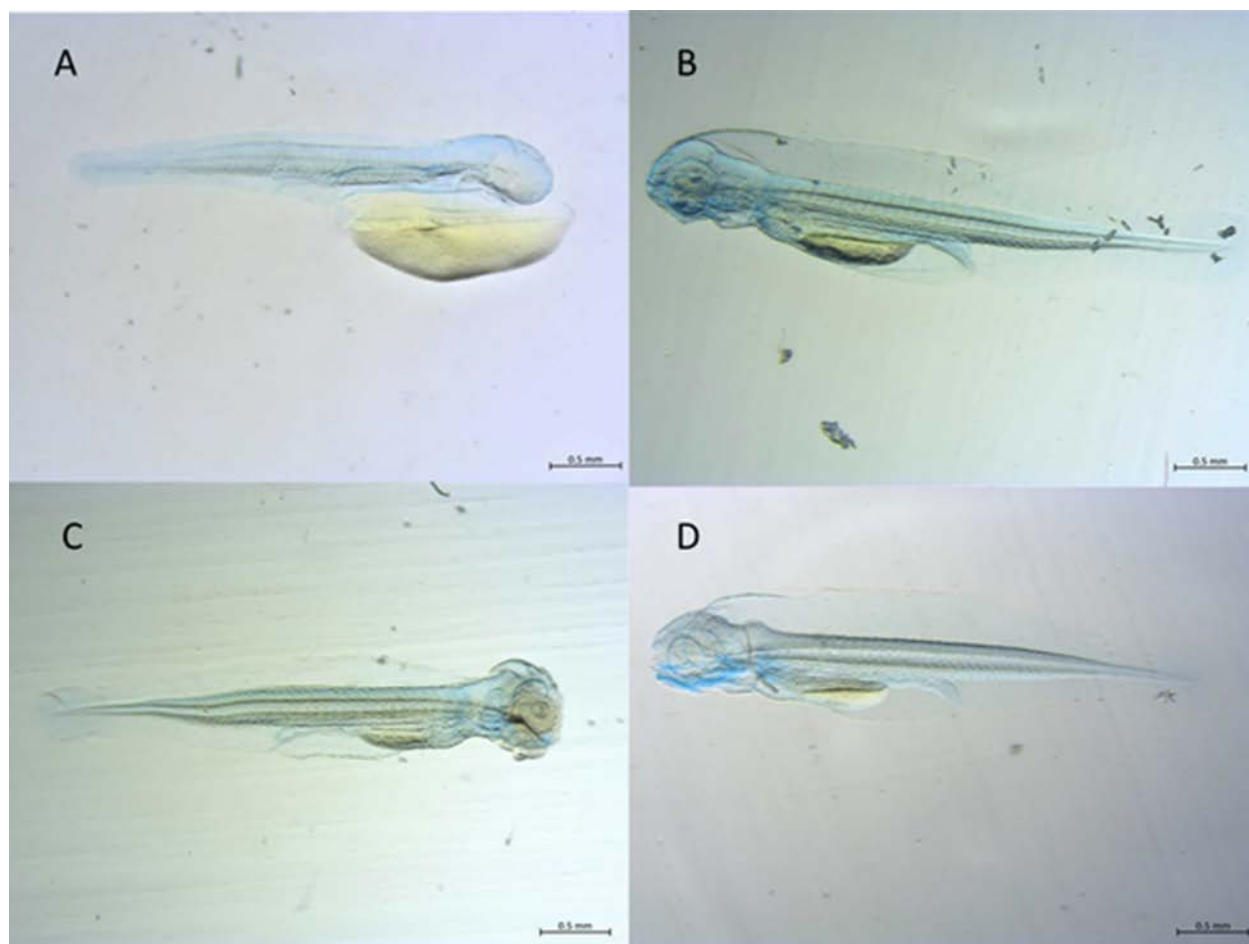
Figur 4-15: Tørrvekt (A), karboninnhold (B), nitrogeninnhold (C) og respirasjon (D) hos berggyltegg- og larver fra seks ulike egg-grupper. Data representerer individuelle målinger ved ulike dager for alle grupper. Den ikke-lineære kurven (variabel slope, four parameters) som er vist gjelder BG-1-gruppen hvor det ble gjennomført målinger i replikater (gjennomsnitt \pm standardavvik, N=3-4).



Figur 4-16: Hjerterate (gjennomsnitt \pm standardavvik) hos berggytlarver (slag per minutt; BPM) ved ulike alder for larver fra seks ulike grupper med berggyltegg. N=24-30.

Bein- og bruskfarging:

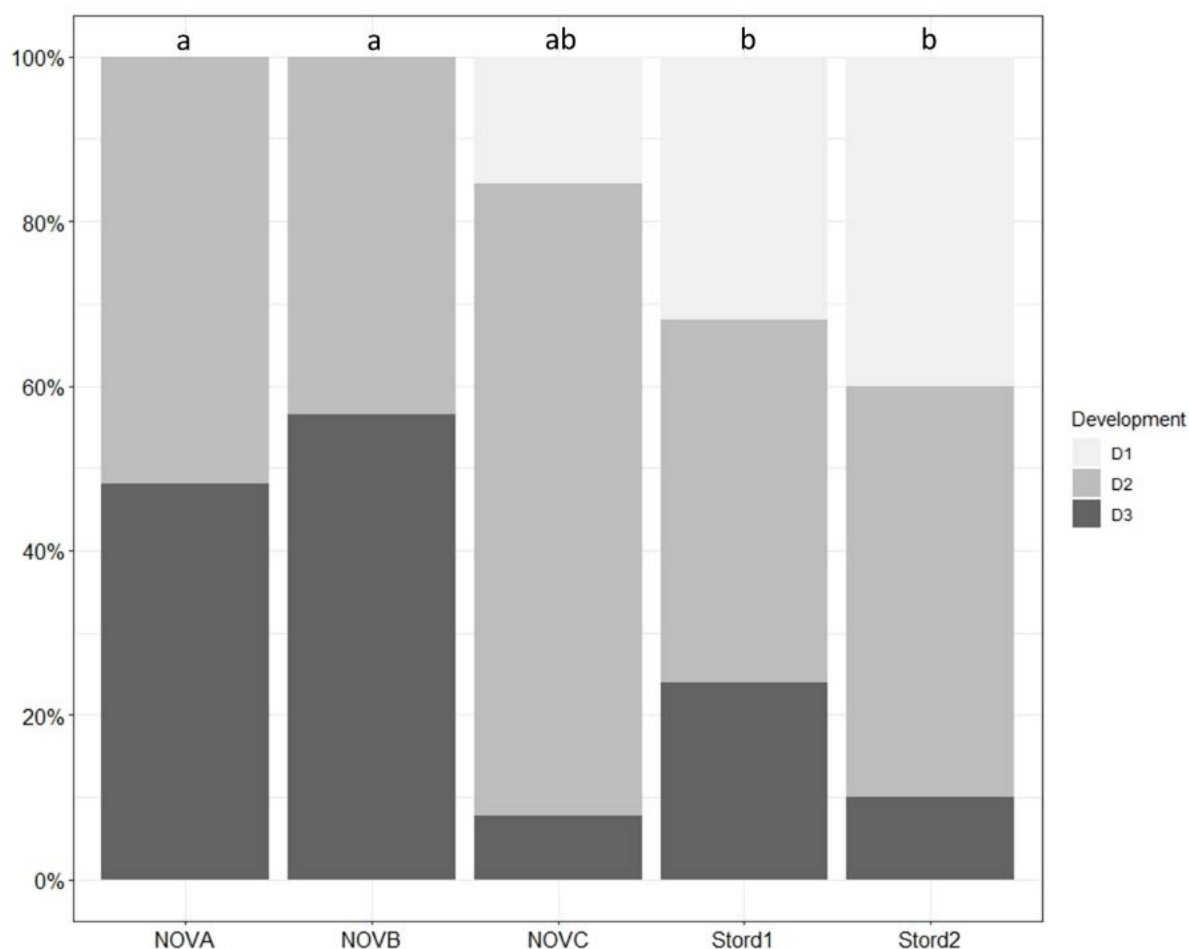
Berggytlarvene viste ingen farging av bruskk i kranium ved dag 10 etter befruktning ved fargingstester, og denne prøvetakingen ble derfor ikke brukt videre (Fig. 4-17A). Kraniebrusk var synlig i larvene på dag 15 etter befruktning som vist i eksempler gitt i Figur 4-17B, C og D. Ved dag 15 etter befruktning hadde larvene i NOV-A den lengste HL og JL, og larver i Stord2-gruppen hadde signifikant kortere hode- og kjevelengde enn larver fra NOV-A og NOV-B (HL) og NOV-C (JL) (Tab. 4-5). Forholdet mellom JL/HL var forskjellig mellom de fleste larvegruppene, og dette reflekterte trolig de ulike utviklingsstadiene som ble observert i larvene. Utviklingsscoren for larvene fra de ulike gruppene viste at NOV-A og NOV-B var signifikant mer utviklet enn larver fra Stord1 og Stord2, med NOV-C larver midt imellom (Fig. 4-18). Dessverre gjorde dårlig preservering og farging av mange larver det umulig å oppnå en gyldig score for deformiteter i disse larvene.



Figur 4-17: Craniofacial bruskfarging av berggylltlarver. (A) Larve fra Stord1 gruppen 10 dager etter befruktning, ingen synlig bruski i cranium-skeletal regionen. (B) Larve fra Stord1 gruppen 15 dager etter befruktning. (C) Larve fra Stord2 gruppen 15 dager etter befruktning. (D) Larve fra NOV-A Gruppen 15 dager etter befruktning.

Tabell 4-5: Kranie-målinger av hodelongde (HL) og kjevelengde (JL) for berggylltlarver fra 6 ulike grupper målt 15 dager etter befruktning. Ulik hevet skrift viser signifikante forskjeller mellom målte verdier.

	NOVA (n= 27)	NOVB (n=23)	NOVC (n=13)	Stord1 (n= 25)	Stord2 (n=10)
HL	0,796 ± 0,07 ^a	0,754 ± 0,05 ^b	0,792 ± 0,06 ^{ab}	0,788 ± 0,06 ^{ab}	0,676 ± 0,07 ^c
JL	0,325 ± 0,03 ^a	0,317 ± 0,02 ^{ab}	0,293 ± 0,04 ^b	0,308 ± 0,04 ^{ab}	0,247 ± 0,05 ^c
JL/HL	0,410 ± 0,44 ^a	0,421 ± 0,02 ^b	0,373 ± 0,06 ^c	0,392 ± 0,05 ^d	0,365 ± 0,06 ^c



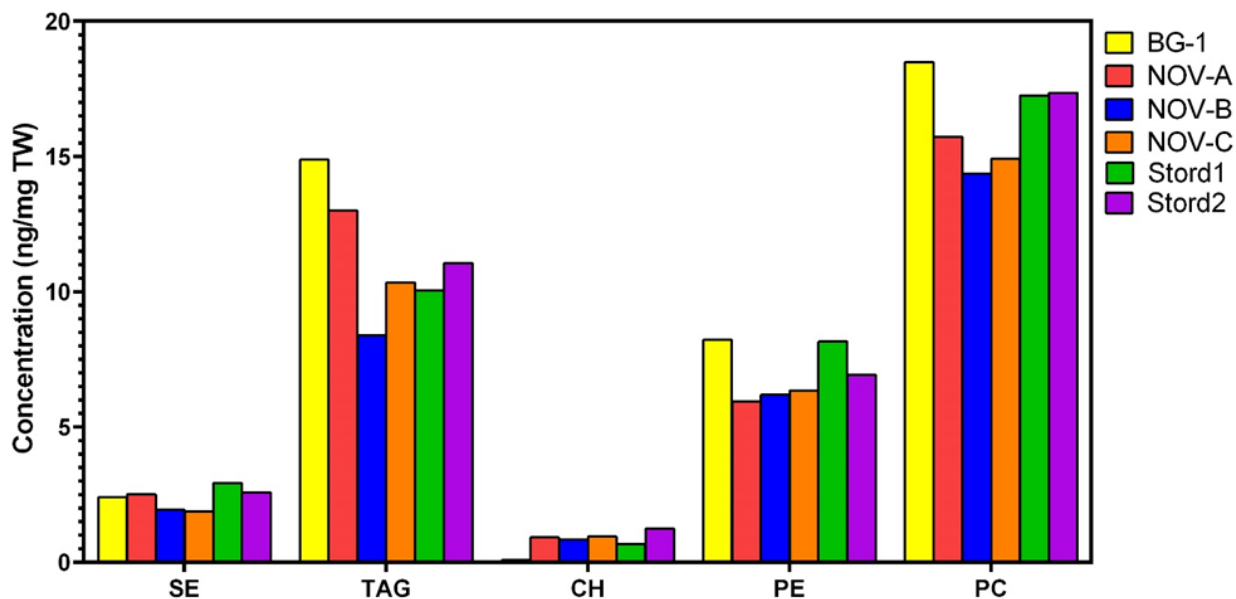
Figur 4-18.: Utviklingsscore for berggytlarver fra 6 ulike grupper med egg, 15 dager etter befruktning. NOV-A og NOV-B gruppen hadde de mest utviklede larvene blant gruppene som ble undersøkt. Hevet skrift viser signifikante forskjeller mellom de målte verdiene (testet for binomiale konfidensintervaller).

Totallipid og lipidklasser:

I gruppen BG-1 var mengden lipider under deteksjonsgrensen for instrumentet på grunn av for lite prøvemateriale (Tab. 4-6). Analyser av lipidklasser og lipidomics ble derfor normalisert til prøvevekt hvilke korrelerte godt med totalt lipidinnhold (Fig. 4-19). Stord1 og -2 gruppene inneholdt omtrent halvparten så høyt lipidinnhold som NOV-A, -B og -C, men limlaget og fibre fra gytematter kan ha bidratt til økt vekt og relativt sett lavere lipidinnhold i eggene og resultatene må anses som inkonklusive.

Tabell 4-6: Lipidinnhold (% av våtvekt) i seks ulike grupper med berggyltegg.

Gruppe ID	% Lipidinnhold
BG-1	Ikke detektert
Stord1	0,58%
Stord2	0,44%
NOV-A	0,81%
NOV-B	0,85%
NOV-C	1,00%



Figur 4-19: Innhold av lipidklasser (ng / mg tørrvekt) i seks ulike grupper med berggyltegg på dag 2 etter befruktning.

Fettsyresammensetning:

Kvantifisering av fettsyrer er gitt som en prosent av total FAME og diskriminerer ikke mellom lipidklasser (Tab. 4-7). Flerumettede fettsyrer var dominerende i alle egg-gruppene (~42 %) etterfulgt av mettede (32,6 %) og enumettede fettsyrer (20,5 %). Gjennomsnittlig innhold av n-3 var 34,6 %. Av alle fettsyrene var innholdet av palmitinsyre høyest (C16:0, 24.6%), etterfulgt av dokosaheksaensyre (DHA, C22:6n3, 20.6%), eikosapentaensyre (EPA, C20:5n3, 11.5%), og oleinsyre (C18:1n9, 11.5%).

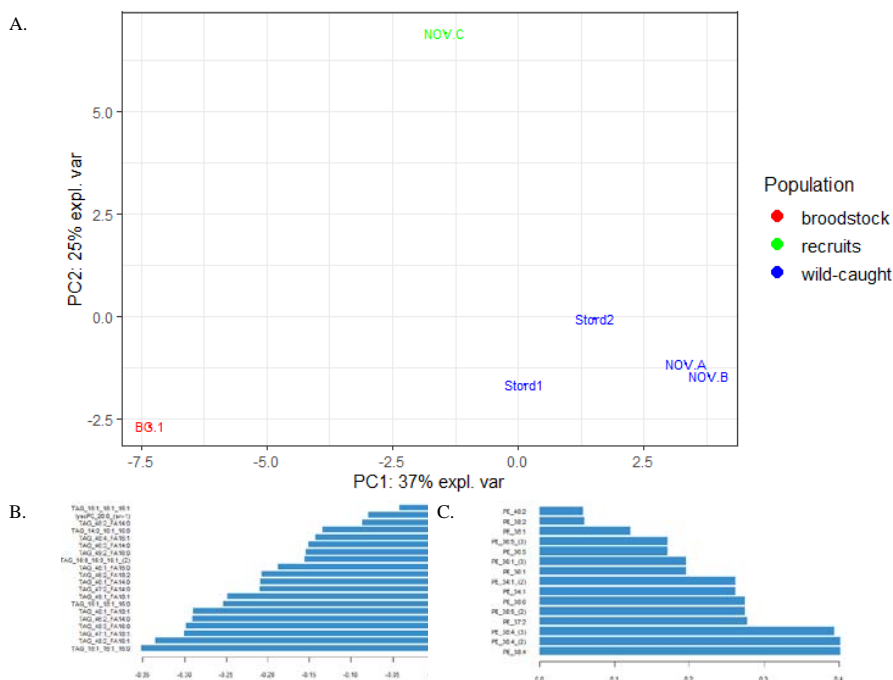
Tabell 4-7: Fettsyreprofilen til berggyltegg på dag 2 etter befruktning for seks ulike egg-grupper. Resultater er vist som prosent av totalt FAME-innhold. Sat= mettede fettsyrer, mono= enumettede fettsyrer, poly= flerumettede fettsyrer.

	BG-1	NOV-A	NOV-B	NOV-C	Stord1	Stord2
C14:0	2,07	2,08	1,99	2,14	1,62	1,64
C14:1	0,20	0,16	0,18	0,18	0,16	0,17
C15:0	0,63	0,54	0,53	0,53	0,45	0,47
C16:0	25,84	24,37	24,16	25,22	23,73	24,26
C16:1	3,75	4,27	4,30	4,18	3,77	3,63
C17:0	0,36	0,37	0,39	0,34	0,28	0,29
C17:1	0,24	0,29	0,29	0,18	0,18	0,17
C18:0	4,59	4,72	6,01	4,46	5,32	5,09
C18:1n9	11,46	11,36	10,24	10,83	12,80	12,29
C18:1n7	2,29	2,79	2,70	2,72	2,60	2,59
C18:2n6	4,29	3,74	2,76	3,32	4,41	4,63
C18:3n6	0,08	0,10	0,08	0,09	0,08	0,08
C18:3n3	0,43	0,53	0,37	0,47	0,49	0,51
C18:4n3	0,51	0,48	0,32	0,47	0,27	0,35
C20:0	0,08	0,07	0,10	0,07	0,07	0,08
C20:1	1,50	1,52	1,41	1,39	1,53	1,38
C20:2n6	0,58	0,49	0,49	0,49	0,63	0,65
C20:3n6	0,11	0,13	0,14	0,13	0,16	0,15
C20:4n6	1,58	2,34	2,31	2,45	2,35	2,32
C20:3n3	0,17	0,17	0,16	0,16	0,18	0,18
C20:4n3	0,42	0,37	0,37	0,31	0,31	0,32
C20:5n3	11,21	12,20	11,78	12,27	10,72	10,77
C22:0	0,09	0,15	0,11	0,10	0,09	0,09
C22:1n11	0,28	0,28	0,26	0,23	0,25	0,21
C22:1n9	0,09	0,09	0,07	0,07	0,07	0,06
C22:2	0,12	0,19	0,12	0,15	0,13	0,12
C22:3	0,09	0,04	0,05	0,07	0,06	0,06
C22:4	0,20	0,26	0,24	0,25	0,23	0,22
C22:5n3	0,89	1,21	1,19	1,27	1,15	1,22
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3	20,72	18,94	21,48	20,41	21,07	21,16
C24:1n9	0,26	0,29	0,29	0,23	0,25	0,24
Ukjent	4,94	5,54	5,18	4,91	4,65	4,68
Sum sat	33,65	32,28	33,27	32,84	31,55	31,90
Sum mono	20,05	21,03	19,73	19,98	21,60	20,73
Sum poly	41,37	41,16	41,84	42,27	42,21	42,70
Sum omega-3	34,33	33,89	35,66	35,34	34,17	34,49

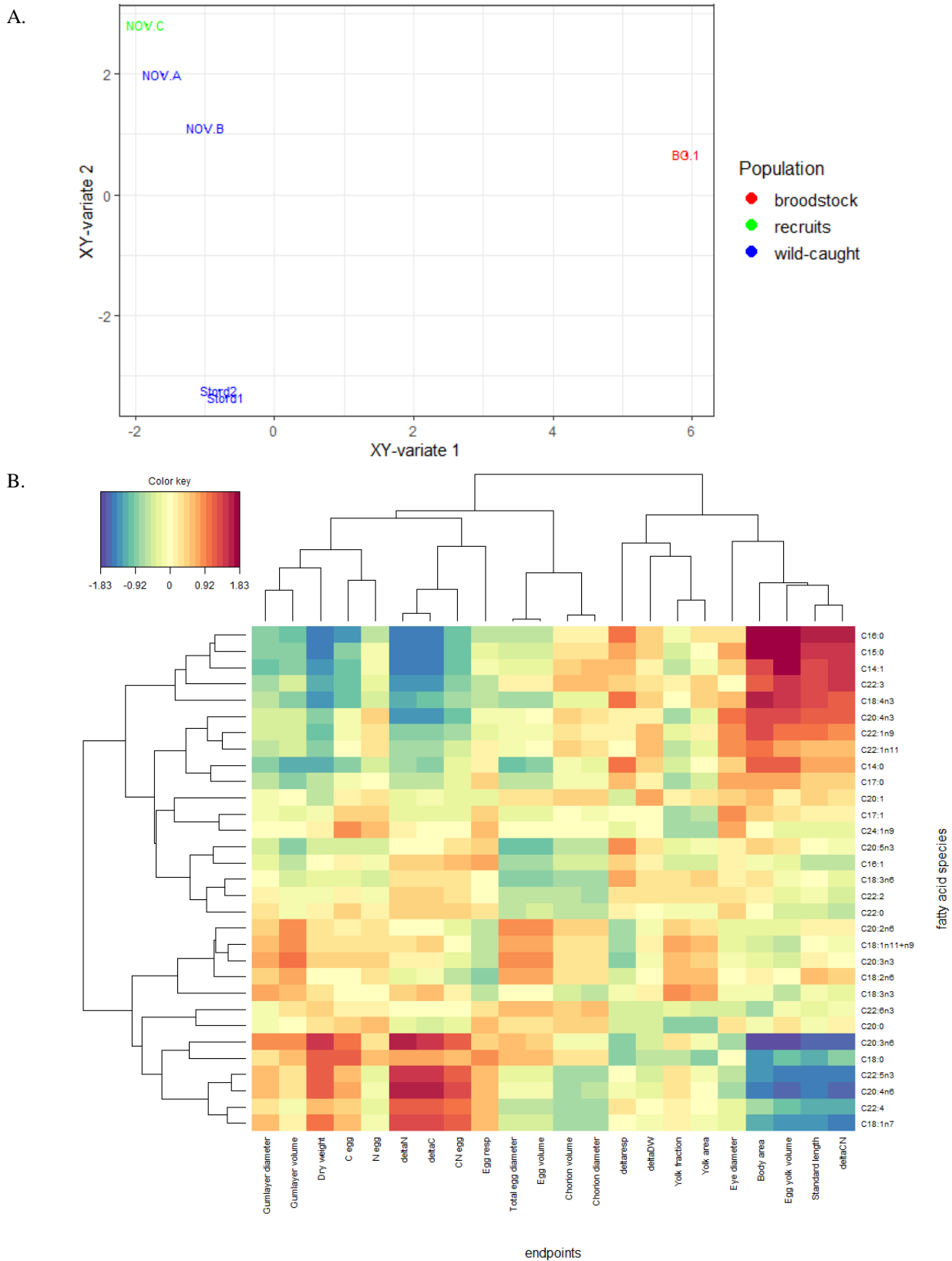
Lipidomics:

På grunn av de overveldende mengdene data som ble generert i LC-MS/MS analysen (hundrevis av signaler per prøve) vil vi ikke vise individuelle verdier her og må forholde oss til multivariat statistikk og PCA-plott (Malzahn et al., 2022). Mer informasjon kan leses i Malzahn et al. (2022) (under publisering, jf. Kap. 9)). Basert på fettsyresammensetning ble egg-gruppene adskilt i henhold til opprinnelse (Stord, BG-1 og NOV), hvor den første komponenten i PCA-plottet (PC1) forklarte 78 % av variansen mellom gruppene og var relatert til innhold av C18:1n9 and C18:2n6 (olein- og linolsyre), og DHA-innhold bidro mest for den andre komponenten (PC2). Eggenes fettsyreprofil ble deretter sammenliknet med de ulike, potensielle kvalitetsparameterne med en least partial square (PLS) regresjonsanalyse. Dette ga et annet resultat enn PCA-analysen, hvor BG-1 gruppen skilte seg fra alle de øvrige gruppene. Data ble visualisert med et clustered image map (CIM) som viser korrelasjoner mellom variabler ved å bruke en fargegradient (jf. Fig. 4-21B). CIM-analysen viste at C16:0 (palmitinsyre), C15:0, and C14:1 var sterkt positivt korrelert med Δ CN, myotomhøyde, plommesekkvolum og kroppsareal. Disse fettsyrene er forløpere til lengre fettsyrer, og for palmitinsyre er det kjent at nivået ikke er påvirket av dietten (Ackman and Eaton, 1966). Både 20:4n6 og C20:3n6 (henholdsvis arakindonsyre og dihomo-gamma-linolenic acid) viste en sterk negativ korrelasjon til de samme endepunktene. Disse flerumettede fettsyrene (PUFAs) er essensielle, og både embryo- og larveutvikling hos marin fisk er avhengig av en optimal rate av disse fettsyrene i dietten (Sargent et al., 1997).

En sparse PCA ble brukt til å identifisere nøkkelvariabler som bidro til variansen observert i datasettet. Her gjorde vi et utvalg av henholdsvis de 20 og 15 mest representerte lipidartene for PC1 og PC2. Både BG-1 og NOV-C ble skilt fra de øvrige gruppene i sPCA-plottet; BG-1 ble skilt på grunn av PC1 hvor TAG-innhold gjorde utslaget, og NOV-C ble skilt av PC2 på grunn av innhold av PEs (Fig. 4-20B og C). Til slutt sammenliknet vi lipidomics data med de samme kvalitetsparameterne som for fettsyrer. De ulike egg-gruppene skilte seg også her basert på de samme fire parameterne: myotomhøyde, Δ CN, plommesekkvolum og kroppsareal (Fig. 4-21B). Det er verdt å merke seg at disse parameterne ikke hadde den høyeste variansen innenfor og mellom grupper (dette var tørrvekt, C- og N-innhold), og faktum at disse parameterne korrelerte godt med både lipidomics- og fettsyredata argumenterer for gyldigheten av resultatene. Både TAGs og noen PC-arter var positivt korrelert med disse parameterne, mens flere PE-arter var negativt korrelert med parametere relatert til vekst, men i mindre grad.



Figur 4-20: (A) sPCA for berggyltegg basert på den totale lipidomics profilen, analysert med LC-MS/MS. Lipidartene som bidro mest til variansen observert i (B) PC1 og (C) PC2 var triacylglycerider (TAGs) og fosfatidylethanolamines (PE).



Figur 4-21: Sammenlikning av fettsyreprofil i berggyltegg fra 6 ulike grupper med ulike kvalitetsparametere. (A) PLS-plott. (B) CIM-plott av de fettsyrene som bidro mest til variasjonen i registrerte kvalitetsparametere.

4.3 Diskusjon, konklusjon og anbefalinger

De mulige eggkvalitetsmarkørene vi analyserte viste alle stor variasjon mellom gruppene. De mer konservative kvalitetsmarkørene, slik som standardlengde hos larver, og diameter og vekt av eggene, viste mindre variasjon enn de mer dynamiske parameterne slik som nedgang i tørrvekt og karboninnhold i eggene mellom dag 1 og 16 etter befruktning. Et unntak det er verdt å merke seg i form av variasjon i data er endringen i C:N-forhold mellom dag 1 og 16 etter befruktning som i gjennomsnitt var 5400 % av gjennomsnittet. Dette reflekterer de iboende egenskapene av proporsjoner, hvor små endringen kan medføre store forskjeller.

Det har blitt utviklet metoder for vurdering av lipidprofiler i berggyltegg, som også har blitt testet på ulike grupper av egg, i dette arbeidet. Ved å bruke disse profilene har vi identifisert sammenhenger mellom en rekke lipidkomponenter og eggkvalitetsmarkører på både fysiologisk og morfologisk nivå. Lipidartene TAG 46:1, 46:2, 48:1, 48:2, 49:2 og 49:3 kan foreslås som nøkkelmarkører for eggkvalitet hos berggyltegg, og på sikt kan disse markørene kanskje brukes av oppdrettsbransjen for å selektere på høykvalitetsgrupper av egg i klekkerier. En mer detaljert biologisk kontekst for disse lipidartene og deres rolle i berggyltens utvikling må bli videre undersøkt for årsakssammenhenger for å si om dette også kan si noe om kvaliteten på juvenile og voksne individer. Det at flere lipidkomponenter var positivt korrelert med størrelse og negativt korrelert med metabolsk aktivitet i noen grupper, mens det for andre grupper var stikk motsatt, fortjener å bli undersøkt videre. Gjentakende mønster kan forventes basert på Tocher & Sargents' arbeid (1984), og ved å knytte sammen lipidgrupper med funksjoner kan dette på sikt bidra til å oppnå en mekanistisk forståelse. Til vår kjennskap er dette det første studiet som bruker lipidomics som metode for å vurdere eggkvalitet i berggyltegg. Selv om vi i dette arbeidet kun har skrapet på overflaten av dette kompliserte temaet, kan resultatene brukes som grunnlag for videre identifisering av viktige lipidgrupper. I det videre arbeidet bør det undersøkes om det eksisterer gjentakende mønster innenfor enkeltarter og deretter teste om disse er spesifikke for arten eller generelle.

Det er viktig å ta med at vi i dette arbeidet ikke var i stand til å produsere gode data på befruktningsrater og klekkesuksess grunn av de store mengdene med partikler som hang fast på eggene, og det faktum at eggene klumpet seg sammen og ikke lot seg skille uten å ødelegge dem. En forutsetning for å oppnå kontroll på disse parameterne er fjerning av limlaget ("de-gumming") og/eller stryking/befruktning av egg under kontrollerte forhold. Prosedyrer for fjerning av limlaget ved bruk av enzymer har vist lovende resultater tidligere, og i STARTRENS-prosjektet har det blitt undersøkt nye metoder som kan bli verdifulle fremover for å oppnå gode data på befruktningsrater og klekkesuksess hos berggylt. Resultatene fra dette arbeidet kan leses i MSc-oppgaven til Shabbir, F. (2021).

4.4 Referanser

- Ackman, R.G., Eaton, C., 1966. Some commercial Atlantic herring oils; fatty acid composition. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 23, 991-1006.
- Alshehry, Z.H., Mundra, P.A., Barlow, C.K., Mellett, N.A., Wong, G., McConville, M.J., Simes, J., Tonkin, A.M., Sullivan, D.R., Barnes, E.H., 2016. Plasma lipidomic profiles improve on traditional risk factors for the prediction of cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 134, 1637-1650.
- D'Arcy, J., Dunaevskaya, E., Treasurer, J., Ottesen, O., Maguire, J., Zhuravleva, N., Karlsen, A., Rebours, C., FitzGerald, R., 2012. Embryonic development in ballan wrasse *Labrus bergylta*. *Journal of fish biology* 81, 1101-1110.
- Fitzgibbon, A.W., Fisher, R.B., 1996. A buyer's guide to conic fitting. University of Edinburgh, Department of Artificial Intelligence.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Fuiman, L.A., Perez, K.O., 2015. Metabolic programming mediated by an essential fatty acid alters body composition and survival skills of a marine fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20151414.
- Gavaia, P.j., Sarasquete, C., Cancela, M.L., 2000. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotechnic & histochemistry* 75, 79-84.
- Hansen, B.H., Salaberria, I., Read, K.E., Wold, P.A., Hammer, K.M., Olsen, A.J., Altin, D., Øverjordet, I.B., Nordtug, T., Bardal, T., 2019. Developmental effects in fish embryos exposed to oil dispersions—The impact of crude oil micro-droplets. *Marine environmental research* 150, 104753.

- He, K., Gkioxari, G., Dollár, P., Girshick, R., 2017. Mask r-cnn, Proceedings of the IEEE international conference on computer vision, pp. 2961-2969.
- Izquierdo, M., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25-42.
- Khoomrung, S., Chumnanpuen, P., Jansa-Ard, S., Ståhlman, M., Nookaew, I., Borén, J., Nielsen, J., 2013. Rapid quantification of yeast lipid using microwave-assisted total lipid extraction and HPLC-CAD. *Analytical chemistry* 85, 4912-4919.
- Lê Cao, K.-A., González, I., Déjean, S., 2009. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. *Bioinformatics* 25, 2855-2856.
- Ottesen, O.H., Dunaevskaya, E., D'Arcy, J., 2012. Development of *Labrus bergylta* (Ascanius 1767) larvae from hatching to metamorphosis.
- Parrish, C.C., 2013. Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography* 2013.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.-O., Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2410-2416.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Le Cao, K.-A., 2017. mixOmics: an R package for 9omics feature selection and multiple data integration. *bioRxiv*, 108597.
- Sargent, J., McEvoy, L., Bell, J., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Suzuki, S., 1985. Topological structural analysis of digitized binary images by border following. *Computer vision, graphics, and image processing* 30, 32-46.
- Tocher, D.R. and Sargent, J.R., 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids*, 19(7), pp.492-499.
- Yan, X., Xu, J., Chen, J., Chen, D., Xu, S., Luo, Q., Wang, Y., 2012. Lipidomics focusing on serum polar lipids reveals species dependent stress resistance of fish under tropical storm. *Metabolomics* 8, 299-309.
- Zhang, T., Suen, C.Y., 1984. A fast parallel algorithm for thinning digital patterns. *Communications of the ACM* 27, 236-239.

5 Utvikling av optimalisert startfôringsregime for berggylt (AP2)

Diversifisering av arter i marin akvakultur er et pågående tema (François et al. 2010, Metian et al. 2020). En av årsakene til at vi ikke utnytter flere arter enn vi gjør i dag er utfordringene med yngelproduksjonen. Mange av de lovende artene har til felles at de har altrikale larver (uten utviklet mage) og kan derfor ikke føres med formulert fôr de første dagene etter klekking, men har behov for veldig smått og næringsrikt levendefôr. Faktisk så spiser de aller fleste fiskelarvene planktonorganismer i de tidlige livsstadiene (Moser 1984).

Berggylt (*Labrus berggylta*) er en relativt ny art i akvakultursammenheng, og den er interessant for produksjon fordi den har vist et stort potensial for bruk som rensefisk i laksenæringen hvor den bidrar til å holde lusesmittenivåer nede. Berggylt er en art med høye krav til ernæring i de tidlige livsstadiene. Tidligere har det hovedsakelig blitt brukt rotatorier og *Artemia* som levendefôr til berggyltlarvene, men i dag bruker flere oppdrettere fjærerur som erstatning for *Artemia* (I. Overrein, pers. komm.). Dårlig ernæring i tidlige livsstadier hos fiskelarver har mange ugunstige effekter. Flere viktige utviklinger foregår i denne perioden slik som forbeining av skjelettet og utvikling av viktige organer (Balon, 1999). Disse prosessene er vesentlige for den videre utviklingen hos fisken, og flere ting kan gå feil. Feilernæring har blitt vist å henge sammen med feilutvikling av skjelett (Cahu et al. 2003) og defekter i muskler og organogenesen (organdannelsen), men kan også påvirke metabolske prosesser i larvene (Zambonino-Infante & Cahu 2010). Særlig de indirekte effektene av tidlig ernæring, som priming av metabolsk kapasitet, har langvarige effekter på vekst, helse og velferd (Imsland et al. 2006; Øie et al. 2017). Dette kalles *nutritional* eller *metabolic programming*.

Mange viktige utviklingsprosesser foregår i perioden hvor fiskelarvene tar til seg føde eksternt (von Herbing et al., 1996) og det er derfor klart at *nutritional programming* spiller en viktig rolle i det larvene bytter fra å ta til seg næring internt til eksternt (Hou & Fuiman 2019). En vellykket begynnelse på eksternt fødeopptak er dermed ikke bare viktig for umiddelbar vekst og overlevelse, men det legger også grunnlaget for resten av livssyklusen. Hos fiskelarver er *nutritional programming* et voksende forskningsfelt, og forskningen kan bidra til store fremskritt innen akvakultur hvis det brukes riktig. For å undersøke effekten av å bruke ulike levendefôrorganismer på ytelse hos berggyltlarver, ble det gjennomført et startfôringsforsøk som varte til 14 dager ut i perioden etter larvene var tilvent tørrfôr.

5.1 Materialer og metode

For å evaluere effekten av ulike levendefôrorganismer på vekst, overlevelse, biokjemi, histologi og mikrobiologi hos berggyltlarver ble det gjennomført et 7 uker langt forsøk som varte frem til larvene var tilvent tørrfôr. Forsøket ble gjennomført ved SINTEF og NTNU SeaLab i perioden februar – april 2020. Omtrent 736 000 berggyltlarver ble levert av MOWI Rensefisk avd. Stord den 21. februar. Larvene kom fra egg som ble klekket over to etterfølgende dager (20. og 21. februar) som var likt fordelt i plastposer (10L) fylt med oksygenert sjøvann. Eggene ble gytt av en gruppe lysstyrt stamfisk og ble inkubert ved 11 °C frem til sending. Temperaturen ved ankomst SeaLab var 11,9 °C. Etter ankomst ble larvene forsiktig akklimatisert til den nye vannkvaliteten over en periode på 2 timer ved å gradvis tilsette nytt vann i posene med larver, for deretter å overføre larvene til en tank hver for de to gruppene med ulik klekkedato. Døde larver ble røktet ut fra karene med hevert etter 20 minutter. Tankene med larver ble forsiktig omrørt for å oppnå jevn fordeling av larver før 5 prøver ble tatt fra hver tank for telling av tetthet. Overlevelsen etter sending var på 36 og 40 % for larvene som klekket på henholdsvis den 20. og 21. februar. De levende larvene ble fordelt likt fra de to gruppene i forsøktankene i en tetthet på 100 larver L⁻¹ (~19 716 larver per tank) hvor de ble holdt i mørke frem til første fôring på dag 4 etter klekking. Deretter ble det brukt kontinuerlig, dimmet lys. Tankene ble tildelt tilfeldige behandlinger ved bruk av "random number function" i MS Excel. Temperaturen i tankene ble justert til 12 °C, og vanngjennomstrømningen ble satt til 0.2 L minutt⁻¹ i begynnelsen av forsøket og deretter økt gradvis opp til 1 L minutt⁻¹ ved dag 32 etter klekking når tørrfôrtilvenningen ble påbegynt. Alle tankene ble luftet forsiktig med tilsetning av trykkluft gjennom en lufteslange. Tankene ble røktet daglig på morgenen ved bruk av en innebygd rensearm som fikk rotore i 20 minutter (flere omdreininger) før sedimenterte partikler ble tatt ut med bruk av hevert.

5.1.1 Fôringsregimer

Larvene ble fôret med fire ulike levendefôrregimer i triplikater. Den første fôrtypen var enten rotatorier (*Brachionus plicatilis*), hoppekrepssnauplier (*Acartia tonsa*) eller en "Experimental cirriped diet" som bestod av kryopreserverte nauplier av to ulike arter rur (*Balanus crenatus* og *Balanus balanus*) i omtrent likt antall. Berggylltarvene fikk den første fôrtypen i nitten dager (d3-d22 post hatch; dph). Disse ble erstattet med enten Artemia-nauplier (*Artemia salina*) eller "CryoPlanktonLarge", som er et kommersielt produkt bestående av kryopreserverte nauplier av *S. balanoides*, som erstatter for Artemia de neste nitten dagene med en overlapp på fem dager med rotatorier/rotatorieerstattere i begynnelsen (d18 – d36 ph). Fra dag trettito etter klekking ble alle tankene fôret med det samme tørrfôret (Gemma Micro 150µm og AgloNorse Extra 2) i en 1:1 miks fra dag trettito til dag trettisju etter klekking, etterfulgt av Gemma Micro 150µm, Gemma Micro 300 og AgloNorse Extra 2 i en 1:1:2 miks fra dag trettiåtte til dag førtito etter klekking. Alle fôrtyper ble tilsatt i tankene *ad libitum* (jf. Tab. 5-1 for mer detaljer).

5.1.2 Levendefôr og prosedyrer

Grøntvann:

Berggylltarvene ble holdt i grøntvann for å sikre gode lys- og mikrobielle forhold, og for å tillate levendefôrorganismene å fortsette å spise i tankene for å opprettholde deres næringsverdi. Levende mikroalger (*Rhodomonas baltica*) ble tilsatt i tankene til å nå en konsentrasjon på 30 000 celler mL⁻¹, tre ganger daglig (omtrent 1 mg C L⁻¹ dag⁻¹), og en frossen pasta av *Nannochloropsis* ("FrozenPaste"; BlueBioTech GmbH, Tyskland) ble i tillegg tilsatt tre ganger om dagen for å nå 6 mg C L⁻¹ dag⁻¹ i tankene. *R. baltica* ble dyrket i semi-statiske kulturer med Conwy som vekstmedium (Walne 1970), belyst av lysrør (150 µmol m⁻² sek⁻¹ intensitet) og tilsatt CO₂-anrikt luft (1-2 % innblanding). Til algedyrkingen ble det brukt filtrert sjøvann som ble sterilisert med natriumhypokloritt og avklorert med natriumtiosulfat før bruk.

Rotatorier og rotatorieerstattere

Rotatorier:

Rotatorier ble produsert i 250L tanker ved 20-22 °C og fôret med en 3:1 miks av fersk gjær og Rotifer Diet (Instant Algae, Reed Mariculture). Rotatoriene ble anrikt over en periode på to timer med Larviva MultiGain ("MG", Biomar) ved 24 °C hvor det ble brukt 0,15 g MG per million rotatorier. Etter anrikning ble rotatoriene vasket og enten fôret ut til fiskelarvene, eller lagret kaldt (4 °C) til senere utføring (maksimalt 16 timer). Rotatoriene ble tilsatt i larvekarene tre ganger daglig i økende tettheter fra 3 – 12 individer mL⁻¹ dag⁻¹ (Tab. 5-1).

Hoppekrepss:

Hoppekrepsegg og -nauplier av arten *A. tonsa* ble kjøpt av CFEED AS. Berggylltarvene ble fôret med nauplier i stadiet 1, 2 og 3 ("N1-N3", 110 – 150 µm lengde) fra dag 4 til dag 10 etter klekking, og deretter nauplietadie 4, 5 og 6 ("N4 – N6", 170 – 250 µm lengde) til dag 22 etter klekking. N1-3 ble produsert på SINTEF SeaLab ved klekking og oppdyrking i laboratoriet. Eggene ble klekket i koniske tanker (100 L) fylt med sjøvann ved 22 °C som ble kraftig luftet fra bunnen av for å holde eggene suspendert i vannsøylen. Etter 24 timer ble luftingen stoppet og tomme eggeskall og rusk ble tillatt å synke ned mot bunnen i 15 minutter før det ble fjernet med en hevert. Før oppdyrking ble naupliene fôret daglig med *R. baltica* (10 L, ca. 1,5 millioner celler mL⁻¹). frem til høsting ved ønsket størrelse. Kopepodenaupliene ble fôret ut til berggylltarvene tre ganger daglig i en økende dose fra 10 til 20 individer mL⁻¹ dag⁻¹ (Tab. 5-1).

Experimental cirriped diet:

Fôret "Experimental cirriped diet" ble kjøpt av Planktonic AS. Denne dietten bestod av kryopreserverte nauplier av to ulike arter rur (*Balanus balanus* og *Balanus crenatus*; N. Tokle, pers. komm.) i omtrent likt antall. Naupliene av arten (*B. crenatus*) målte omtrent 267 ± 18.8 µm i lengde og 154 ± 26 µm i bredde, hvor den andre arten (*B. balanus*) målte 339 ± 21.8 µm i lengde og 194 ± 22.9 µm i bredde. Sistnevnte art er på kommersielle klekkerier som produserer berggyllt dokumentert til å være for stor til at berggylltarvene er i stand til å spise dette som sitt første fôr (pers. komm. Nils Tokle, Planktonic AS). Med utgangspunkt i

forholdet i antall mellom *B. crenatus* og *B. balanus* (1:1) i dette fôret og deres størrelser, ble det beregnet at *B. balanus* hadde omtrent dobbelt så høyt biovolum som *B. crenatus* ($1\,675\,000\ \mu\text{m}^3$ vs. $3\,355\,000\ \mu\text{m}^3$; ihht. Hildebrandt et al. (1999)) og dermed utgjorde 2/3 av biomassen som ble fôret ut til fiskelarvene. De kryopreserverte rurnaupliene ble tint i kaldt sjøvann i flere minutter etterfulgt av omtrent 5 minutter med rensing av fôret i en sil under rennende sjøvann. Vaskede rurlarver fikk så tid til å revitaliseres i luftet sjøvann (4 °C) over en periode på 6 timer. For utfôring ble fôret lagret i kraftig luftede kanner plassert ved siden av den respektive tanken fôret skulle brukes i, og derfra ble fôret pumpet ut i tanken med bruk av en peristaltpumpe satt til konstant hastighet over en periode på omtrent 4 timer. Hver fôring ble etterfulgt av en pause på 4 timer, og prosedyren ble gjentatt tre ganger per dag for å nå en tetthet på 20 individer mL^{-1} dag⁻¹ i larvekarene.

Artemia og Artemiaerstattere

Artemia:

Artemiacyster (kjøpt fra INVE, Belgia) ble klekket og separert fra cysteskallene i henhold til INVE's protokoller og anrikt med MG med bruk av en prosedyre for standard anrikning; MG (1 gram per million nyklekte nauplier) ble tilsatt til anrikningstanken (100 L) som inneholdt nauplier i en tetthet på 500 individer mL^{-1} . En andre dose med MG (1 gram per million nauplier) ble tilsatt etter 18 timer og naupliene fikk beite på anrikningen i 6 timer frem til de ble høstet, vasket og tilsatt i larvetankene.

CryoPlanktonLarge:

Fôret "CryoPlanktonLarge" ble kjøpt av Planktonic AS. Det bestod av nyklekkede rur-larver av arten *Semibalanus balanoides*. Fôret ble tint, revitalisert og fôret ut til larvekarene med bruk av samme prosedyre som beskrevet ovenfor for "Experimental cirriped diet", og fôret ut i larvekarene i en tetthet på 6 – 12 individer mL^{-1} dag⁻¹.

5.1.3 Prøvetaking og analyser

Prøver av fisk, fôr og vann ble tatt hver dag en ny fôrtype ble introdusert. Prøvene ble alltid tatt på morgenen før det nye fôret ble tilsatt i larvekarene. Dette resulterte i til sammen åtte prøvetakingsdager som inntraff mer eller mindre ukentlig i løpet av de 48 dagene forsøket varte. De følgende prøvene, metodene og analysene ble brukt i forsøket.

Estimert dødelighet:

Omtrent 500 – 900 larver ble samlet fra hver tank i løpet av forsøksperioden (2,5 – 5 % av opprinnelig antall). Metoden beskrevet av Kotani et al. (2011) ble brukt til å korrigere estimater av dødelighet til de larvene som ble tatt ut ved prøvetaking. Denne tilnærmingen antar en konstant dødelighet over hele forsøksperioden og gir verdier til larver som er tatt ut til prøver i tillegg (Fig. 1). Ligningen er basert på en eksponentiell populasjonsnedgang, men inkluderer vilkår som tillater en teoretisk dødelighet for larver som er tatt ut (N_{Sn}). Dødelighetskoeffisienter ble deretter brukt som data for en ANOVA test for å undersøke forskjeller i dødelighet mellom behandlingene, etterfulgt av en Holm-Sidak *post hoc* test.

Ligning 1:
$$N_t = e^{-mt}(N_0 - \sum N_{Sn}e^{mdn})$$

Lengde- og vektmålinger:

Larver ($n=10$) ble tilfeldig tatt ut fra hver tank ved alle prøvetakingstidspunkt. Larvene ble eutanisert med en overdose tricaine methanesulfonate (MS222; 500 mg L⁻¹) og frosset ved -20 °C inntil videre analyser. Frysing ble gjort for alle larver, og kan ha ført til lavere TV-verdier på grunn av fryseprosessen, men dette vil uansett slå likt ut mellom målinger/behandlinger. Larver ble tint og avbildet under en kalibrert stereolupe (Olympus SZX10). Mål av standardlengde ble utført på bilder med bruk av programvarepakken Infinity Analyze (Teledyne Lumenera). Etter avbildning ble larvene rensert i destillert vann, plassert i forhåndsveide tinnkapsler og tørket på 60 °C i et varmeskap, før de til slutt ble veid med en UMX2 Ultra-microbalance (Mettler-Toledo). Lengde-til-vekt forhold ble sammenliknet med bruk av eksponenten i en potensfunksjon $y=ax^b$ kalkulert til lengde-vekt data for larver fra alle tankene. Eksponentene ble sammenliknet med bruk av one-way ANOVA etterfulgt av Holm-Sidak *post hoc* tester.

Biometri:

Standardiserte bilder av larver tatt med et makroskop (Z6APO, Leica Microsystems, Germany) tilknyttet et CMOS kamera (MC170HD, Leica Microsystems, Germany) ble brukt til biometriske analyser av kropp- og plommesekkareal. Automatiserte biometriske analyser ble automatisk detektert ved bruk av AutoMOMI (Automated Morphometrics on Microscope Images; Kvæstad et al., 2022). AutoMOMI anvender MASK-R CNN neural net architecture (He et al., 2017) og ble trent på amnuelt annoterte bilder av berggylltarver. Arealer ble kalkulert ved bruk av bildebehandlingsteknikker som Topological Structural Analysis (TSA) (Suzuki 1985), og ellipse fitting (Zhang and Suen 1984).

Beinutvikling:

Beinfarging ble brukt til å detektere forbeining på siste dag av forsøket (dag 48) i henhold til prosedyrer beskrevet i Kjørsvik et al. (2009). Bilder av beinfargingen ble tatt med et dissekeringsmikroskop (Leica M205, Leica Microsystems, Germany) utstyrt med et kamera (AxioCam ERc 5s, Zeiss Inc., Germany) hvoretter bildene ble analysert for antall helt eller delvis forbeinede ryggvirvler. Forbeining i ryggstølen hos larvene ble vurdert ved å score larvene etter et vektet gjennomsnitt av alle ryggvirvlene, som følger; fullt forbeinet ryggvirvel (score 1,0); kompakt ryggvirvel (score 0,8); delvis forbeinet (score 0,2); og gjennomsiktig (score 0,0).

Mage- og leverhistologi:

Fem larver fra hver behandling ble dehydrert og innstøpt i Technovit 7100 før de ble kuttet i semi-tynne seksjoner (2 µm) med bruk av en Leica Reichert Ultracut microtome (Leica Microsystems, Tyskland) utstyrt med en glasskniv. Prøvene ble farget med en 0,05 % Toluidine blue løsning, og enkelte prøver ble også farget med Periodic Acid Schiff (ABPAS) for å undersøke tilstedeværelse av glykogen i lever. Seksjonene

ble montert og scannet (NanoZoomer) og bildene ble undersøkt ved bruk av bildebehandlingsprogramvarene OuPath og ImageJ. I levervevet ble størrelse på nukleus, celler og grad av vakuolisering målt.

Lipidekstraksjon, totallipid, lipidomics og fettsyresammensetning:

Lipider ble ekstrahert i henhold til Folch-metoden (Folch, et al., 1957) og totallipid ble bestemt gravimetrisk ved veing av lipidekstrakt etter tørking. Fettsyresammensetning ble bestemt ved transmetylering av fettsyrer til fettsyre metylestere (FAMES) og GC-FID analyse. Lipidklasser ble analysert ved bruk av gasskromatografi som beskrevet av Khoomrung et al. (2013), og prøver for lipidomics ble analysert med en Agilent 1260 UPLC koblet til en 4670 triple quadrupole mass spectrometer med en electrospray ion source. Data fra LC-MS/MS analyser ble analysert ved bruk av Agilent MassHunter Quantitative Analysis software package.

Mikrobiologi og bioinformatikk:

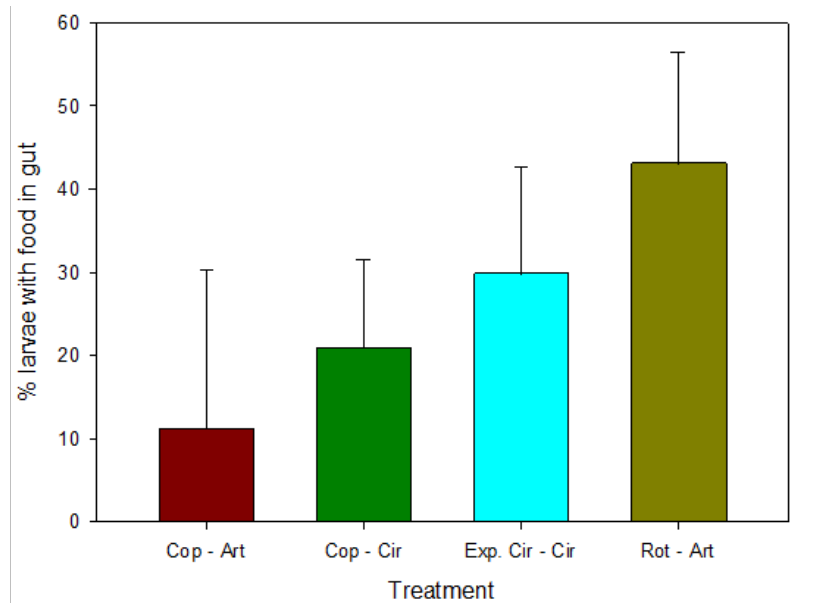
Prøver til mikrobiologi ble tatt ved å forhåndsfiltrere 1 L med vann fra larvetanken gjennom en 64 µm silduk og deretter filtrere vannet på nytt gjennom et 0,2 µm filter (MF Millipore membrane filter). Larver ble samlet fra tankene og avlivet med en overdose MS222 (500 mg L⁻¹). Egnede mengder av de ulike levendeførene ble vasket i en 64 µm silduk med filtrert sjøvann. Prøvene ble lagret på -20 °C frem til ekstrahering. DNA fra larver, vann og fôrorganismer ble ekstrahert fra filter med bruk av et ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA kit. DNAet ble så vasket ut i DNase/RNase-fritt vann og konsentrasjoner og kvalitet ble analysert ved bruk av NanoDrop og Qubit. Illumina MiSeq sekvensering ble gjennomført hos BGI (Beijing Genome Institute). For bioinformatikk ble rå avlesninger behandlet med bruk av QIIME2 pipeline (v. 2021.2). Statistiske analyser av data nedstrøms og grafisk fremstilling ble gjennomført i R med bruk av ulike bioinformatikkpakker (phyloseq, microbiomeSeq).

Genuttrykk og genuttrykk-bioinformatikk:

Larver (n=5-10) ble tatt ut fra hvert enkelt kar og brukt til analyser av genuttrykk. Larvene ble avlivet og vasket i MSDSS og deretter lagret i kryorør med DNA/RNA shield og mekaniske perler for RNA-ekstraksjon. Prøver ble umiddelbart frosset på -80 °C. RNA-ekstraksjon ble gjennomført med et kommersielt RNA-kit og prøvene ble sendt på tørris til BGI for sekvensering. For berggylt lyktes det kun å oppnå ett komplett sett av prøver for analyser av genuttrykk på grunn av enten for lav mengde, eller for dårlig kvalitet, av DNA/RNA for alle de øvrige prøveuttakene. Sekvensering ble utført på DNBSeq-plattformen med bruk av standardiserte protokoller hos BGI. Rådata/sekvensering ble behandlet i flere steg (se Malzahn et al., *under publisering* for mer informasjon, jf. Kap. 9) før til slutt, komplette referanser ble kartlagt med bruk av Bowtie2 og RSEM.

5.2 Resultater

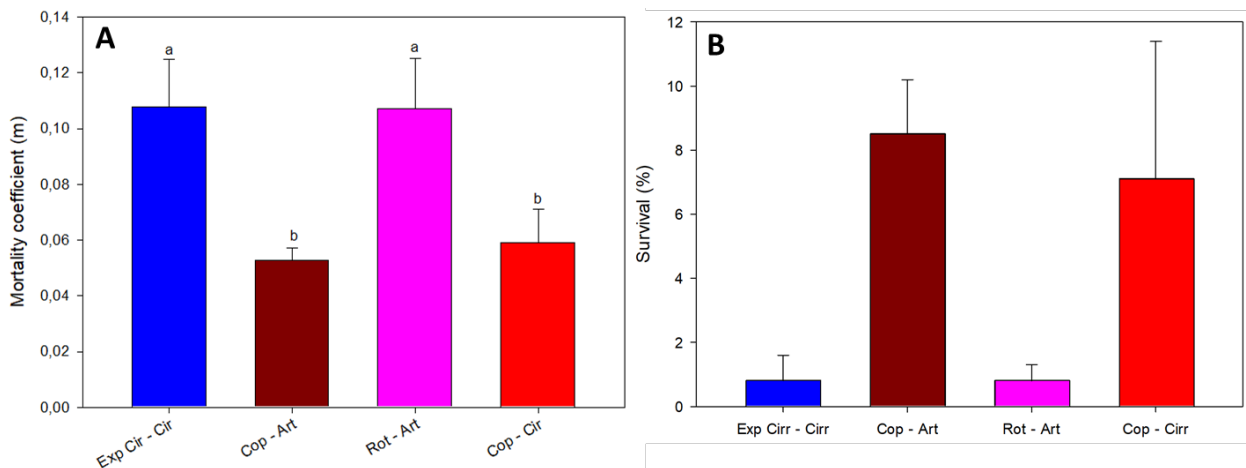
Berggyltlarvene ble føret første gang på dag 4 etter klekking. For å være sikker på at larvene aksepterte de ulike fôrtypene som ble brukt, ble det tatt prøver på dag 8 etter klekking for å undersøke fôringsinsidens. Det ble observert larver med fôr i tarmen i alle behandlingene (Fig. 5-1). Larvene som spiste rotatorier, etterfulgt av de som spiste "Experimental cirriped diet", hadde høyest forekomst av larver med synlig fôr i tarmen. Det var noe variasjon mellom replikatene og derfor ingen signifikante forskjeller i fôringsinsidens mellom behandlingene når disse ble sammenliknet med one-way ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks; p=0.147). Det gjøres oppmerksom på at larvene ikke ble scoret i henhold til grad av magefylling, men etter om det var eller ikke var synlige fôrorganismer i tarmen. For behandlingene som fikk hoppekreps i starten er det mulig at fôringsinsidensen ble underestimert på grunn av at hoppekreps fordøyes raskt i tarmen hos berggyltlarvene og derfor kan være vanskelig å se selv om larvene har spist godt.



Figur 5-1: Fôringsinsidens (% larver med fôr i tarmen) hos berggylltarver gitt 4 ulike fôrtyper på dag 8 etter klekking. Beregningene er basert på 12 ± 3 (SD) larver fra hver tank, vist som gjennomsnitt per behandling \pm SD.

5.2.1 Dødelighet

De to behandlingene som fikk hoppekreps som sitt første fôr hadde signifikant lavere dødelighetsrater enn larvene som fikk rotatorier (Rot -Art) og Experimental cirriped diet ("Exp Cir – Cir"). Det var ingen forskjeller i dødelighetsrater mellom de to gruppene som fikk hoppekreps, og heller ikke mellom de to som fikk rotatorier og Experimental cirriped diet (Fig. 5-2). Dødeligheten nådde en topp i alle karene rundt dag 14 etter klekking, med høyere dødelighet i gruppene "Rot – Art" og "Exp Cir – Cir" sammenliknet med de som fikk hoppekreps.

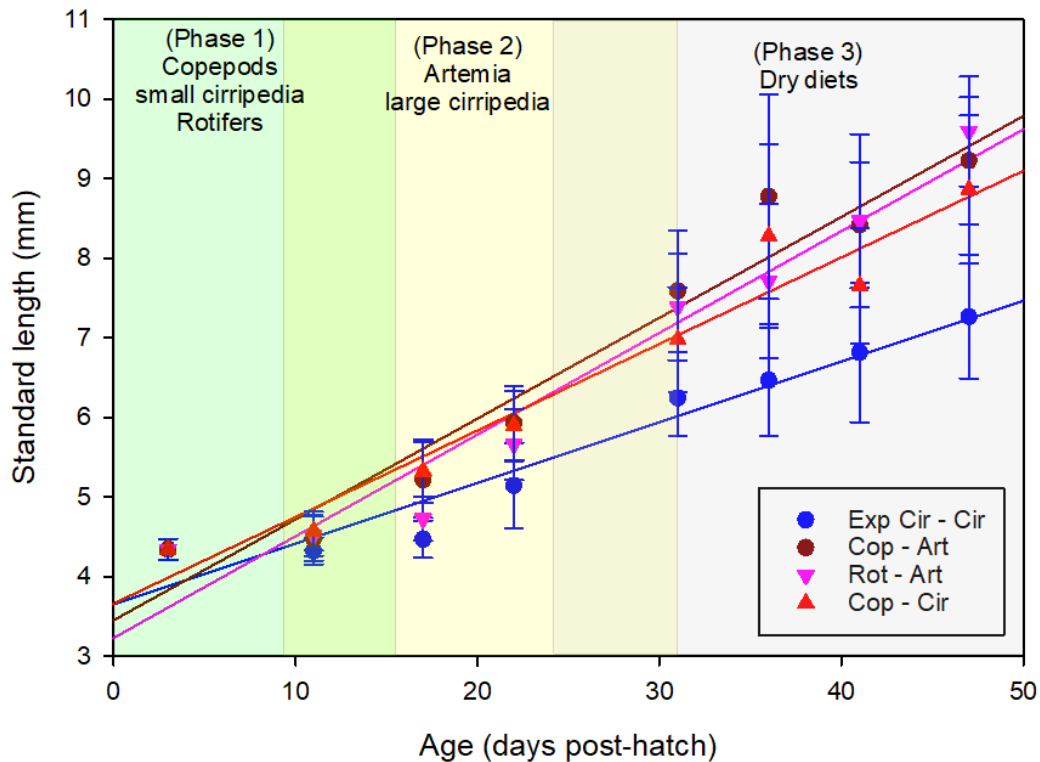


Figur 5-2: (A) Gjennomsnittlig dødelighetskoeffisient m for berggylltarver i løpet av det 48 dager lange startfôringsforsøket, og (B) samlet overlevelse for hele forsøksperioden, for berggylltarver fôret 4 ulike fôringsregimer. Feillinjer er standardavvik for triplikate tanker. a og b viser signifikante forskjeller (ANOVA, etterfulgt av Holm-Sidak test, $p < 0.05$) mellom behandlingene.

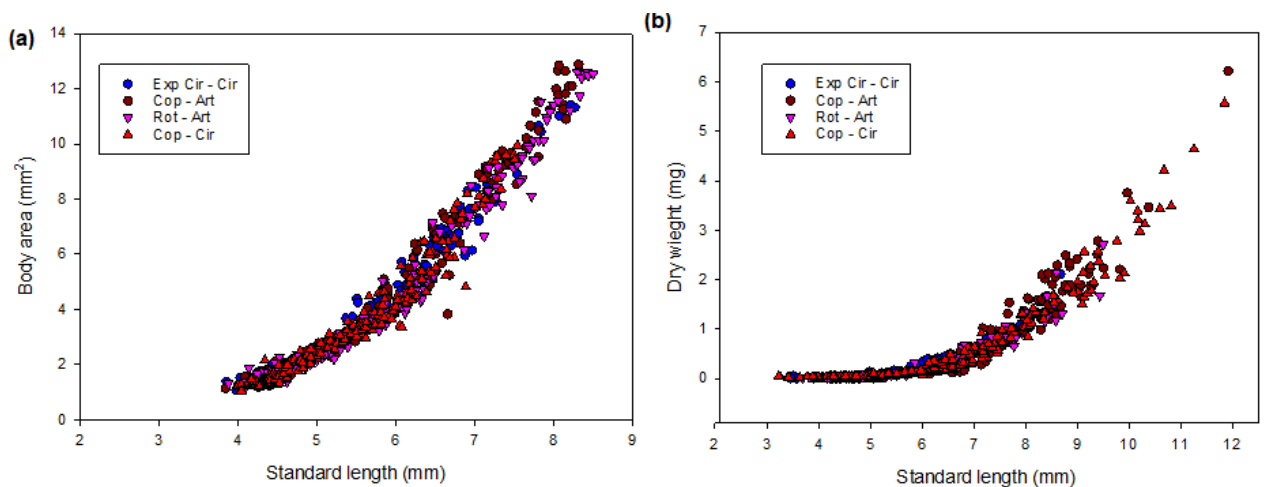
5.2.2 Vekst

Larvene fra de tre av behandlingene nådde den samme størrelsen ved slutten av forsøket, hvorav larvene i "Exp Cir – Cir" behandlingen var både færre i antall og signifikant mindre enn resten ved slutten av forsøket;

disse larvene målte 7 mm i standardlengde (SL) sammenliknet med omtrent 9 mm SL for de øvrige behandlingene (Fig. 5-3). Berggytlarvene endret vekstmønster drastisk under forsøket. Frem til de var omtrent 5,5 mm SL økte kroppslengden, hvorefter myotomhøyden i larvene økte. Økningen i kroppsareal i henhold til størrelse så ut til å være lik mellom behandlingene hvilket indikerer at føret ikke påvirket dette vekstmønsteret. En tilnærming til å undersøke ulikheter i vekstmønster er å etablere lengde-vekt forhold, hvor eksponenten i potensfunksjonen gir innblikk i vektøkning per lengdeøkning (Fig. 5-4a). Lengde-vekt data i dette forsøket ga eksponenter på henholdsvis 7,2, 6,8, 6,1 og 4,8 for Exp Cir – Cir, Cop – Art, Rot – Art, og Cop – Cir behandlingene (Fig. 5-4b). Eksponenten i Exp Cir – Cir behandlingen var signifikant høyere enn de øvrige behandlingene, bortsett fra Cop – Art behandlingen som var lik (one way ANOVA, Holm-Sidak *post hoc* test, $p=0.05$). Dette betyr at selv om vekstmønsteret og økningen i kroppsareal ikke ble påvirket av føret, endret larvene i Exp Cir – Cir behandlingen vekt uproporsjonalt.



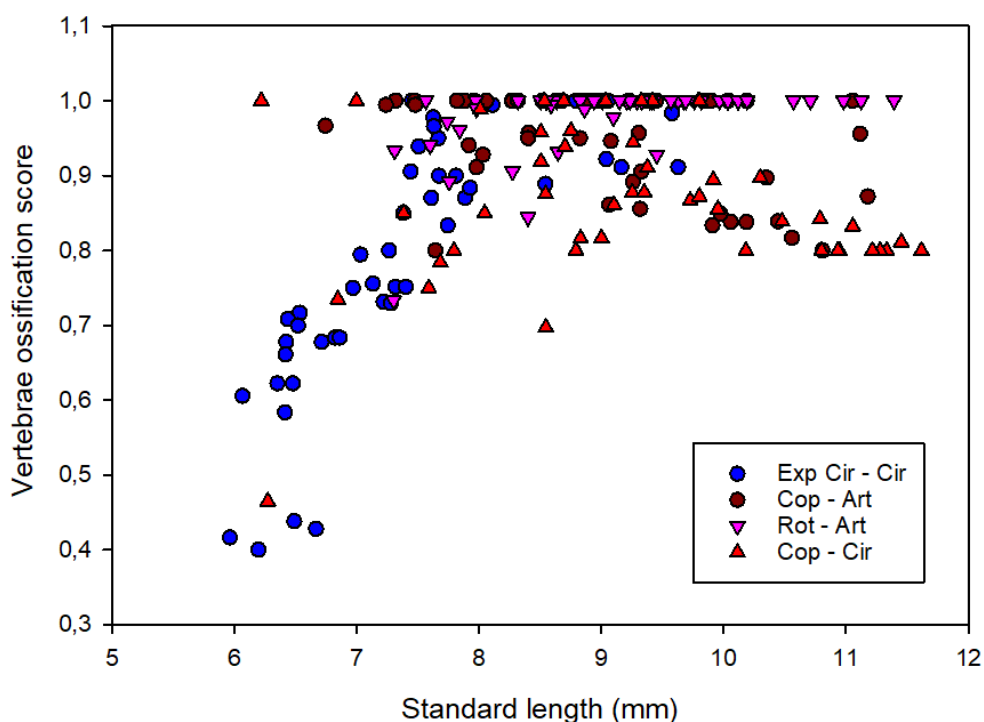
Figur 5-3: Utvikling av standardlengde (SL) over tid for berggytlarver føret fire forskjellige fôringsregimer. Hvert punkt representerer gjennomsnitt \pm SD for triplikater. Hele linjer viser lineære regresjonslinjer.



Figur 5-4: (a) Forhold mellom standardlengde (SL) og kroppsareal, og (b) Lengde – vekt forhold, hos berggytlarver gitt fire ulike fôringsregimer.

5.2.3 Forbeining

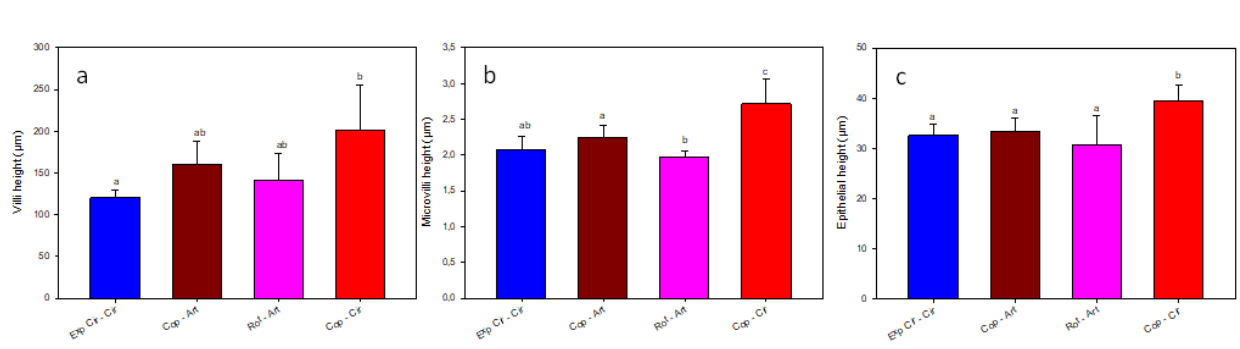
Behandlingen Exp Cir – Cir hadde de minste larvene ved slutten av forsøket, og dette var også reflektert i grad av forbeining i ryggstøylen (Fig. 5-5). Hvor gruppene som ble føret på hoppekreps eller rotatorier i begynnelsen hadde veldig få av de mindre larvene med kun delvis forbeinede ryggvirvler, hadde Exp Cir - Cir gruppen langt flere larver i størrelsene 6 – 8 mm som er den lengden hvor forbeiningen hovedsakelig foregår. Begge gruppene som ble føret med hoppekreps i starten viste en tendens til å ha lavere forbeining av ryggstøylen sammenliknet med larver av lik størrelse fra de andre behandlingene. I disse gruppene var en betydelig andel av ryggvirvlene kompakte med fortsatt ikke fullstendig forbeinet ved en lengde på mellom 10 og 12 mm. I dette størrelsesområdet hadde alle larvene som ble føret på rotatorier i begynnelsen fullstendig forbeining av ryggstøylen.



Figur 5-5: Forbeinings-score vs. standardlengde hos berggylltarver føret på fire ulike føeringsregimer ved dag 48 etter klekking. Scoren er et vektet gjennomsnitt av status for forbeining av ryggstøylen gitt følgende verdier: Fullstendig forbeining (score 1.0); kompakt (score 0.8); delvis forbeinet (score 0.2); og gjennomsiktig (score 0.0).

5.2.4 Histologi

Tarmhistologien viste en signifikant forskjell mellom behandlingene på dag 48 etter klekking (Figur 5-6). Larvene fra Cop – Cir behandlingene hadde signifikant lengre villi (Fig. 5-6a) enn Exp – Cir behandlingene, samt signifikant høyere mikrovilli (Fig. 5-6b) og større tarmepitelhøyde (Fig. 5-6c) (Kruskal-Wallis test $p < 0,05$) enn de tre andre behandlingene. De tre andre behandlingene hadde lavere histologiske indekser og var ikke forskjellige med hensyn til epitelhøyde. Cop – Cir behandlingene viste signifikant lengst mikrovillihøyde, etterfulgt av Cop – Art og Rot – Art behandlingene, hvor Exp Cir – Cir behandlingene falt imellom de to sistnevnte og var ikke forskjellige fra noen av de andre (Wilcoxon test $p = 0,05$). Disse resultatene ble også reflektert i de histologiske prøvene av leveren, hvor larver fra Cop – Cir behandlingene viste større hepatocytter (leverceller) med høyere andel vakuoler, som indikerer høyere energilager i form av glykogen (data ikke vist, for mer informasjon se Aase, A.S.N. 2022, jf. Kap. 9).



Figur 5-6: Histologiske indekser av tarm hos berggylltarver produsert på fire forskjellige fôringsregimer ved dag 48 etter klekking. (a) villi høyde, (b) microvilli høyde og (c) epitelhøyde.

5.2.5 Fettsyrer og lipidomics

Verdier for totalt lipidinnhold og fettsyrer i fôrorganismene viste tydelige forskjeller mellom artene (Tab. 5-2). De to anrikende fôrorganismene (Artemia og rotatorier) var mer lipidrike enn de to naturlige fôrorganismene (hoppekreps og rur). Innenfor disse gruppene var Artemia signifikant rikere på lipider enn rotatoriene, og det var ingen forskjeller mellom rur og hoppekreps (ANOVA $p < 0.05$, etterfulgt av Holm Sidak *post hoc* test). Ikke overraskende grupperte fôrorganismene seg i henhold til om de var anrikt eller ikke (data ikke vist). Rent overordnet var rur-naupliene rikere på EPA enn de andre organismene og hadde derfor den høyeste EPA:DHA ratioen, og eldre hoppekreps-nauplier (N4-6) var rikere i DHA. De anrikede fôrene skilte seg fra de naturlige hovedsakelig på grunn av høyt innhold av 18:1n9.

Larvene viste ikke noen store endringer i lipidinnhold under forsøksperioden, bortsett fra en forventet nedgang etter at plommesekken var absorbert (data ikke vist) (Tab. 5-3). Larvene grupperte i henhold til det siste fôret de fikk når fettsyreprofilen ble brukt som input til PCA (Fig. 5-7), siden larvene var forskjellige med hensyn til individuelle fettsyrer mellom behandlinger, og med alder. Både DHA, 16:0, sum av omega-3 fettsyrer, 22:0 og C17:1n7 bidro til forskjellene på PC1. PC2 var mest påvirket av 20:3n3, 18:3n3, 15:0 og 20:1n9. DHA-konsentrasjonene endret seg veldig lite mellom grupper og oppførte seg likt i alle grupper over tid; en stor nedgang fra omtrent 30 % av fettsyresammensetningen ved klekking til omtrent 18 % ved dag 48 etter klekking. Larver i Rot – Art behandlingen viste eksempelvis lavere fraksjon av EPA av totalt fettsyreinhold (~5-6 %) enn de andre gruppene (~10 %). Mer informasjon om fettsyredata vil bli tilgjengelig i masteroppgaven til Carvalho, L. G. (jfr. Kap. 9)

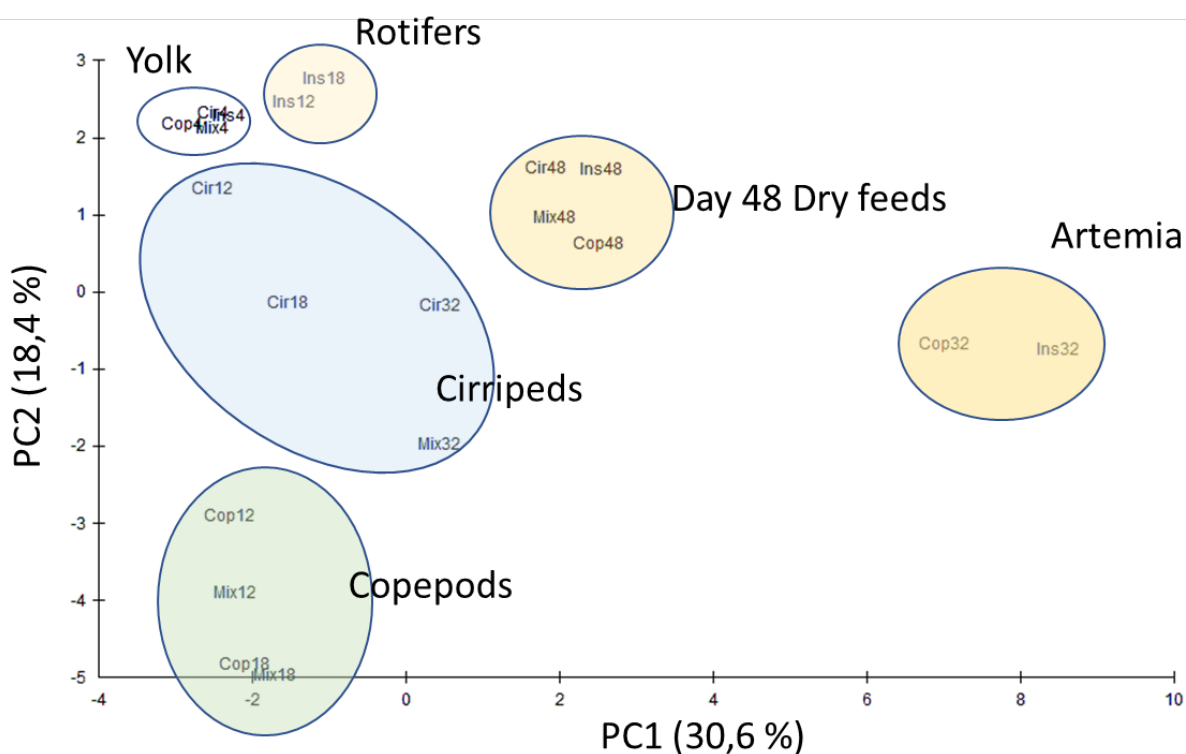
Larvenes lipidprofiler som ble analysert på dag 48 etter klekking grupperte i henhold til hele fôringshistorikken til larvene når vi gjorde lipidomics, men også i henhold til den andre fôrtypen larvene fikk å spise (data ikke vist). De to gruppene som fikk hoppekreps som sitt første fôr var ikke lenger gruppert sammen, og dette antyder at lipidprofilen til larvene reflekterer det fôret de har spist mest nylig, og at lipidsignaturen til den første fôrorganismen var for utvannet til å detekteres av analysen. Ved å bruke lipidomics-datasettet og responsvariablene dødelighet og vekst for å lage et CIM-plot, ble det funnet et sett med korrelasjoner mellom enkelte lipidkomponenter og disse responsvariablene. Flere monoacylglycerider (MAGs) viste en positiv korrelasjon med dødelighetskoeffisienten, og flere triacylglycerider (TAGs) var positivt korrelert med vekst. Phosphatidylethanolamines (PEs) viste en sterk negative korrelasjon til vekstrater.

Tabell 5-2: Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer \pm SD) i fôrorganismene som ble brukt i startfôrings-forsøket på berggyllt.

Feeds	Artemia % of total fatty acids \pm standard deviation	Cirripeds % of total fatty acids \pm standard deviation	Experimental cirripeds % of total fatty acids \pm standard deviation	Copepod (n4 - n6) % of total fatty acids \pm standard deviation	Copepod (n1 - n3) % of total fatty acids \pm standard deviation	Dry feed % of total fatty acids \pm standard deviation	Rotifers % of total fatty acids \pm standard deviation
C14:0	1,45 \pm 0,22	1,59 \pm 0,12	2,58 \pm 0,24	1,97 \pm 0,38	2,69 \pm 0,17	2,48 \pm -	2,82 \pm 0,64
C14:1n5	0 \pm 0	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,02 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01	0,06 \pm -	0,03 \pm 0
C15:0	0,12 \pm 0,02	0,28 \pm 0,13	0,35 \pm 0,18	0,2 \pm 0,15	0,19 \pm 0,2	0,08 \pm -	0,43 \pm 0,02
C16:0	16,95 \pm 0,32	14,62 \pm 0,8	15,11 \pm 0,29	12,77 \pm 2,39	12,88 \pm 0,18	18,9 \pm -	19,79 \pm 5,44
C16:1n5	0,26 \pm 0,01	0,04 \pm 0,08	0,11 \pm 0,13	0 \pm 0	0,09 \pm 0,13	0,33 \pm -	0 \pm 0
C16:1n7	5,91 \pm 0,46	3,86 \pm 0,24	6,25 \pm 0,09	1,35 \pm 1,7	1,31 \pm 0,2	3,34 \pm -	8,34 \pm 3,28
C16:1n9	0,21 \pm 0,05	0,17 \pm 0,11	0,27 \pm 0,07	0,39 \pm 0,2	0,27 \pm 0,12	0,36 \pm -	0,6 \pm 0,13
C17:0	1,24 \pm 0,08	0,33 \pm 0,02	0,4 \pm 0,15	0,22 \pm 0,09	0,25 \pm 0,01	0,33 \pm -	0,75 \pm 0,18
C17:1n7	0,2 \pm 0,02	0 \pm 0	0,04 \pm 0,07	0 \pm 0	0 \pm 0	0,18 \pm -	0 \pm 0
C18:0	5,09 \pm 0,32	3,59 \pm 0,5	4,24 \pm 0,33	4,2 \pm 0,43	4,08 \pm 0,68	3,62 \pm -	3,32 \pm 0,48
C18:1n7	8,02 \pm 0,63	9,14 \pm 0,45	7,79 \pm 0,18	4,17 \pm 4,1	3,06 \pm 0,27	3,38 \pm -	3,09 \pm 0,66
C18:1n9	13,52 \pm 0,46	6,08 \pm 0,25	8,65 \pm 0,14	2,28 \pm 2,91	0,73 \pm 0,31	14,43 \pm -	13,04 \pm 3,81
C18:2n6	5,46 \pm 0,18	0,9 \pm 0,06	1,54 \pm 0,06	7,01 \pm 4,78	12,04 \pm 1,94	26,85 \pm -	4,34 \pm 0,4
C18:3n3	4,91 \pm 0,4	0,66 \pm 0,04	0,63 \pm 0,02	7,16 \pm 4,38	18,98 \pm 4,47	3,24 \pm -	1,58 \pm 0,51
C18:3n6	0,33 \pm 0,04	0,15 \pm 0,04	0,17 \pm 0,14	0,36 \pm 0,3	0,58 \pm 0,72	0,09 \pm -	0,2 \pm 0,02
C18:4n3	0,02 \pm 0,03	0,9 \pm 0,61	1,08 \pm 0,72	2,04 \pm 1,76	2,56 \pm 3,5	0 \pm -	0,3 \pm 0,04
C20:0	0,19 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02	0,7 \pm 0,14	0,35 \pm -	0,18 \pm 0,02
C20:1n9	0,44 \pm 0,09	2,71 \pm 0,13	4,03 \pm 0,12	0,92 \pm 1,49	0,15 \pm 0,04	2,13 \pm -	3,05 \pm 0,75
C20:2n6	0,15 \pm 0	0,62 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	1,54 \pm 0,58	3,63 \pm 0,59	0,26 \pm -	0,62 \pm 0,09
C20:3n3	0,18 \pm 0	0,2 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,3 \pm 0,08	0,86 \pm 0,18	0,16 \pm -	0,46 \pm 0,13
C20:4n3	0 \pm 0	0,28 \pm 0,19	0,36 \pm 0,24	2,73 \pm 4,69	4,38 \pm 5,43	0 \pm -	1,63 \pm 0,33
C20:4n6	4,23 \pm 1,93	1,25 \pm 0,03	1,18 \pm 0,03	1,61 \pm 0,25	2,54 \pm 0,17	0,99 \pm -	2,4 \pm 0,55
C20:5n3	12,55 \pm 1,03	31,92 \pm 1,56	27,82 \pm 1,18	17,7 \pm 10,79	7,96 \pm 4,71	6,97 \pm -	4,36 \pm 0,87
C22:0	0,36 \pm 0,06	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,38 \pm 0,17	0,63 \pm 0,02	0,26 \pm -	0,13 \pm 0,02
C22:1n9	0,03 \pm 0	0,17 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	0,09 \pm 0,09	0,13 \pm 0,14	0,07 \pm -	0,36 \pm 0,07
C22:5n3	0 \pm 0	0,36 \pm 0,24	0,64 \pm 0,23	0,48 \pm 0,33	3,85 \pm 4,37	0 \pm -	1,23 \pm 0,27
C22:5n6	0,03 \pm 0,02	0,18 \pm 0,12	0,22 \pm 0,15	0,83 \pm 0,81	0,66 \pm 0,84	0 \pm -	9,52 \pm 2,97
C22:6n3	18,08 \pm 0,31	19,35 \pm 0,49	14,92 \pm 0,59	28,71 \pm 10,58	14,52 \pm 6,41	10,8 \pm -	16,77 \pm 2,28
C24:1	0,08 \pm 0,01	0,37 \pm 0,08	0,43 \pm 0,03	0,38 \pm 0,05	0,25 \pm 0,03	0,35 \pm -	0,65 \pm 0,1
Sum unsaturated fatty acids	25,4 \pm 0,81	20,64 \pm 1,39	22,9 \pm 0	19,91 \pm 2,54	21,42 \pm 0,78	26,02 \pm -	28,46 \pm 5,23
Sum saturated fatty acids	74,6 \pm 0,81	79,36 \pm 1,39	77,1 \pm 1,1	80,09 \pm 2,54	78,58 \pm 0,78	73,98 \pm -	71,54 \pm 5,23
Sum n3 fatty acids	35,73 \pm 1,14	53,66 \pm 2,33	45,59 \pm 1,1	59,13 \pm 7,51	53,11 \pm 0,19	21,17 \pm -	28,73 \pm 5,42
Sum n6 fatty acids	10,21 \pm 1,82	3,11 \pm 0,07	3,66 \pm 0,98	11,35 \pm 5,57	19,45 \pm 1,13	28,19 \pm -	15,33 \pm 4,72
EPA/DHA	0,69 \pm 0,05	1,65 \pm 0,04	1,86 \pm 0,15	0,9 \pm 1,06	0,53 \pm 0,09	0,65 \pm -	0,24 \pm 0,1
Total lipids (% of dry weight)	21,28 \pm 1,82	9,56 \pm 0,95	12,61 \pm 1,2	9,14 \pm 0,74	11,69 \pm 3,35	16,4 \pm -	16,25 \pm 1,72

Tabell 5-3: Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer \pm SD) i berggylltlarver fôret med 4 forskjellige fôringsregimer på dag 48 etter klekking.

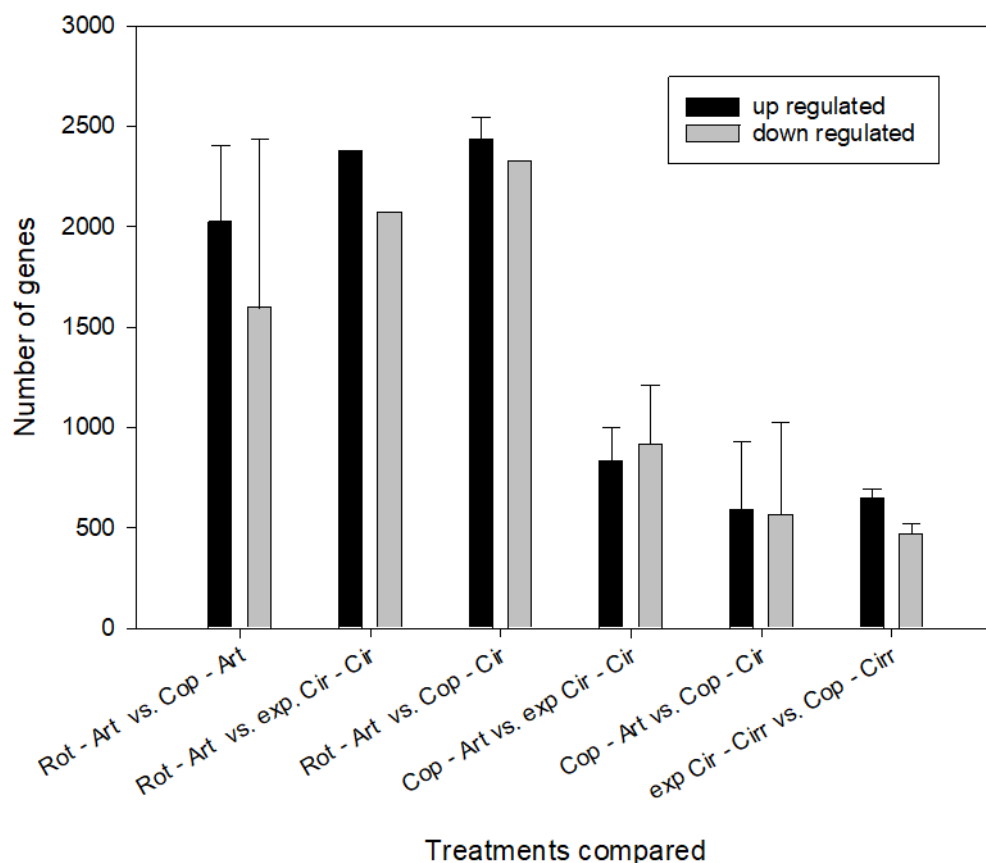
Treatment Larvae	Exp. Cirripeds - Cirripeds % of total fatty acids \pm standard deviation	Rotifer - Artemia % of total fatty acids \pm standard deviation	Copepods - Artemia % of total fatty acids \pm standard deviation	Copepods - Cirripeds % of total fatty acids \pm standard deviation
C14:0	0,99 \pm 0	0,76 \pm 0,25	0,73 \pm 0,26	0,91 \pm 0,09
C14:1n5	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0,01 \pm 0,01
C15:0	0,31 \pm 0	0,31 \pm 0,02	0,22 \pm 0,13	0,22 \pm 0,12
C16:0	18,1 \pm 0	17,71 \pm 0,71	17,86 \pm 1,42	18,2 \pm 0,42
C16:1n5	0 \pm 0	0 \pm 0	0,08 \pm 0,14	0,08 \pm 0,14
C16:1n7	1,99 \pm 0	1,82 \pm 0,15	1,82 \pm 0,03	1,96 \pm 0,04
C16:1n9	0,36 \pm 0	0,47 \pm 0,03	0,39 \pm 0,1	0,31 \pm 0,06
C17:0	0,42 \pm 0	0,59 \pm 0,01	0,64 \pm 0,22	0,42 \pm 0,03
C17:1n7	0,37 \pm 0	0,51 \pm 0,06	0,44 \pm 0,32	0,24 \pm 0,21
C18:0	7,25 \pm 0	7,8 \pm 0,37	7,84 \pm 1,26	6,81 \pm 0,29
C18:1n7	3,13 \pm 0	3,51 \pm 0,17	3,65 \pm 0,58	3,22 \pm 0,23
C18:1n9	12,33 \pm 0	12,47 \pm 0,29	12,54 \pm 0,45	12,8 \pm 0,28
C18:2n6	17,41 \pm 0	16,11 \pm 1,07	14,28 \pm 4,92	19,1 \pm 0,28
C18:3n3	1,58 \pm 0	1,51 \pm 0,03	1,45 \pm 0,21	1,72 \pm 0,05
C18:3n6	0,91 \pm 0	0,32 \pm 0,28	0,24 \pm 0,23	0,37 \pm 0,23
C18:4n3	0,95 \pm 0	0,58 \pm 0,04	0,33 \pm 0,31	0,56 \pm 0,48
C20:0	0,16 \pm 0	0,2 \pm 0,01	0,24 \pm 0,05	0,2 \pm 0,01
C20:1n9	1,42 \pm 0	1,19 \pm 0,03	1,15 \pm 0,16	1,49 \pm 0,05
C20:2n6	0,59 \pm 0	0,57 \pm 0,01	0,54 \pm 0,1	0,67 \pm 0,03
C20:3n3	0,22 \pm 0	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
C20:4n3	0,49 \pm 0	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,19	0,32 \pm 0,28
C20:4n6	2,04 \pm 0	4,07 \pm 0,21	4,71 \pm 1,74	1,75 \pm 0,1
C20:5n3	7,59 \pm 0	6,53 \pm 0,3	6,51 \pm 0,37	7,9 \pm 0,57
C22:0	0,19 \pm 0	0,31 \pm 0,03	0,32 \pm 0,07	0,18 \pm 0,02
C22:1n9	0,09 \pm 0	0,07 \pm 0	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0
C22:5n3	1,1 \pm 0	1,04 \pm 0,04	3,57 \pm 4,51	0,66 \pm 0,57
C22:5n6	0,79 \pm 0	2,8 \pm 0,15	2,26 \pm 2,17	0,58 \pm 0,5
C22:6n3	18,81 \pm 0	18,09 \pm 0,1	17,41 \pm 4,59	18,74 \pm 0,71
C24:1	0,41 \pm 0	0,32 \pm 0,03	0,35 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01
Sum unsaturated fatty acids	27,41 \pm 0	27,68 \pm 0,68	27,86 \pm 0,12	26,93 \pm 0,66
Sum saturated fatty acids	72,59 \pm 0	72,32 \pm 0,68	72,14 \pm 0,12	73,07 \pm 0,66
Sum n3 fatty acids	30,73 \pm 0	28,09 \pm 0,19	29,61 \pm 0,51	30,05 \pm 0,18
Sum n6 fatty acids	21,75 \pm 0	23,88 \pm 1	22,03 \pm 1,52	22,47 \pm 0,82
EPA/DHA	0,4 \pm 0	0,36 \pm 0,02	0,4 \pm 0,14	0,42 \pm 0,01
Total lipids \pm % of dry weight	23,04 \pm 0	15,78 \pm 2,67	14,94 \pm 1,26	18,7 \pm 1,2



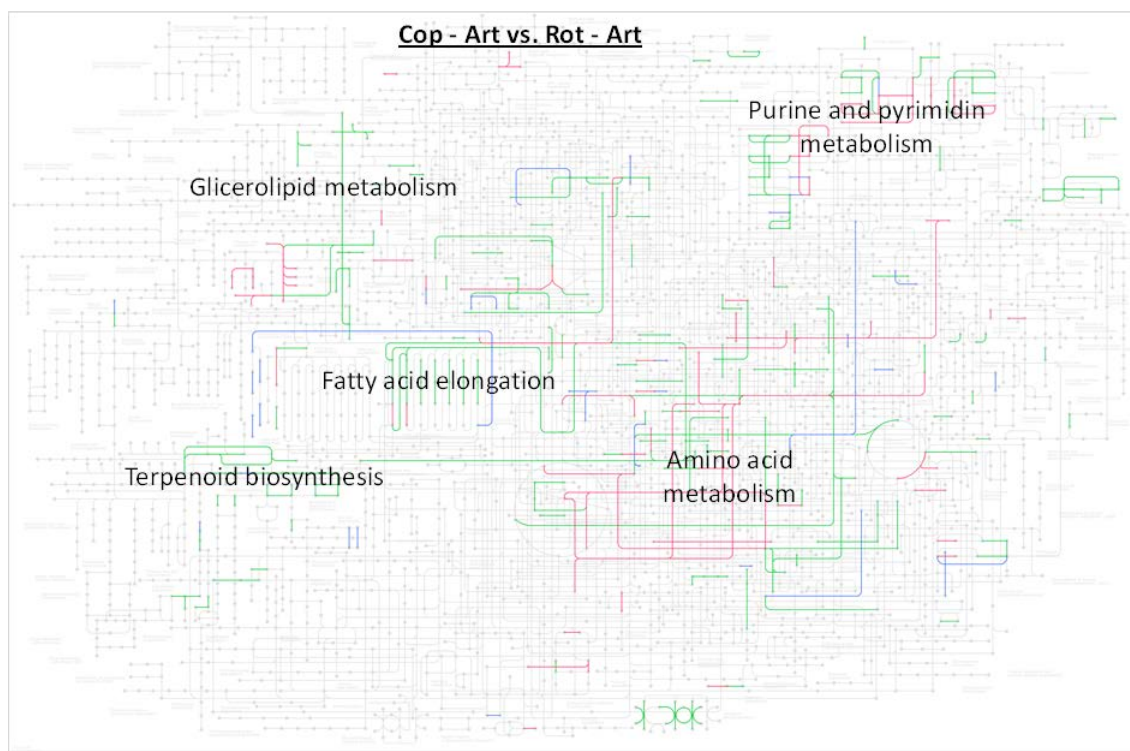
Figur 5-7: Principal component analysis (PCA) av fettsyreprofil i berggylltlarver på ulike tidspunkt under startfôringsforsøket i tilknytning til overganger mellom fôrtyper. Den fargede bakgrunnen representerer fôret larvene hadde spist i dagene før prøvetakingen. Fargekodingen er den samme som er brukt i Tabell 5-1: Lys gul= Rotatorier; Gul= Artemia; Mørk gul= tørrfôr; Blå= Rur; Grønn= hoppekreps. Den svarte sirkelen omrissrer plommesekkklarver 4 dager etter klekking og før første fôring.

5.2.6 Genuttrykk

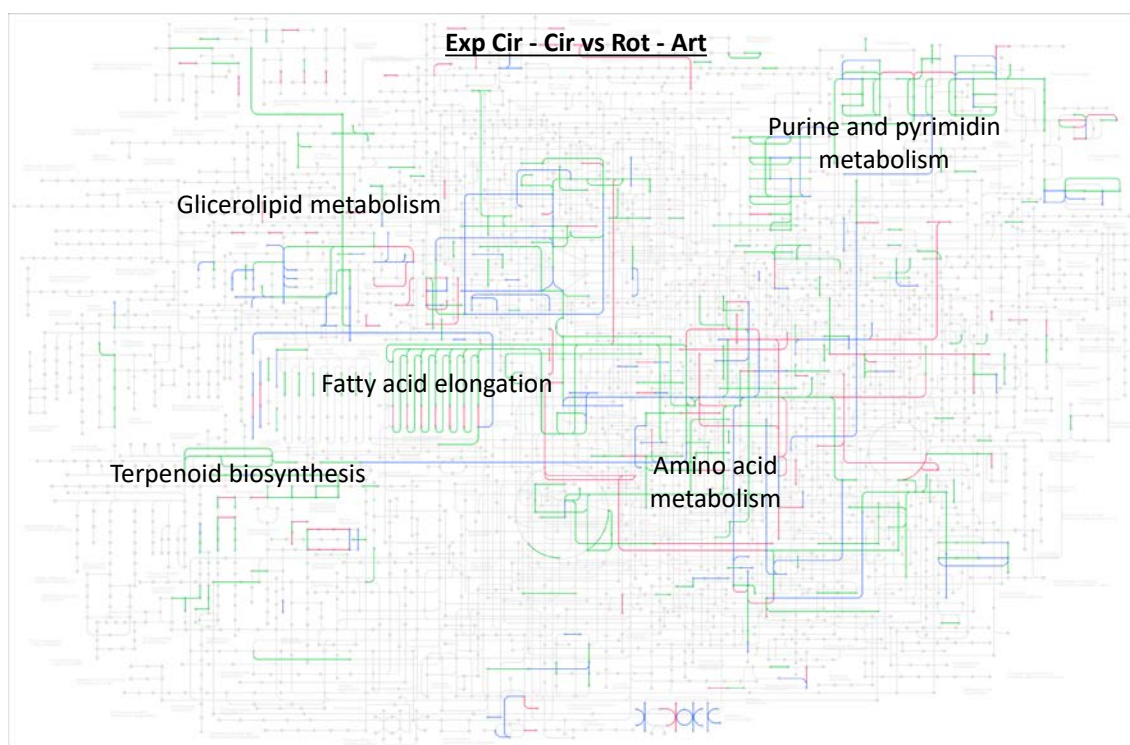
Den største forskjellen i genuttrykk ble funnet mellom gruppene startet på rotatorier (som var anrikt) og larver som fikk naturlig fôr (hoppekreps og rur). Innenfor den siste gruppen gitt naturlig fôr var det liten forskjell i antall gener som var opp- eller nedregulert, og vi fant en stor forskjell i uttrykk av gener som er involvert i forlenging av fettsyrer, som var oppregulert i rotatorie/Artemia-gruppen (Fig. 5-8). Forskjellene peker på forskjellene i lipider som larvene fikk tilført via fôret. Naturlige fôrorganismer slik som hoppekreps og rur har ofte høyt innhold av polart fett (Bell & Sargent, 2003; Tocher et al., 2008), mens kommersielle anrikingsdieter somoftest har store mengder nøytrale lipider. I tillegg vil Artemia konvertere polare lipider i anrikningen til nøytrale lipider på relativt kort tid (Guinot et al, 2013). Dermed var utfordringen med å metabolisere ulike lipider fra den første fôrtypen larvene spiste fortsatt synlig i larvene, selv etter at de hadde utelukkende spist det samme formulerte fôret i 12 dager. Kanskje mer interessant var det at vi ikke fant noen effekt av den andre fôrorganismen larvene spiste (anrikede Artemia og *S. balanoides*). Dette indikerer den veldige viktige rollen den første fôrtypen en fiskelarve spiser. Genuttrykk og metabolske baner er vist i KEGG Pathway Maps i Figur 5-9a-f. Figur 5-9a, b og c sammenlikner fisk fôret med uanrikede fôr som første fôr (hoppekreps og Exp Cir) med larver som fikk anrikede rotatorier de første dagene. Her kan man tydelig se store forskjeller i metabolsk aktivitet. Disse forskjellene blir mindre når man sammenlikner larver som har spist hoppekreps og rur som sitt første fôr (Fig. 5-9d & e). Ved å sammenlikne de to behandlingene som begge fikk hoppekreps som sitt første fôr (Cop – Cir og Cop – Art) kan vi se at det nesten ikke er noen forskjeller i genuttrykk mellom disse (Fig. 5-9f) som understøtter at det ikke er noen effekt av den andre fôrtypen larvene fikk (Artemia og *S. balanoides*).



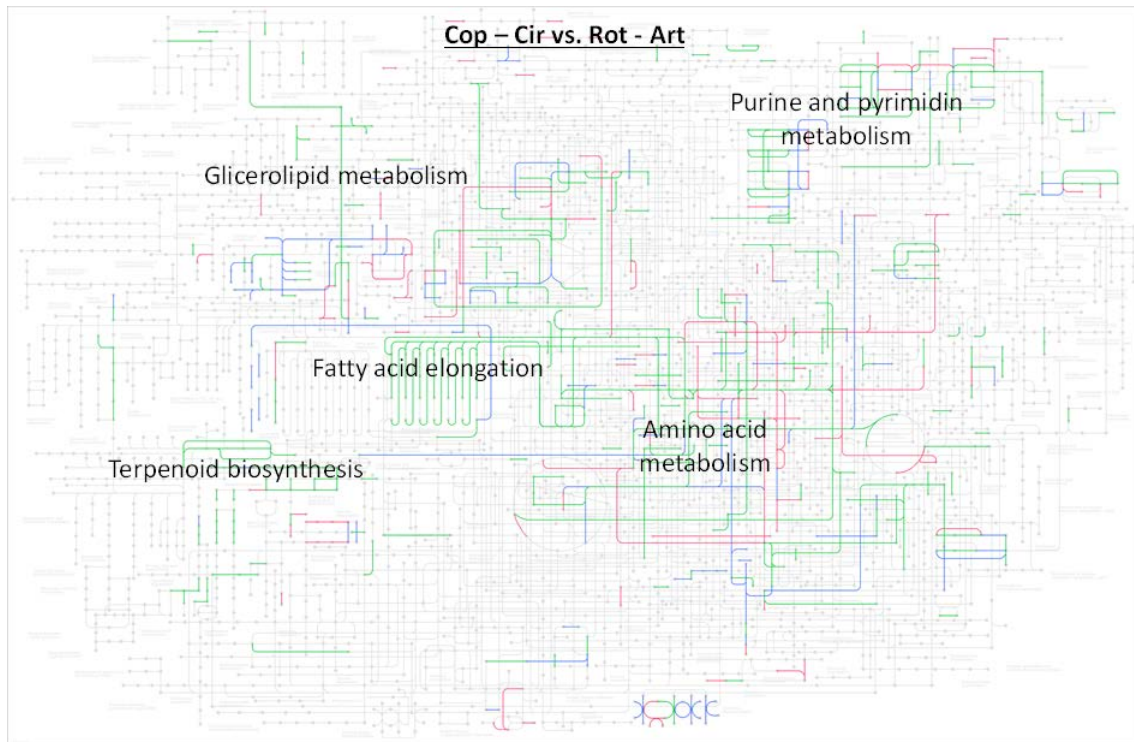
Figur 5-8: Forskjeller i genuttrykk hos berggylltarver gitt fire forskjellige fôringsregimer 48 dager etter klekking. Søylen viser antall gener som er enten opp- eller nedregulert for de ulike behandlingene sammenliknet med hverandre, vist som gjennomsnittlig antall \pm SD.



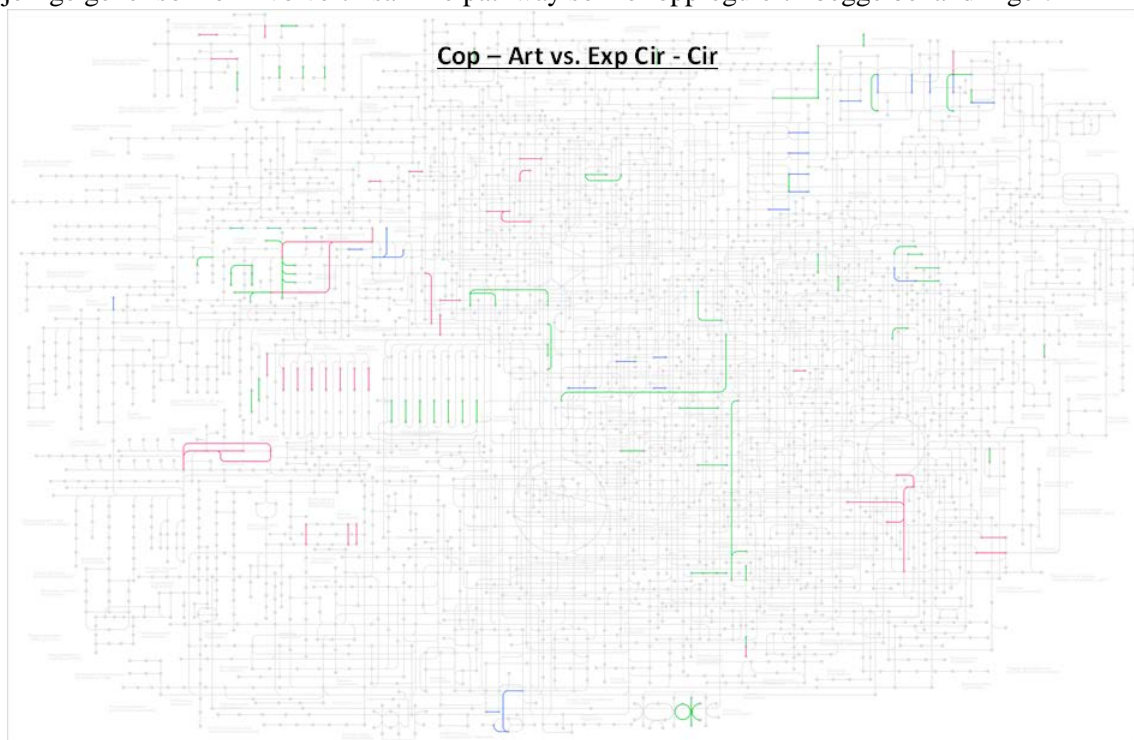
Figur 5-9a: KEGG Pathway Map of differential gene expression hos berggytlarver i Cop – Art behandlingen og Rot-Art behandlingen 48 dager etter klekking. Grønt indikerer gener som er oppregulert i den førstnevnte behandlingen, og rødt representerer gener som er oppregulert i den andre behandlingen. Blått indikerer forskjellige gener som er involvert i samme pathway som er oppregulert i begge behandlinger.



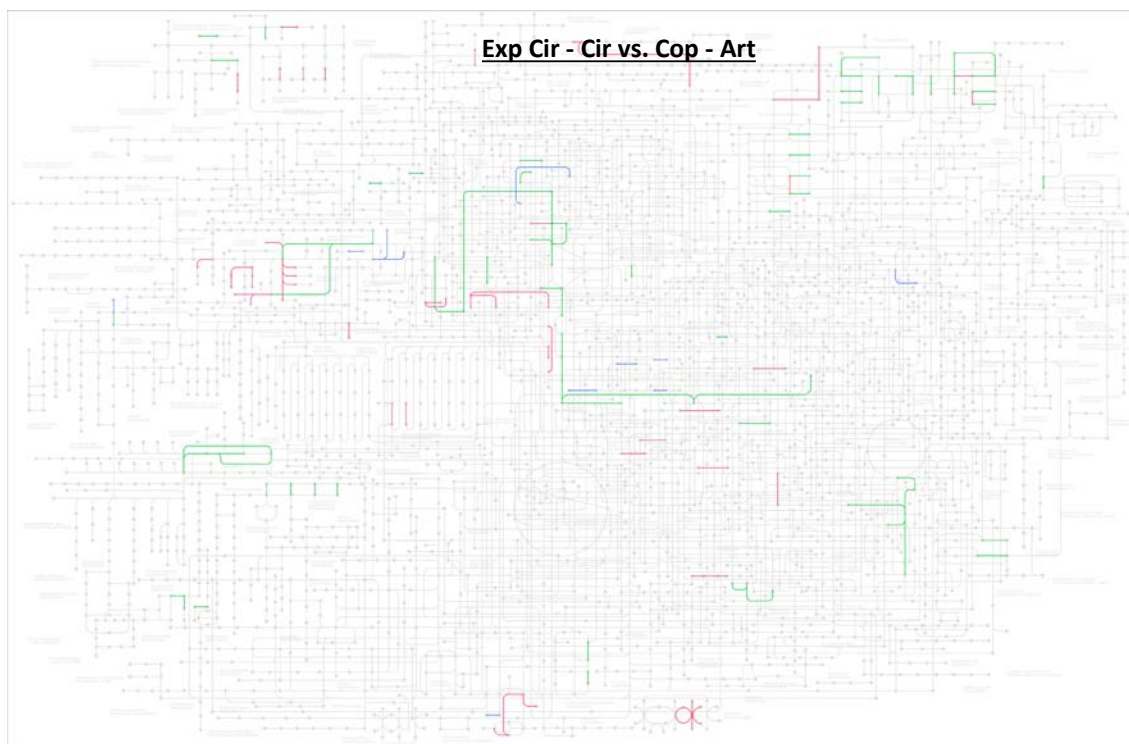
Figur 5-9b: KEGG Pathway Map of differential gene expression hos berggytlarver i Exp. Cir - Cir behandlingen og Rot - Art behandlingen 48 dager etter klekking. Grønt indikerer gener som er oppregulert i den førstnevnte behandlingen, og rødt representerer gener som er oppregulert i den andre behandlingen. Blått indikerer forskjellige gener som er involvert i samme pathway som er oppregulert i begge behandlinger.



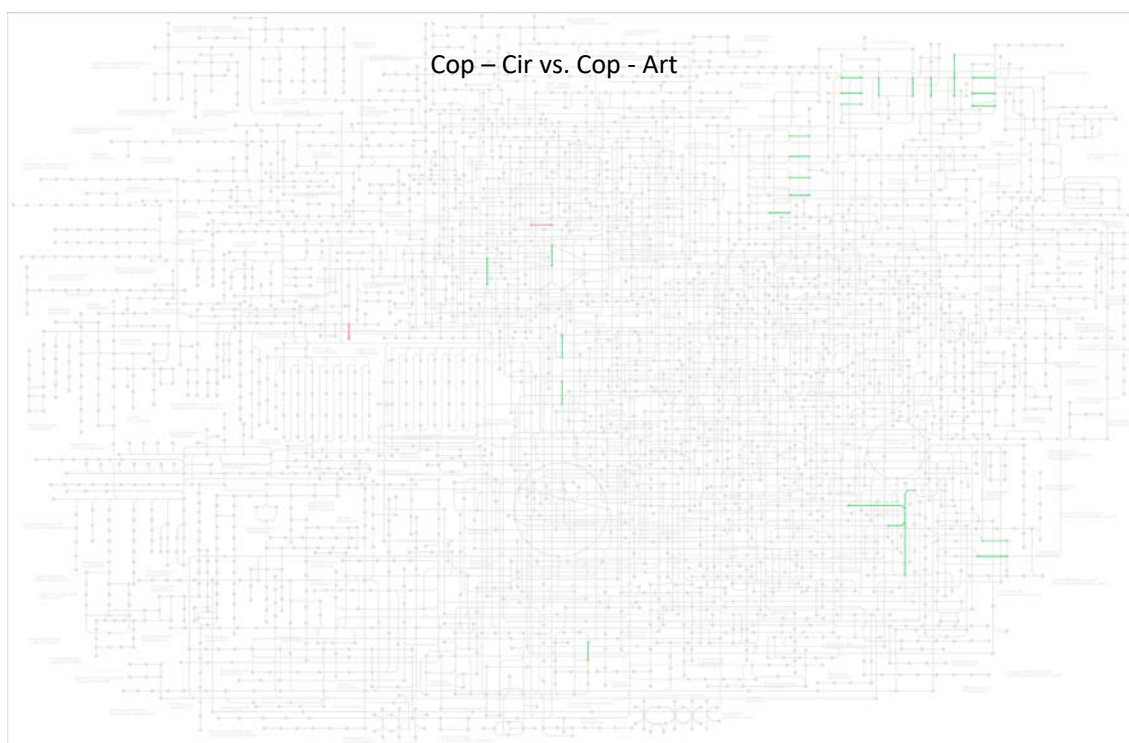
Figur 5-9c: KEGG Pathway Map of differential gene expression hos berggytlarver i Cop - Cir behandlingen og Rot - Art behandlingen 48 dager etter klekking. Grønt indikerer gener som er oppregulert i den førstnevnte behandlingen, og rød representerer gener som er oppregulert i den andre behandlingen. Blått indikerer forskjellige gener som er involvert i samme pathway som er oppregulert i begge behandlinger.



Figur 5-9d: KEGG Pathway Map of differential gene expression hos berggytlarver i Cop - Art behandlingen og Exp Cir - Cir behandlingen 48 dager etter klekking. Grønt indikerer gener som er oppregulert i den førstnevnte behandlingen, og rød representerer gener som er oppregulert i den andre behandlingen. Blått indikerer forskjellige gener som er involvert i samme pathway som er oppregulert i begge behandlinger.



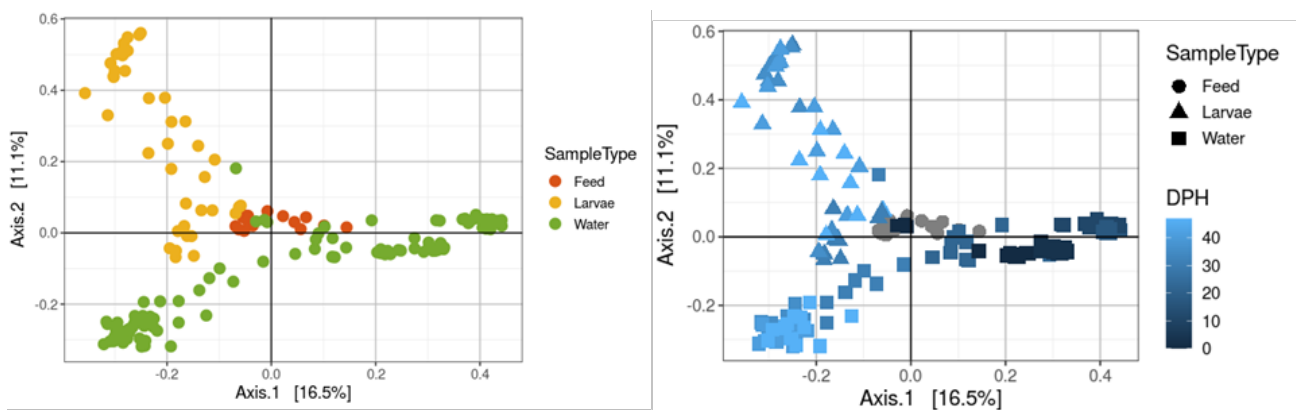
Figur 5-9e: KEGG Pathway Map of differential gene expression hos berggytlarver i Exp Cir – Cir behandlingen og Cop - Art behandlingen 48 dager etter klekking. Grønt indikerer gener som er oppregulert i den førstnevnte behandlingen, og rød representerer gener som er oppregulert i den andre behandlingen. Blått indikerer forskjellige gener som er involvert i samme pathway som er oppregulert i begge behandlinger.



Figur 5-9f: KEGG Pathway Map of differential gene expression hos berggytlarver i Cop – Cir behandlingen og Cop - Art behandlingen 48 dager etter klekking. Grønt indikerer gener som er oppregulert i den førstnevnte behandlingen, og rød representerer gener som er oppregulert i den andre behandlingen. Blått indikerer forskjellige gener som er involvert i samme pathway som er oppregulert i begge behandlinger.

5.2.7 Mikrobiologi

Betadiversiteten (forandringsrate, jfr. Appendix A) i bakteriesamfunnet i berggylltarvene, de ulike fôrorganismene, og vannet i tankene skilte seg fra hverandre (Fig. 5-10), og forskjellene var signifikante (PERMANOVA; $p < 0,001$). Fôrmikrobiotaen viste likheter i det mikrobielle samfunnet med både berggylltarvene og vannprøvene. Tidspunkt for prøveuttak hadde stor påvirkning på det mikrobielle samfunnet i vannprøvene, som ikke er noen stor overraskelse siden forsøket ble gjennomført i gjennomstrømskar. Selve larvene var forskjellige seg imellom med hensyn til betadiversitet. Exp Cir – Cir-behandlingen var forskjellig fra de tre andre behandlingene, hvorav disse ikke var forskjellige fra hverandre. Dette kan forklares av en høyere diversitet i det mikrobielle samfunnet for larver i Exp Cir – Cir behandlingen (Simpson 0,14 vs. 0,06, 0,06 og 0,06). Vi hadde bare prøver til mikrobielle analyser på dag 32 etter klekking og utover, og interessant nok var forskjellene størst på dag 32 og ble mindre mot slutten av forsøket når alle behandlingene mottok samme fôr. Alle resultatene på mikrobiologi er presentert i Appendiks A - *Ballan wrasse (Labrus bergylta) start-feeding experiment microbiome analysis report*, og ytterligere informasjon vil bli presentert i masteroppgaven til Carmo, A.I. (jfr. Kap. 9).



Figur 5-10: Betadiversitet (jfr. Appendiks A) i det mikrobielle samfunnet hos berggylltarver, fôr og vann. (Venstre) Sortert etter fôrtype, og (Høyre) etter samplingstidspunkt. Hvert punkt representerer den totale mikrobielle strukturen av en prøve i 2D. Hvis mer enn to prøver ville ha vært identiske med hensyn til mikrobielt samfunn, ville disse overlappet perfekt i plottet. Jo mer forskjellig prøvene er, jo lengre fra hverandre vil de vises i plottet.

5.3 Diskusjon

Fiskelarver utviser ofte høy dødelighet i de tidlige livsstadiene, og det å forstå årsaker og effekter av dødelighet hos larver er en formidabel utfordring (Houde 2008). De vanligste naturlige årsakene til dødelighet hos fiskelarver er ernæring og predasjon (Cushing 1974, Lasker 1981, Cury and Roy 1989) og disse er også trolig overlappende, men det sistnevnte kan i alle fall utelukkes i et forsøksoppsett. Hovedvariabelen i dette forsøket var fôret (ernæring), og forskjellene var store. Vi vet fra tidligere at hoppekreps gir bedre vekst og overlevelse hos flere marine fiskeslag (Støttrup & Norsker 1997, Øie et al. 2017) enn tradisjonelle levendefôrorganismer. Dette kan forklares med at de fleste fiskelarver spiser hoppekreps de første dagene etter klekking i sitt naturlige miljø, og at de derfor er tilpasset fiskens ernæringskrav. Nauplier av rur kan også være et naturlig fôr for enkelte fiskelarver, men i dette forsøket ble det påvist høy dødelighet og lav vekst for larvene som fikk Exp. Cirriped diet som sitt første fôr. Dette kan muligens forklares med at larvene fikk for lite fôr, siden omtrent 50 % (i antall) av naupliene trolig var for store for at berggylltarvene var i stand til å spise disse rett etter klekking.

De forskjellige fôringsregimene hadde stor effekt på berggylltarvene. Larver som fikk hoppekreps som deres første fôr viste signifikant høyere overlevelse sammenliknet med de som fikk rotatorier de første ukene etter klekking. Dette er ikke i tråd med resultater vist i Øie et al. (2017) hvor anrikede rotatorier ga lik overlevelse som hoppekreps, mens uanrikede rotatorier ga lavere overlevelse; i dette forsøket ga anrikede rotatorier høy

dødelighet og lav vekst i perioden med rotatoriefôring. Lengdedata presentert i Hansen et al. (2013) var i samme område som i dette forsøket frem til dag 40 etter klekking, hvorefter de observerte en bratt stigning i vekstrater som ble forklart med en vellykket tørrfôrtilvenning. Dette ble ikke observert i vårt forsøk, og kan forklares med at Hansen et al. brukte høyere og konstant temperatur enn vi gjorde, som i praksis ga 100 ekstra døgngrader for fisken i deres forsøk over de 48 dagene.

Forbeining var avhengig av lengden på fisken med bare liten påvirkning av fôringsregimer. Forbeiningen startet ved omtrent 6 mm SL og var ferdig ved 10 mm SL. Vi fant en forsinkelse i forbeining av ryggvirvlene i noen behandlinger, kanskje spesielt hos de største larvene i behandlingene som fikk hoppekreps som sitt første fôr. I snitt nådde larvene 6 mm SL rundt dag 25 etter klekking, tidspunktet hvor tørrfôret ble introdusert. Åpenbart nådde fisk som vokste raskere i begynnelsen terskelen for påbegynnende forbeining ved 6 mm tidligere, og på et tidspunkt hvor den andre fôrorganismen ble introdusert (*Artemia* og *S. balanoides*). Forbeinings-scoren viser at både Cop – Cir og Cop – Art behandlingene hadde et større innslag av store larver med lav forbeinings-score. Ved sammenlikning med Rot – Art behandlingen, som hadde fullstendig forbeining hos alle larver >9-10 mm SL, men vokste sakte i begynnelsen, kan dette tyde på at tilskudd av nødvendige mineraler inntraff på et bedre tidspunkt med hensyn til larvenes størrelse i Rot – Art behandlingen og dermed ga bedre forbeining. Et viktig element for forbeining er fosfor, som må tas opp gjennom fôret, og fosfornivået er vanligvis høyt i formulert fôr (f.eks. 1,3 % P i gemma micro) sammenliknet med f.eks. anriket *Artemia* som har en størrelsesorden lavere P-innhold (0,08 – 0,15 % av kroppsvekt med bruk av ulike anrikingsprodukter; de Azevedo et al., 2021). Det er derfor mulig at forbeiningen var begrenset av tilgjengelig fosfor for larvene som vokste raskest, og at de mindre larvene nådde grensen for forbeining på det tidspunktet tørrfôret ble introdusert.

Larvene som fikk hoppekreps i begynnelsen og deretter *CryoPlanktonLarge* hadde bedre score for både tarm- og leverhistologi. Det høyere overflatearealet funnet i tarmen ga høyere tilgjengelighet av energi og medførte at larvene lagret glykogen i leveren, mens larver i de andre behandlingene trolig ikke fikk nok energi til å lagres. Fôravhengige forskjeller i energilagring har også blitt vist for torsk, hvor larver fôret med polart fett lagret mer energi enn de som fikk samme fettsyrer i den nøytrale formen. Slike resultater viser at små forskjeller i tidligernæring hos fiskelarver har betydning for senere utvikling, og at denne kursen kan bli ytterligere endret med det neste fôret larvene får.

Fettsyresammensetningen i en organisme reflekterer ofte det som organismen har spist, og derfor brukes ofte fettsyreprofiler til å rekonstruere fôringshistorikk (Dalsgaard & John 2004, Perga et al. 2006) og habitatbruk (Hielscher et al. 2015) innen økologi. I dette forsøket viste vi at fiskelarvene grupperte i henhold til hvilket fôr de hadde spist i løpet av den siste perioden. Dette understreker hvor dynamisk og raskt kroppssammensetningen til en fiskelarve kan undergå endringer. Selv om fettsyrer spiller en viktig rolle for helsen, er det svært lite tilgjengelig informasjon om hvordan ulike lipidkomponenter påvirker tidlige livsstadier i fisk. Ved å bruke lipidomics fant vi et utvalg lipider som korrelerte med vekst og overlevelse hos berggylt. Det ser ut til å være et potensiale i å bruke lipidomics til å vurdere kvalitet og ytelse i fiskelarver, og STARTRENS-prosjektet er et steg på veien i å løse opp i spørsmål rundt hvordan lipider spiller inn i livet til en fiskelarve utover lipidklasser og fettsyrer. Denne typen kunnskap kan brukes til å få en mer mekanistisk forståelse om fiskelarver i oppfølgingsstudier.

Analysen av genuttrykk viste at det var store forskjeller mellom larver som ble startfôret på anrikede rotatorier og larver som fikk naturlige fôr (tur og hoppekreps), og disse forskjellene var i stor grad relatert til oppregulering av gener som er involvert i forlenging av fettsyrer. Det mest interessante her var at analysene på genuttrykk ble utført på fisk som hadde spist samme tørrfôr 14 dager, og dermed at utfordringene i å håndtere lipider fra ulike kilder (anrikning vs. naturlig dyreplankton) fortsatt var synlig i det metabolske fingeravtrykket til larvene på dag 48 etter klekking. Det er også verdt å merke seg at vi ikke fant noen effekt av den andre fôrtypen larvene ble introdusert til; anriket *Artemia* og *CryoPlanktonLarge*, når det gjelder genuttrykk. Dette underbygger igjen viktigheten av det første fôret en fiskelarve får.

5.4 Konklusjon og anbefaling

Basert på resultatene av dette forsøket kan det gjøres følgende anbefaling. I et fôringsregime for berggylt bør rotatorier byttes ut med hoppekreps, siden behandlingene som fikk hoppekreps til å begynne med viste høyere overlevelse. Den andre fôrtypen som skal introduseres etter hoppekreps kan være CryoPlanktonLarge (*S. balanoides*) som en erstatte til Artemia. Selv om dette fôret viste sammenliknbar vekst med Artemia, så viste histologiske analyser av tarm og lever bedre kapasitet for fordøyning og energilagring når larvene spiser rur-nauplier. I tillegg viser genuttrykk-mønster at rurnauplier som fôr nummer to har lik effekt som hoppekreps, så det trengs muligens mindre omstrukturering av metabolske prosesser. Til sist ser det ut som at tørrförtilvenningen bør håndteres mer dynamisk hos berggylt enn det vi gjorde i dette forsøket, hvor vi påbegynte tørrförtilvenning på dag 32 etter klekking, uavhengig av larvenes størrelse. Tørrförtilvenningen bør starte når larvene når "flexion" som inntreer ved 6 -7 mm SL. Siden størrelsesvariasjonen i larvepopulasjoner generelt, og særlig hos berggylt, kan være stor, vil larvene kunne nå flexion-stadiet tidligere enn forventet ved bruk for som bidrar til god vekst. Larver som nådde 6 mm terskelen for forbeining først i vårt forsøk hadde mindre forbeining enn de andre, og dette kan være en effekt av fosforbegrensning eller begrensning av andre mineraler.

5.5 Referanser

- Balon, E., K. (1999). "Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses)." *Environmental Biology of Fishes* 56(1 - 2): 17-38.
- Bell, J. G. and J. R. Sargent (2003). "Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities." *Aquaculture* 218(1-4): 491.
- Cahu, C., J. Z. Infante and T. Takeuchi (2003). "Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae." *Aquaculture* 227(1-4): 245-258.
- Cury, P. and C. Roy (1989). "Optimal environmental window and pelagic fish recruitment success in upwelling areas." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46(4): 670-680.
- Cushing, D. H. (1974). *The natural regulation of fish populations*. Sea fisheries research. F. R. Harden Jones. London, Paul Elek : 399-412.
- Dalsgaard, J. and John, M.S., 2004. Fatty acid biomarkers: validation of food web and trophic markers using ¹³C-labelled fatty acids in juvenile sandeel (*Ammodytes tobianus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(9), pp.1671-1680.
- de Azevedo, A. M., A. P. Losada, I. Ferreira, A. Rianza, V. Losada, T. Russo, C. Boglione, S. Vázquez and M. I. Quiroga (2021). "Skeletal anomalies in Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) fed with different commercial enriched artemia: a study in postlarvae and juveniles." *Animals* 11(1): 22.
- Folch, J., M. Lees and G. H. S. Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues." *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- François, N. R. L., M. Jobling and C. Carter (2010). *Finfish Aquaculture Diversification*. Oxfordshire, U.K., CABI.
- Guinot, D., Ó. Monroig, F. Hontoria, F. Amat, I. Varó and J. C. Navarro (2013). "Enriched on-grown Artemia metanauplii actively metabolise highly unsaturated fatty acid-rich phospholipids." *Aquaculture* 412-413: 173-178.
- Hansen, T. W., A. Folkvord, E. Grøtan and Ø. Sæle (2013). "Genetic ontogeny of pancreatic enzymes in *Labrus bergylta* larvae and the effect of feed type on enzyme activities and gene expression." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 164(3): 176-184.
- He, K., G. Gkioxari, P. Dollár and R. Girshick (2017). *Mask r-cnn*. Proceedings of the IEEE international conference on computer vision.
- Hielscher, N.N., Malzahn, A.M., Diekmann, R. and Aberle, N., 2015. Trophic niche partitioning of littoral fish species from the rocky intertidal of Helgoland, Germany. *Helgoland Marine Research*, 69(4), pp.385-399.
- Hillebrand, H., C. D. Duerksen, D. Kirschtel, U. Pollinger and T. Zohary (1999). "Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae." *Journal of Phycology* 35(2): 403-424.
- Hou, Z. and L. A. Fuiman (2019). "Nutritional programming in fishes: insights from mammalian studies." *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.
- Houde, E. D. (2008). "Emerging from Hjort's shadow." *Journal of the Northwest Atlantic Fishery Science* 41: 53-70.
- Imsland, A. K., A. Foss, R. Koedijk, A. Folkvord, S. O. Stefansson and T. M. Jonassen (2006). "Short- and long-term differences in growth, feed conversion efficiency and deformities in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) started on rotifers or zooplankton." *Aquaculture Research* 37(10): 1015-1027.
- Khoomrung, S., Chumnanpuen, P., Jansa-Ard, S., Ståhlman, M., Nookaew, I., Borén, J., Nielsen, J., 2013. Rapid quantification of yeast lipid using microwave-assisted total lipid extraction and HPLC-CAD. *Analytical chemistry* 85, 4912-4919.
- Kjørsvik, E., C. Olsen, P.-A. Wold, K. Hoehne-Reitan, C. L. Cahu, J. Rainuzzo, A. I. Olsen, G. Øie and Y. Olsen (2009). "Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids on skeletal development and fatty acid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Aquaculture* 294(3): 246-255.

- Kotani, T., M. Yokota, H. Fushimi and S. Watanabe (2011). "How to determine the appropriate mortality in experimental larval rearing?" *Fisheries Science* 77(2): 255-261.
- Kvæstad, B., Hansen, B.H. and Davies, E., 2022. Automated morphometrics on microscopy images of Atlantic cod larvae using Mask R-CNN and classical machine vision techniques. *MethodsX*, 9, p.101598.
- Lasker, R. (1981). The role of a stable ocean in larval fish survival and subsequent recruitment. *Marine fish larvae, morphology, ecology and relation to fisheries*. R. Lasker. Seattle, WA Washington Sea Grant Program: 80-87.
- Metian, M., M. Troell, V. Christensen, J. Steenbeek and S. Pouil (2020). "Mapping diversity of species in global aquaculture." *Reviews in Aquaculture* 12(2): 1090-1100.
- Moser, H. G. (1984). "Ontogeny and systematics of fishes." *American Society of Ichthyologists and Herpetologist Special Publications* 760.
- Øie, G., T. Galloway, M. Soroy, M. H. Hansen, I. A. Norheim, C. K. Halseth, M. Almli, M. Berg, M. R. Gagnat, P. A. Wold, K. Attramadal, A. Hagemann, J. O. Evjemo and E. Kjorsvik (2017). "Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first-feeding of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae." *Aquaculture Nutrition* 23(1): 3-17.
- Perga, M.E., Kainz, M., Matthews, B. and Mazumder, A., 2006. Carbon pathways to zooplankton: insights from the combined use of stable isotope and fatty acid biomarkers. *Freshwater Biology*, 51(11), pp.2041-2051.
- Støttrup, J. G. and N. H. Norsker (1997). "Production and use of copepods in marine fish larviculture." *Aquaculture* 155: 231-247.
- Suzuki, S. (1985). "Topological structural analysis of digitized binary images by border following." *Computer vision, graphics, and image processing* 30(1): 32-46.
- Tocher, D. R., E. A. Bendiksen, P. J. Campbell and J. G. Bell (2008). "The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish." *Aquaculture* 280(1-4): 21-34.
- von Herbing, I. H., R. G. Boutilier, T. Miyake and B. K. Hall (1996). "Effects of temperature on morphological landmarks critical to growth and survival in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Marine Biology* 124(4): 593-606.
- Walne, P. R. (1970). "Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*." *Fisheries Investigations* 26: 162.
- Zambonino-Infante, J.-L. and C. Cahu (2010). "Effect of nutrition on marine fish development and quality." *Recent Advances in Aquaculture Research*: 103-124.
- Zhang, T. Y. and C. Y. Suen (1984). "A fast parallel algorithm for thinning digital patterns." *Communications of the ACM* 27(3): 236-239.

6 Utvikling av optimalisert startfôringsregime for rognkjeks (AP2)

Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) er en av de mest brukte rensefisk i kampen mot lakselus i norske laksemerder. Den lever hovedsakelig i nordlige deler av Atlanteren, og er aktiv som rensefisk ned til 4 °C (Nytrø et al., 2014). I oppdrett trenger leppefisk opptil 1,5 år før de kan settes ut i merd, mens rognkjeks kan settes ut allerede etter 4-9 måneder (Powell et al., 2018). Det er enklere å produsere rognkjeksyngel enn yngel av berggyllt, og kommersiell produksjon av rognkjeks har økt fra under én million til over 30 millioner fisk mellom 2012 og 2016 (Havforskningsinstituttet, 2021; Fiskeridirektoratet, 2020). En av flaskehalsene i yngelproduksjonen av rognkjeks er at produsentene fortsatt er avhengige av egg fra villfangede gytefisk, og økende fangst er motstridende til klassifiseringen av arten som «nesten truet» i rødlista til Verdens naturvernunion (Lorance et al. 2015).

De første ukene av fiskeyngelens liv er avgjørende for senere suksess. Startfôring av rognkjeks larver er en av de viktigste flaskehalsene for videre utvikling av yngelproduksjonen (Powell et al., 2018). Når de skal begynne å spise, er rognkjeks larvene større og bedre utviklet enn de små pelagiske fiskelarvene, som for eksempel berggyllt- og torske-larver. De har også forskjellige krav til produksjonsmetoder og dyrehold. Rognkjeks larvene føres gjerne med tørrfôr fra starten, og det brukes fjærerur i enkelte kommersielle anlegg, og vekst og overlevelse er variabel. Tørrfôret er utviklet for andre marine fiskearter, og næringskravet til rognkjeks larver er lite kjent. Fra andre arter med pelagiske larver vet vi at startfôringen de første ukene i larvenes liv kan påvirke yngelkvaliteten, og påvirkninger i tidlige larve-stadier kan medføre langvarige endringer i vekst og fysiologiske responser.

Pelagiske fiskelarver må ha levende startfôr, og de har lite utviklet fordøyelsesapparat og ingen magesekk når de skal begynne å spise (Kjørsvik et al., 2004). Rognkjeks larver utvikler magesekk når de er ca. 8 – 10 mm lange og rett etter at siste rest av plommesekken er brukt opp, 21 – 34 dager etter klekking (Marthinsen, 2018). Startfôring med formulert fôr kan påvirke tarmepitelet negativt og leverens energistatus, og redusere vekst og overlevelse (Marthinsen, 2018), og tidlig feilernæring fører til dårligere velferd (f.eks. skjelettutvikling, problemer med tilvenning til formulert fôr) (Powell et al., 2018) og kan bidra til mindre evne til å spise lus etter utsett i merdene.

I naturen spiser rognkjeks larver og -yngel hovedsakelig krepsdyr av passende størrelse (Ingólfsson and Kristjánsson, 2002). Å bruke hoppekreps i startfôringen av marine kaldt-vanns fiskelarver har gitt svært god vekst og overleving i forhold til bruk av rotatorier og Artemia (Shields et al., 1999; Karlsen et al., 2015, Øie et al., 2017). Marine fiskelarver trenger generelt høye nivå av flerumettede fettsyrer (som DHA og EPA), helst inkorporert i byttedyrenes fosfolipider (i membraner og nervevev). Dette finner vi særlig i marine planktonorganismer som hoppekreps og andre krepsdyr. Disse organismene har også generelt høyere innhold av protein og frie aminosyrer enn hva vi finner i rotatorier og Artemia.

Ved NTNU har vi imidlertid erfart at rognkjeks larver som startføres med anrikede Artemia får mye bedre vekst og overleving enn larver som får både formulert fôr og hoppekreps (Hanssen, 2018, Marthinsen, 2018). Rognkjeks larver sitter helst «sugd» fast til substratet, og andre større krepsdyr enn kopepoder kan være interessante som fôr. Rurlarver er planktoniske i flere uker (Lopez, 2012), og er sannsynligvis en naturlig fôrkilde for demersale fiskelarver som rognkjeks. Vi har testet effekten av å føre rognkjeks larver med forskjellige byttedyr-typer (anrikede Artemia, rurlarver, kultiverte hoppekreps og formulert fôr) og forskjellige fôr-regimer på vekst, overlevelse og flere biologiske markører for larvenes ernæringsstatus, som beinutvikling, leverens energistatus, muskelutvikling, biokjemisk sammensetning og molekylære responser i rognkjeks larvene. Forsøket varte gjennom hele startfôringsfasen, fram til 35 dager etter klekking.

6.1 Materialer og metode

Ubefruktede rognkjeks egg fra åtte villfangede hunnfisk og melke fra én hann ble sendt fra Akvaplan-NIVA i Tromsø til NTNU Sealab. Eggene ble blandet og fordelt i 15 grupper (å 300 ml egg) som ble befruktet og lagt i separate inkubatorer. Det var én inkubator (FT familieklekker, Fish Tech AS, Norway) over hvert

startfôringskar, slik at nyklekte larver ble overført direkte til startfôringskarene. Inkubatorer og larvekar var forsynt med gjennomstrømmende sjøvann (34 ppt saltholdighet, 10 °C, filtrering 1 µm). Inkubatorene ble holdt mørkt fram til klekking.

Volum i startfôringskarene var 100 liter, vannutskiftingsraten (VUR) og maskevidde på utløpet var tilpasset fôrtypene; (1) 300-600 % VUR dag⁻¹ og 100 µm maskevidde for hoppekreps, (2) 1200 % VUR dag⁻¹ og 350 µm maskevidde for rurlarver, og (3) 2400 % VUR dag⁻¹ og 750 µm maskevidde for Artemia og formulert fôr. Karene ble luftet forsiktig med trykkluft gjennom en lufteslange ved bunnen rundt utløpet. Vanntemperatur ble målt daglig (2000T Digital Thermometer, Digitron, England). Oksygen-nivå ble målt daglig (ProODO Optical Dissolved Oxygen Instrument, YSI, USA) og ble holdt over 80 % metning ved å justere luftingen i karene. For å gi larvene økt overflate å feste seg til, hang vi 2-3 silikonmatter (ca. 15 x 20 cm) i karene i perioden 2 – 24 dager etter klekking. Det ble brukt kontinuerlig lys (lysrør) over karene gjennom hele startfôringsforsøket. Karene ble røktet daglig ved hjelp av en innebygd rensearm (bunn og karsider), én gang per dag for fôring med levendefôr, og minst to ganger per dag for fôring med formulert fôr. Døde larver ble telt etter hver røkting.

6.1.1 Fôringsregimer

Fem forskjellige fôringsregimer ble brukt i forsøket, og tre kar ble brukt for hver behandling. Larvene fikk forskjellig fôr i perioden 2 – 21 dager etter klekking, og ble tilvennet formulert fôr mellom 21 og 25 dager etter klekking (gradvis overgang), se oversikt i Tabell 6-1.

Larver i gruppen «formulert fôr» (FD) fikk Gemma micro 150 fra 2-9 dager etter klekking, så en blanding av Gemma micro 150 og 300 ved 10-16 dager etter klekking, og kun Gemma micro 300 fra dag 17. «Artemia»-larvene (Art) ble fôret med *Artemia* i 2-20 dager etter klekking, så tilvennet formulert fôr med 1:1 mix av Gemma micro 150 og 300 ved 21-25 dager etter klekking, og deretter ble de fôret med Gemma micro 300. Fôring med «cirripedier» (Cir) ble gjort ved 2-20 dager etter klekking, og med tilvenning til formulert fôr som for Artemia-gruppen. Gruppene som fikk «hoppekreps/formulert fôr» (Cop/FD) og «hoppekreps/cirripedier» (Cop/Cir) fikk hoppekreps fra 2-9 dager etter klekking, ble fra 10-20 dager etter klekking tilvennet enten lik blanding av Gemma micro 150 og 300, eller CryoPlanktonLarge. Begge disse gruppene fikk blandingen av formulert fôr i 21-25 dager etter klekking, og ble fôret med Gemma micro 300 fra 26 dager etter klekking og fram til forsøkets slutt ved 35 dager etter klekking.

Tabell 6-1: Oversikt over fôringsregimene i startfôringsforsøket med rognkjeks-larver, med perioder for de ulike fôrtypene i løpet av forsøket. FD=Formulert fôr, Art=Artemia, Cir = CryoPlanktonLarge Cop = Hoppekreps (*Acartia tonsa*), ind = individer. Gjennomsnittlig størrelse for de ulike byttedyr er angitt i parentes bak hver fôrtype, for cirripedier og hoppekreps er dette informasjon fra leverandøren/producenten.

Behandling	Fôrtype og perioder (dager etter klekking)		
	2 – 9 dager etter klekking	9 – 21 dager etter klekking	21 – 35 dager etter klekking
FD	GEMMA 150	GEMMA 150 & 300	GEMMA 300
Art	Artemia (1200 µm)		GEMMA 300 (Artemia 21 – 25 dager)
Cir	CryoPlanktonLarge (350 µm)		GEMMA 300 (CryoPlanktonLarge dag 21 – 25)
Cop/FD	<i>A. tonsa</i> (185-394 µm)	GEMMA 150:300 (<i>A. tonsa</i> dag 10 – 16)	GEMMA 300
Cop/Cir	<i>A. tonsa</i> (185-394 µm)	CryoPlanktonLarge (5400 – 7800 ind) (<i>A. tonsa</i> dag 10 – 16)	GEMMA 300 (CryoPlanktonLarge dag 21-25)

6.1.2 Formulert fôr, levendefôr og prosedyrer

Levende byttedyr ble overført til fôrreservoarer (20 liters ølkanner i plast (KeyKeg, OneCircle, Netherlands) med kraftig lufting; disse ble fylt opp med sjøvann til 20 liters-merket. Levendefôret ble transportert gjennom silikonslanger til larvekarene ved hjelp av peristaltiske pumper (Kronos 50, Seko, Italia).

Artemia:

Artemiacyster (EG ®, INVE Aquaculture., Belgia) ble klekket (25-28 °C) og separert fra cysteskallene i henhold til INVE's protokoller. Nyklekte Artemia ble overført til anrikningstanker med maks tetthet 300 nauplii mL⁻¹, og anrikt etter protokoll med 10 g Multigain (BioMar AS, Norway) per 60 L sjøvann. Etter 18 timer ble samme dose tilsatt igjen, og naupliene ble høstet ca. seks timer etter siste anrikning før utfôring til larvene.

CryoPlanktonLarge:

Kryopreserverte kuber av produktet "CryoPlanktonLarge" (cirripodie-nauplier av *Semibalanus balanoides* med kryobeskyttende middel), lagret i flytende nitrogen (-196 °C), ble levert av Planktonic AS to ganger i løpet av forsøket. Fôret ble tint og revitalisert før utfôring til larvekarene etter prosedyre fra produsenten (se også Kap. 5.1.2).

Hoppekreps (copepoder):

Fire ganger i løpet av forsøket leverte CFEED AS hoppekreps av arten *Acartia tonsa*, naupliestadium 4 ("N4"), i 1 m³ beholdere (IBC-kontainer), sammen med 20 liters-beholdere med mikroalgen *Rhodomonas baltica* for vedlikeholdsføring av hoppekrepser. Hoppekrepser ble lagret kaldt ved 5 °C frem til de ble fôret ut i løpet av 3-5 dager etter ankomst. Rognkjekslarvene ble hovedsakelig fôret med nauplier som var i stadium N4 til N6, men også kopepoditter i stadium C1 på de siste dagene av hver lagringsperiode som en konsekvens av påvekst under lagring (størrelser: 185 – 394 µm lengde).

Formulert fôr:

Formulert-fôrene GEMMA micro 150 og GEMMA micro 300 ble brukt i forsøket, disse har partikkelstørrelse mellom henholdsvis 100-200 µm og 200-500 µm (Skretting, 2021a, Skretting, 2021b). Utfôring ble gjort med en tids-/mengde-styrt fôrautomat (Stern 905, Fish Tech AS, Norway) som var installert over hvert kar. Fôrautomatene ble styrt online med systemet «Normatic WebServer» (Normatic AS, Norway), med utfôring mellom 4 og 24 ganger per dag.

6.1.3 Prøvetaking og analyser

Prøver av fiskelarver, fôr og vann ble tatt hver dag en ny fôrtype ble introdusert, ved 2, 9, 15, 21, 29 og 34 dager etter klekking. Larvene ble samlet «tilfeldig» fra hvert kar, og alle ble bedøvd med en overdose av tricaine metansulfonat (MS-222, Finquel ®, Argent Chemical Laboratories Inc., USA) blandet i sjøvann før videre bearbeiding.

Standard lengde- og tørrvekt, overlevelse:

Larver (n=15) ble tilfeldig tatt ut fra hver tank ved alle prøvetakingstidspunkt. Larvene ble fotografert gjennom stereolupe med kamera (Leica MZ75, Leica Microsystems, Germany; Zeiss Axiocam ERc 5s, Zeiss Inc., Germany), og standard lengde (SL) ble målt fra snutetipp til enden av notokorden med bildebehandlingsprogrammet ImageJ (Schneider et al., 2012). Larvene ble deretter skylt i destillert vann, plassert i oppveide tinnkapsler og våtvekt (WW) ble registrert med mikrovekt (UMX2 Ultra-microbalance, Mettler-Toledo, USA). Larvene ble så tørket ved 60 °C i minst 24 timer før tørrvekten (DW) ble registrert. Spesifikk vekst-rate (SGR) ble beregnet fra følgende likning (Houde & Schekter, 1981):

$$SGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

hvor W_2 og W_1 er individuell larvevekt ved henholdsvis tider t_2 og t_1 .

Verdiene for SGR ble brukt til å beregne prosent daglig tilvekst (DWI) etter følgende likning (Houde & Schekter, 1981):

$$DWI = (e^{SGR} - 1) \cdot 100\%$$

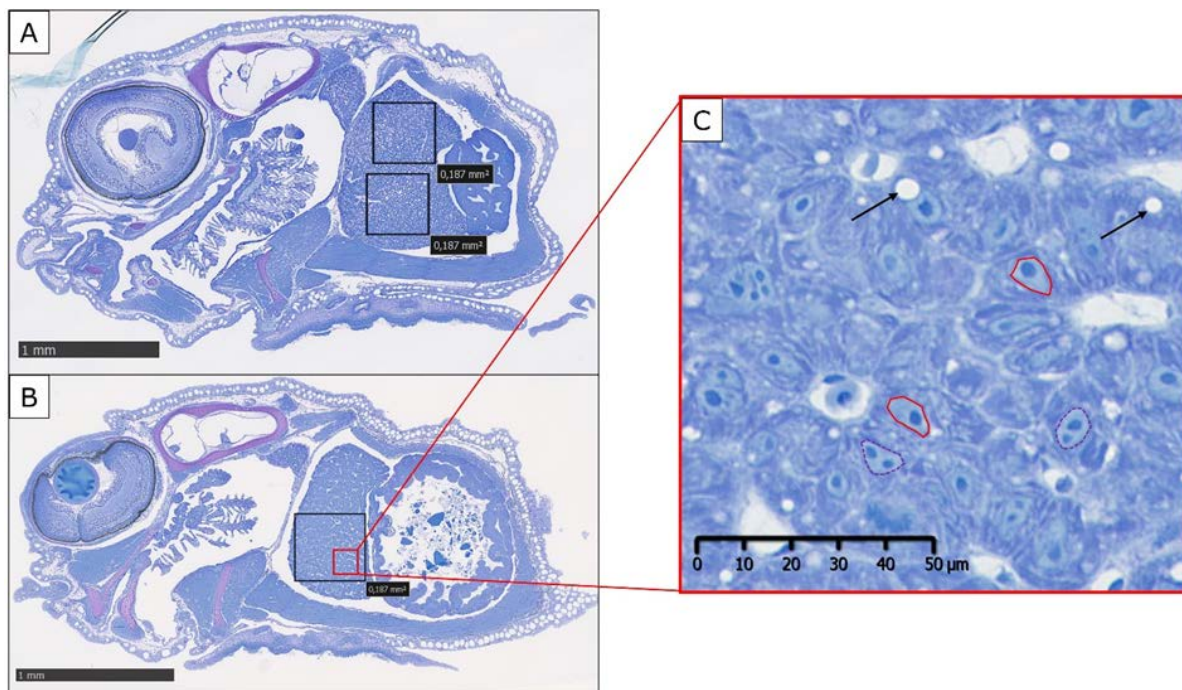
Ved avslutning av forsøket (35 dager etter klekking) ble alle overlevende larver samlet, avlivet med en overdose MS-222 og telt opp. Minst 250 fisk per kar ble tilfeldig tatt ut og fiksert i 4% paraformaldehyde (PFA) i fosfatbuffer (pH 7.4, Apotekproduksjon AS; Oslo) og lagret kjølig for senere fotografering og måling av standard lengde som beskrevet over. Dette ble gjort for å sjekke om det var skjevhet i vår standard prøvetaking for larvestørrelser.

Lever- og muskelhistologi:

Femten larver fra hver behandling ble samlet ved 2, 9, 21 og 35 dager etter klekking, og de ble fiksert samlet i 4% paraformaldehyde (PFA) i fosfatbuffer (pH 7.4). Fem av disse ble skylt i fosfatbuffer, fotografert og SL ble målt, før de ble dehydrert og innstøpt i Technovit 7100. Kroppen foran anus ble brukt for lengdesnitt og leveranalyser, området rett bak anus ble snittet for tverrsnitt og muskelanalyser. Histologiske snitt (2 μ m) ble laget med en Leica Reichert Ultracut microtome (Leica Microsystems, Tyskland) og glasskniv. Snittene ble farget med 0,05 % toluidine blått (Honeywell Riedel-de-Haën™, Germany), og noen leversnitt ble også farget med enkelte prøver ble også farget med «Alcian Blå - Periodic Acid Schiff» (ABPAS) for verifisering av glykogen i leveren. Snittene ble scannet i 40x forstørrelse i en digital slide scanner (Hamamatsu NanoZoomer) og bildene ble undersøkt ved bruk av bildebehandlingsprogramvarene OuPath og ImageJ.

Leverutvikling:

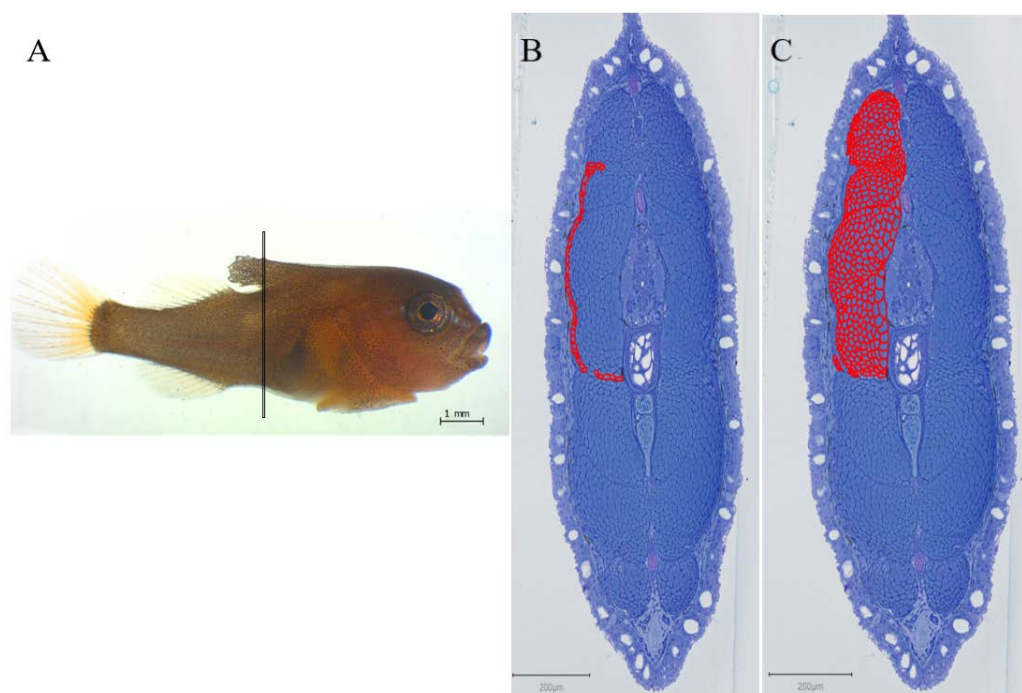
Kvantitative analyser av leveren ble gjort med bildebehandlingsprogrammene QuPath v.0.2.3 (University of Edinburgh, Scotland) og ImageJ v.1.53k (Schneider et al., 2012). Polygon verktøyet i QuPath ble brukt for å måle hepatocyt-kjernens størrelse og antall kjerner i et oppmålt grid-område, Dette ble brukt for å estimere gjennomsnittlig kjernestørrelse og antall kjerner ble brukt for å estimere gjennomsnittlig størrelse på levercellene: (A_{liver}/N_{nuclei}), se Fig. 6 – 1. Gjennomsnittlig ble 264 levercelle-kjerner målt i hver larve. Hver grid ble eksportert til ImageJ, og en punktgrid ble brukt for å estimere vakuolefraksjonen i levercellene ($A_{vacuoles}/A_{liver}$).



Figur 6-1: Langsgående snitt for leveranalyser av rognkjeks larver. A) En larve fra "Art"-behandlingen på dag 35 etter klekking. B) En Cop/FD larve på dag 21 etter klekking. C) Levervevet med en cellekjerne (rød sirkel) og to eller flere nukleoli (lilla sirkel). De sorte pilene indikerer vakuoler i levercellene. Målestokk: 1mm i A og B; og 50 µm i C.

Muskelutvikling og -vekst:

Alle røde og hvite muskelfibre in den øvre venstre kvadranten i larvekroppen rett bak anus ble telt og størrelsen på hver fiber ble målt (Fig. 6-2) som i Vo et al. (2016), ved å bruke programmet QuPath-0.2.3. Parametere som ble målt og beregnet var fiberstørrelse og antall muskelfibre. De 350 største hvite fibrene og de 30 største røde ble brukt til å beregne hvordan muskelfibre vokste i størrelse (hypertrofi). Det totale arealet av både hvit og rød muskel ble målt ved å summere det totale arealet for alle muskelfibrene. Antallet røde og hvite fibre ble brukt som mål for rekrutteringen av nye muskelfibre (hyperplasi). Mosaisk hyperplasi («voksen» muskelrekruttering) ble definert ved observerte små hvite fibre (<100 µm) mellom allerede eksisterende hvite fibre. Totalt muskelareal, antall fibre og fiberstørrelser ble testet statistisk for å evaluere eventuell sammenheng med larvenes størrelse eller alder. Mulig effekt av ernæring ble testet ved å sammenligne antall fibre og fiberstørrelser mellom larver av samme størrelse som hadde spist forskjellig fôr.



Figur 6-2: Histologiske tverrsnitt for muskelanalyser i rognkjeks larver. Larvene ble snittet rett bak anus (illustrert med en Art-larve ved dag 9 etter klekking) (A). Kryss-snitt areal i hver røde (B) og hvite (C) muskelfiber i den venstre *epaxial quadrant* ble målt for å evaluere muskelvekst. Målestokk: 1 mm og 200 μ m.

Beinutvikling:

Ved avslutningen av forsøket (35 dager etter klekking) ble 90 larver fra hvert kar fiksert i 4 % paraformaldehyd (PFA) i fosfatbuffer (pH 7.4) og farget med alizarin rødt etter protokoll i Kjørsvik et al. (2009). Etter farging ble larvene fotografert i et stereomikroskop (Leica M205, Leica Microsystems, Germany) med kamera (AxioCam ERc 5s, Zeiss Inc., Tyskland) og bildene ble analysert for SL og antall ryggvirvler og finner med hel eller delvis forbeining. Forbeining av ryggvirvlene ble klassifisert etter grad av farging i virvlene, etter følgende kategorier (se Fig. 6-3): Transparent= ingen farging i virvelen; Partly=fargen dekker ikke hele virvelen og er mindre intens; Moderat: farging dekker hele omkretsen av virvelen, med mindre farge enn i kompakte virvler; Kompakt= mettet farge som dekker hele virvelen.

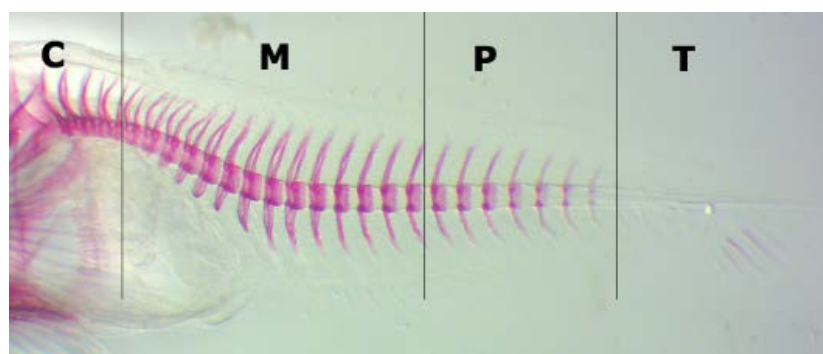
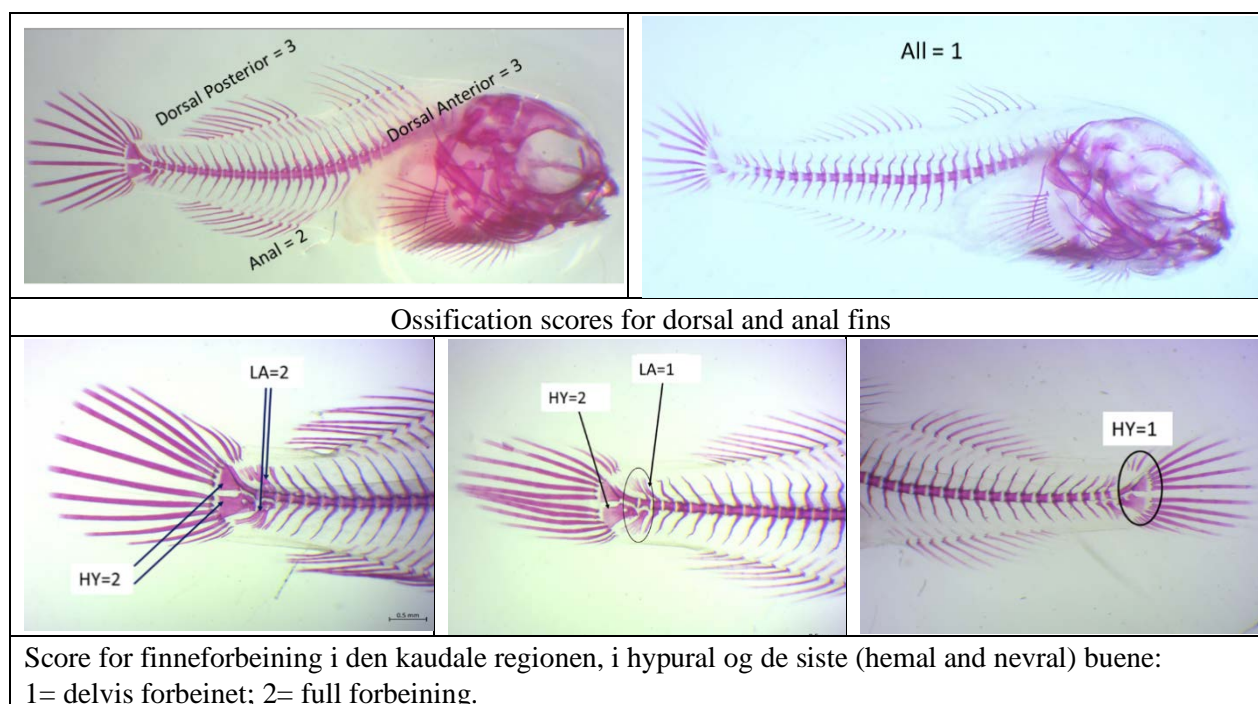


Figure 6-3. Klassifisering av beindannelse i ryggvirvler hos rognkjeks larver. C = kompakt, M = moderat, P = Partiell, T = transparent.

Dorsal og anal-finner ble klassifisert som vist i Figur 6-4: 1= farging av mindre enn halvparten av finnestrålenes lengde; 2= farging av over halvparten av finnestrålenes lengde; 3=farging av hele finnestrålene og de underliggende pterygiophorer.



Figur 6-4: Klassifisering av beinutvikling i finner hos rognkjeks, 34 dager etter klekking.

Lipidekstraksjon, totallipid, lipidomics og fettsyresammensetning:

Lipider ble ekstrahert i henhold til Folch-metoden (Folch, et al., 1957) og totallipid ble bestemt gravimetrisk ved veing av lipidekstrakt etter tørking. Fettsyresammensetning ble bestemt ved transmetylering av fettsyrer til fettsyre metylestere (FAMES) og GC-FID analyse. Lipidklasser ble analysert ved bruk av gasskromatografi som beskrevet av Khoomrung et al. (2013), og prøver for lipidomics ble analysert med en Agilent 1260 UPLC koblet til en 4670 triple quadrupole mass spectrometer med elektronspray-ionisering. Data fra LC-MS/MS analyser ble analysert ved bruk av Agilent MassHunter Quantitative Analysis software package Disse data er fortsatt under bearbeiding og er ikke tatt med i denne sluttrapporten.

Mikrobiologi og bioinformatikk:

Prøver til mikrobiologi ble tatt ved å forhåndsfiltrere 1 L med vann fra larvetanken gjennom en 64 µm silduk og deretter ble vannet filtrert på nytt gjennom et 0,2 µm filter (MF Millipore membrane filter). Larver ble samlet fra tankene og avlivet med en overdose MS222 (500 mg L⁻¹). Egnede mengder av de ulike levendeførene ble vasket i en 64 µm silduk med filtrert sjøvann. Prøvene ble lagret på -20 °C frem til ekstrahering. DNA fra larver, vann og fôrorganismer ble ekstrahert fra filter med bruk av et ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA kit. DNAet ble så vasket ut i DNase/RNase-fritt vann og konsentrasjoner og kvalitet ble analysert ved bruk av NanoDrop og Qubit. Illumina MiSeq sekvensering ble gjennomført hos BGI (Beijing Genome Institute). For bioinformatikk ble rå avlesninger behandlet med bruk av QIIME2 pipeline (v. 2021.2). Statistiske analyser av data nedstrøms og grafisk fremstilling ble gjennomført i R med bruk av ulike bioinformatikkpakker (phyloseq, microbiomeSeq).

Genuttrykk og genuttrykk-bioinformatikk:

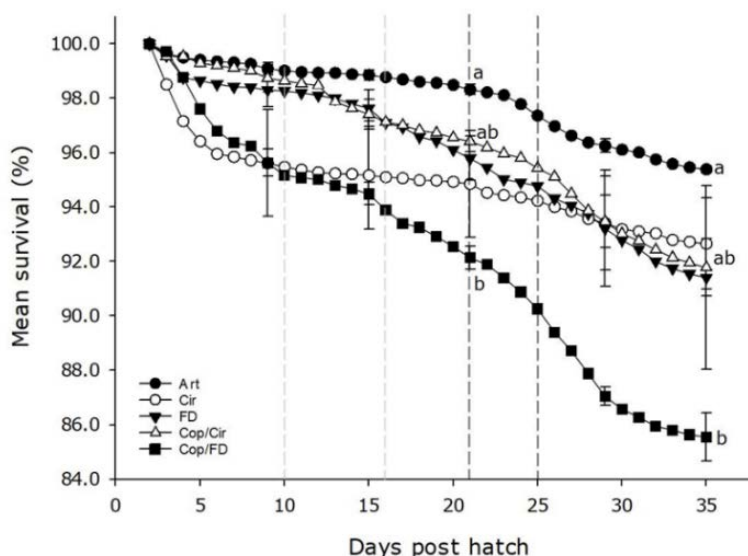
Larver (n=5-10) ble tatt ut fra hvert enkelt kar og brukt til analyser av genuttrykk. Larvene ble avlivet og vasket i MSDSS og deretter lagret i kryorør med DNA/RNA shield og mekaniske perler for RNA-ekstraksjon. Prøver ble umiddelbart frosset på -80 °C. RNA-ekstraksjon ble gjennomført med et kommersielt

RNA-kit og prøvene ble sendt på tørris til BGI for sekvensering. Sekvensering ble utført på DNBSeg-plattformen med bruk av standardiserte protokoller hos BGI. Rådata/sekvensering ble behandlet i flere steg (se Malzahn et al., *under publisering* for mer informasjon, jf. Kap. 9) før til slutt, komplette referanser ble kartlagt med bruk av Bowtie2 og RSEM.

6.2 Resultater

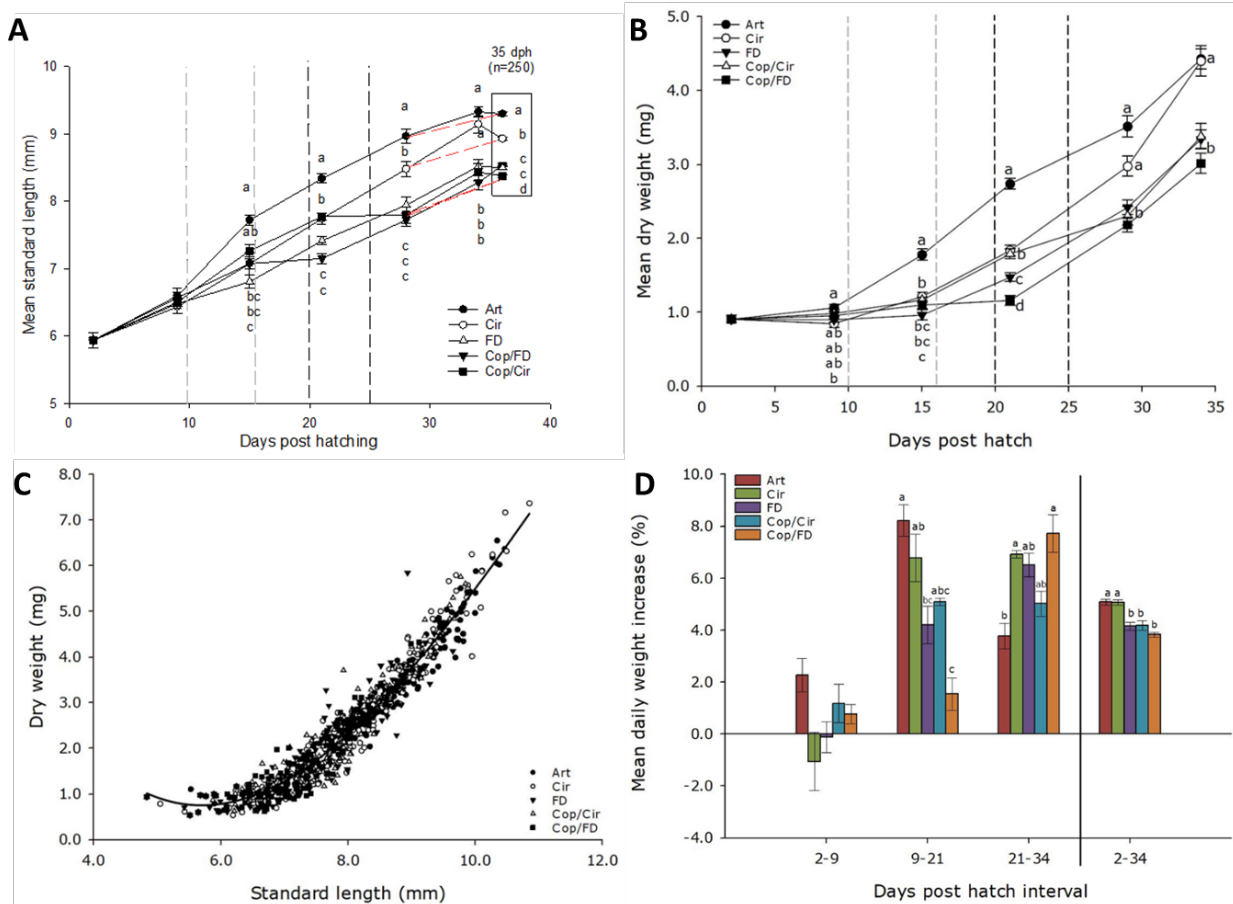
6.2.1 Overlevelse og vekst

Larver fôret med Artemia hadde best overlevelse (ca. 95 %) ved avslutningen av forsøket (Fig. 6-5), larvene fôret med hoppekreps og formulert fôr (Cop/DF) hadde signifikant dårligere overlevelse enn de andre (86 %), og de øvrige larvegruppene hadde relativt lik overleving mellom 92-94 %.

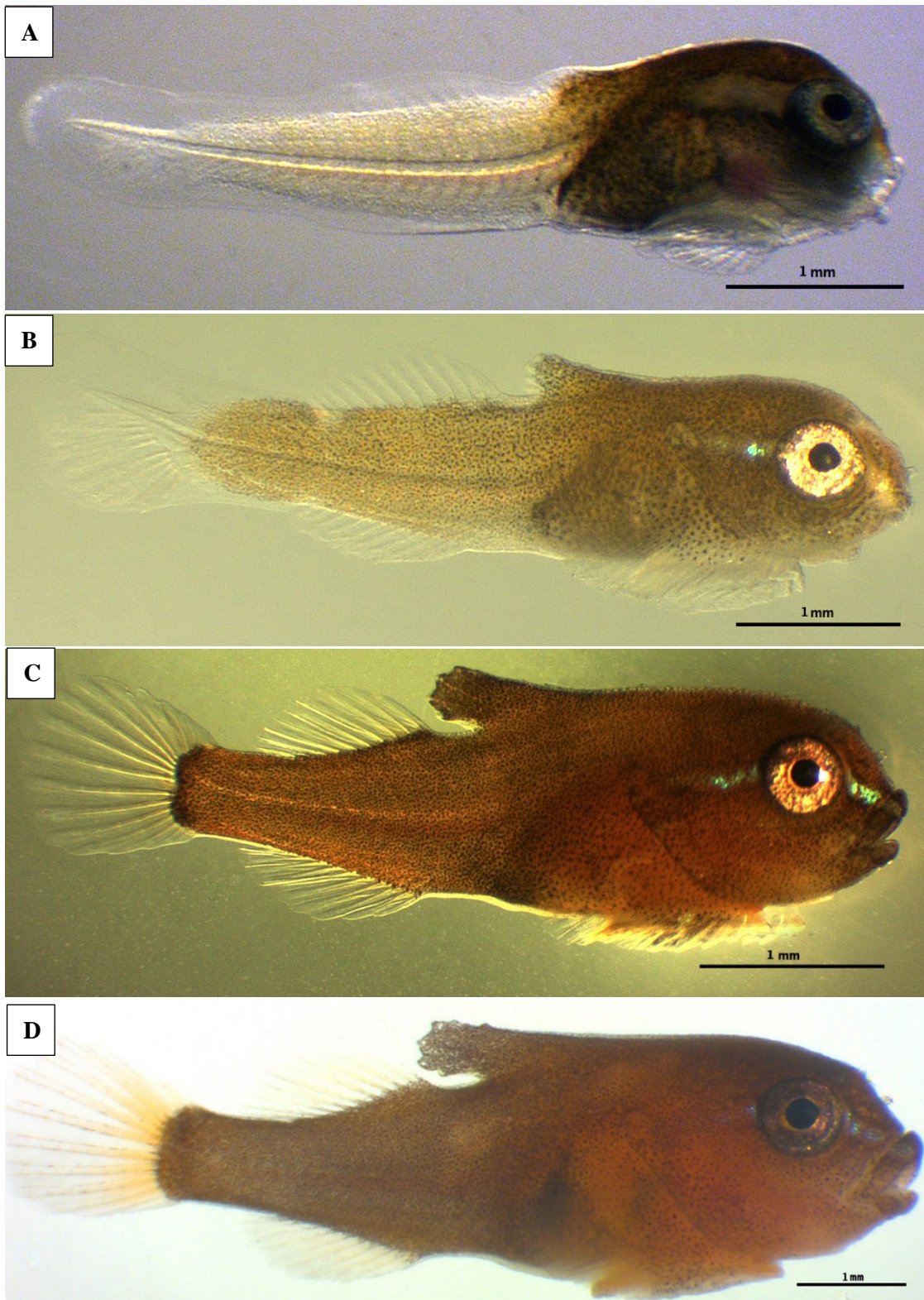


Figur 6-5: Gjennomsnittlig overleving hos rognkjeks i startfôringsforsøket (0-35 dph). Gjennomsnittlig overlevelse (%) er basert på snittet av tre replikater av hver behandling. Signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom behandlinger på prøvetidspunkt er vist med ulike bokstaver. Gjennomsnitt med \pm standardfeil (SE) er satt inn for prøvetakingsdagene.

Både fôrtyper og fôringsregimer påvirket rognkjeks-larvenes vekst (SL og DW), se Figur 6-6A og B. Larvenes tørrvekt i forhold til SL viste en eksponentiell vekst i forhold til standard lengde, uavhengig av fôrregime ($r^2=0.97$, Fig. 6-6C). Ved sampling på dag 34 var det ingen signifikant forskjell i DW og SL mellom larver i Art- og Cir-gruppene ($n=15$ per kar). Imidlertid viste et større utvalg ($n=250$ per kar) samlet ved avslutningen på dag 35 at Art-larvene hadde signifikant større SL enn Cir-larvene (Fig. 6-6A, rød stiplet strek). Larvene fôret med Artemia hadde med andre ord også signifikant høyere somatisk vekt enn de andre larvegruppene gjennom hele forsøket. Larver fôret med både Artemia og cirripedier hadde signifikant større larver enn i de øvrige behandlingene. Ved dag 9 etter klekking hadde alle larver, og særlig Cir-larvene lav vekstrate (Fig. 6-6D). Etter 21 dager var larvene som hadde fått tørrfôr (FD og Cop/FD) signifikant mindre og med dårligere vekstrate enn de som var fôret med cirripedier (Cir og Cop/Cir), Figur 6-6A og D. Etter 35 dager, hvor også Art, Cir, og Cop/Cir-larvene var tilvennet formulert fôr, hadde Cir-larvene fortsatt signifikant lavere SL enn Art-larvene, men Art-larvene viste en signifikant dårligere daglig tilvekst (DWI) enn Cir- og Cop/FD-behandlingene i perioden 21-34 dager etter klekking når tørrfôr ble introdusert. DWI var best for larvegruppene Cop/FD og Cir i denne siste perioden, mens samlet daglig tilvekst gjennom hele perioden var signifikant best hos larver fôret med Artemia (Art) og cirripedier (Cir). Plansje 6-1 viser utviklingen av rognkjeks-larvene fra Artemia-gruppen gjennom forsøket.



Figur 6-6: Vekst hos rognkjeks larver ved ulike startføringsregimer. (A) Gjennomsnittlig standardlengde (mm larve⁻¹) for rognkjeks 2-34 og 35 dph. Etter avslutning av forsøket (35 dph) ble 250 fisk fra hvert kar målt, noe som viste at Art-larver var signifikant større enn de andre larvegruppene (B) Gjennomsnittlig tørrvekt (mg larve⁻¹) hos rognkjeks 2-34 dph. (C) Korrelasjon mellom gjennomsnittlig standardlengde og tørrvekt per individ gjennom hele startføringsforsøket (2-34 dph); Pearson correlation: $r=0.970$ (alle behandlinger). (D) Gjennomsnittlig daglig vektøkning (% dag⁻¹) hos rognkjeks 2-34 dph ved spesifikke tidsintervaller. Den vertikale sorte linjen skiller de ulike etterfølgende intervallene i forsøksperioden og data for hele forsøksperioden samlet. Grå stiplede linjer i A og B indikerer tilvenning fra A. *tonsa* til enten formulert fôr for Cop/FD gruppen, eller til Cirripedia for Cop/Cir gruppen. Sorte stiplede linjer indikerer tilvenning til formulert fôr for alle grupper. Signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom behandlinger på en gitt dag etter klekking er indikert med ulike bokstaver. Feillinjer indikerer \pm standardfeil (SE).



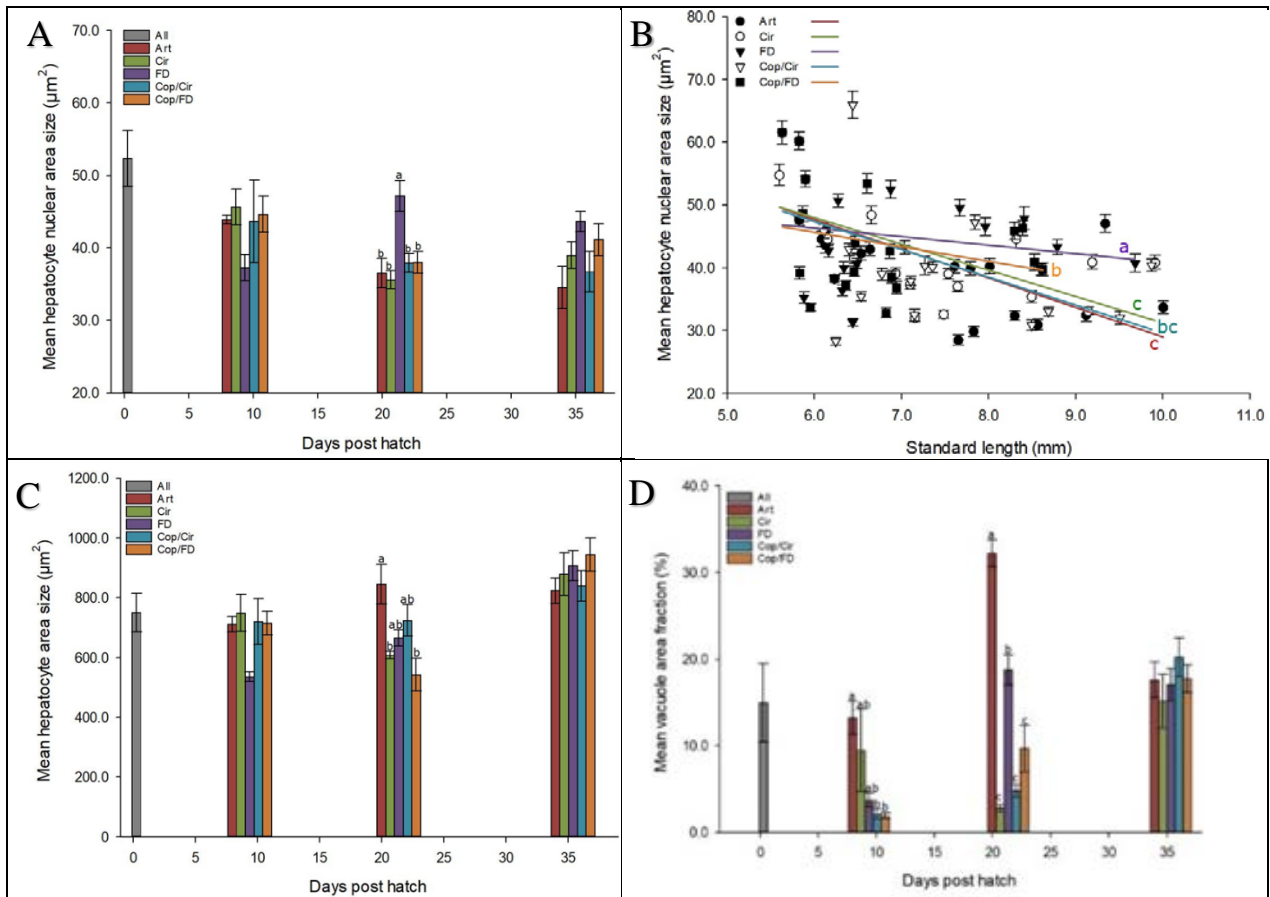
Plansje 1-1. Utvikling av rognkjeks-larver (*C. lumpus*) fra 2-33 dager etter klekking. A) to dager gammel, rett før fôring startet; B) 9 dager etter klekking C) 21 dager og D) 33 dager etter klekking. Alle larvene er fra Artemia-gruppen.

6.2.2 Leverhistologi

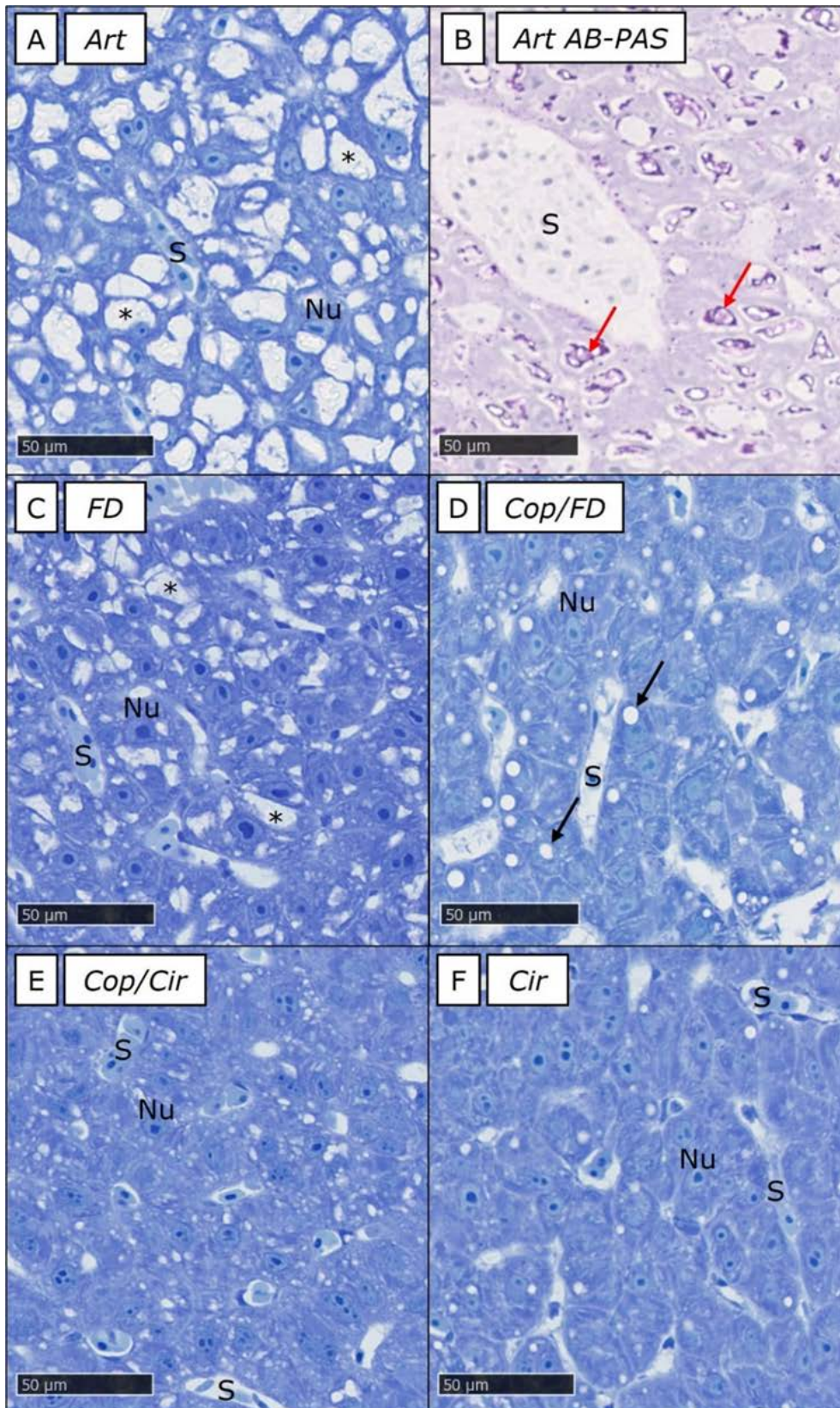
Larvenes leverceller (hepatocytter) 2 dager etter klekking var flerkantede og var arrangert rundt en sentral vene, med sinusoider og galleganger spredt imellom. Celle-kjernene var nesten runde, og i leveren hos flere larver var cytoplasma fylt med usymmetriske vakuoler, som skjøv kjernen ut mot periferien av hepatocytten. Gjennomsnittlig størrelse (=snittareal) av levercellene var ca. $800 \mu\text{m}^2$, og cellestørrelse og gjennomsnittlig vakuoleinnhold (ca. 18 %) var ikke signifikant forskjellig mellom 2 og 35 dager etter klekking (Fig. 6-7A).

I *Artemia*-larvene var gjennomsnittlig vakuole-innhold stabilt rundt 15 % i perioden 2-9 dager etter klekking, ved dag 21 hadde det økt til 30 % og var signifikant høyere enn hos de andre larvegruppene; og etter tilvenning til formulert fôr var vakuolefraksjonen redusert til 18 % ved dag 35. I *Cir*-larvene ble vakuoleinnholdet redusert til 10 % ved 9 dager etter klekking, og nådde laveste nivå på 3 % ved 21 dager etter klekking. De andre larvegruppene hadde også synkende andel vakuoler i levercellene med 3 % ved dag 9, med noe økning for de larvene som hadde fått formulert fôr (FD- og Cop/FD-gruppene) ved dag 21. Ved dag 35 etter klekking, da alle larvene var tilvent formulert fôr, var graden av vakuolisering veldig lik i alle larvegruppene. Den største forskjellen i vakuolisering mellom larvegruppene var ved 21 dager etter klekking. En svak negativ korrelasjon mellom gjennomsnittlig kjernestørrelse i levercellene og larvenes SL ble funnet for alle larvegruppene (Fig. 6-7B).

Det var et mønster i vakuoliseringen av leveren, hvor det ble observert mer glykogen-holdige vakuoler i larvene i starten av forsøket (2 og 9 dager etter klekking), mens mer lipid-liknende vakuoler var observert i siste del av forsøket (21 og 35 dager etter klekking). Etter 21 dager hadde *Art*-larvene høyeste grad av vakuolisering med glykogen-holdige vakuoler (Fig. 6-7B og 6-8B). Larvene fôret med formulert fôr (FD-gruppen) hadde tilsvarende glykogen-holdige vakuoler (Fig. 6-7B og 6-8C), men ikke så store og utbredte som i *Art*-larvene. Imidlertid hadde Cop/FD-larvene nå en litt økende vakuolisering med lipid-liknende vakuoler (Fig. 6-8D). *Cir*- og Cop/*Cir*-larvene var nærmest tomme for vakuoler (Fig. 6-8E og F), men de som ble observert så ut til å være lipidholdige. Ved dag 35 etter klekking hadde alle larver relativt lik og lipidliknende vakuolisering i leveren.



Figur 6-7: Gjennomsnittlig levercelle-størrelse (A, B og C) og (D) gjennomsnittlig lever-vakuolisering (%) hos rognkjekslarver 2-35 dph ($n=5$ per søyle). Cellestørrelsen ble estimert i hver larve ved å dele analysert leverareal med antall observerte cellekjerner. Signifikante forskjeller ($p<0.05$) mellom behandlinger ved en gitt dag etter klekking er indikert med ulike bokstaver. Feillinjer indikerer \pm standardfeil (SE).

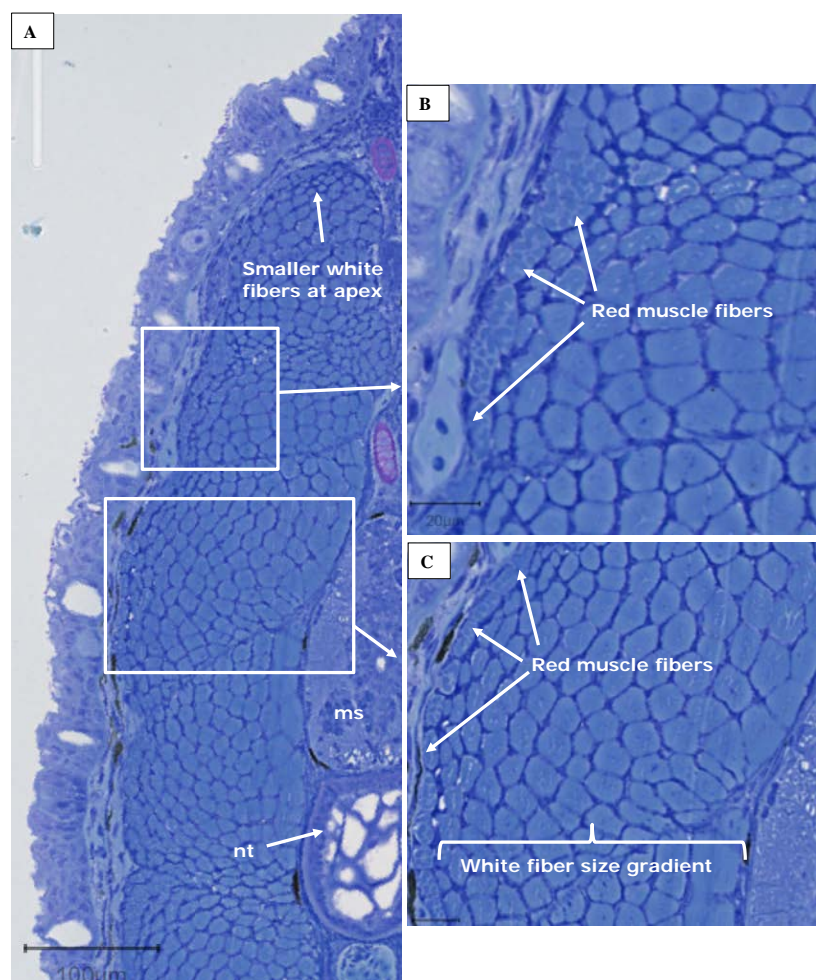


Figur 6-8: Leverstruktur hos rognkjeks larver fra alle behandlingene ved dag 21 etter klekking, med larver fra A) Art, B) Art, C) FD, D) Cop/FD, E) Cop/Cir og F) Cir behandlingene. Forkortelser og markører: Nu=kjerne, S=sinusoid, *=vakuoler, sort pil=lipid-vakuoler, rød pil=glykogen vakuoler. Snittene ble farget med toluidinblått, bortsett fra Art-larven i B) som ble farget med Alcian Blue- Periodic Acid Schiff (ABPAS).

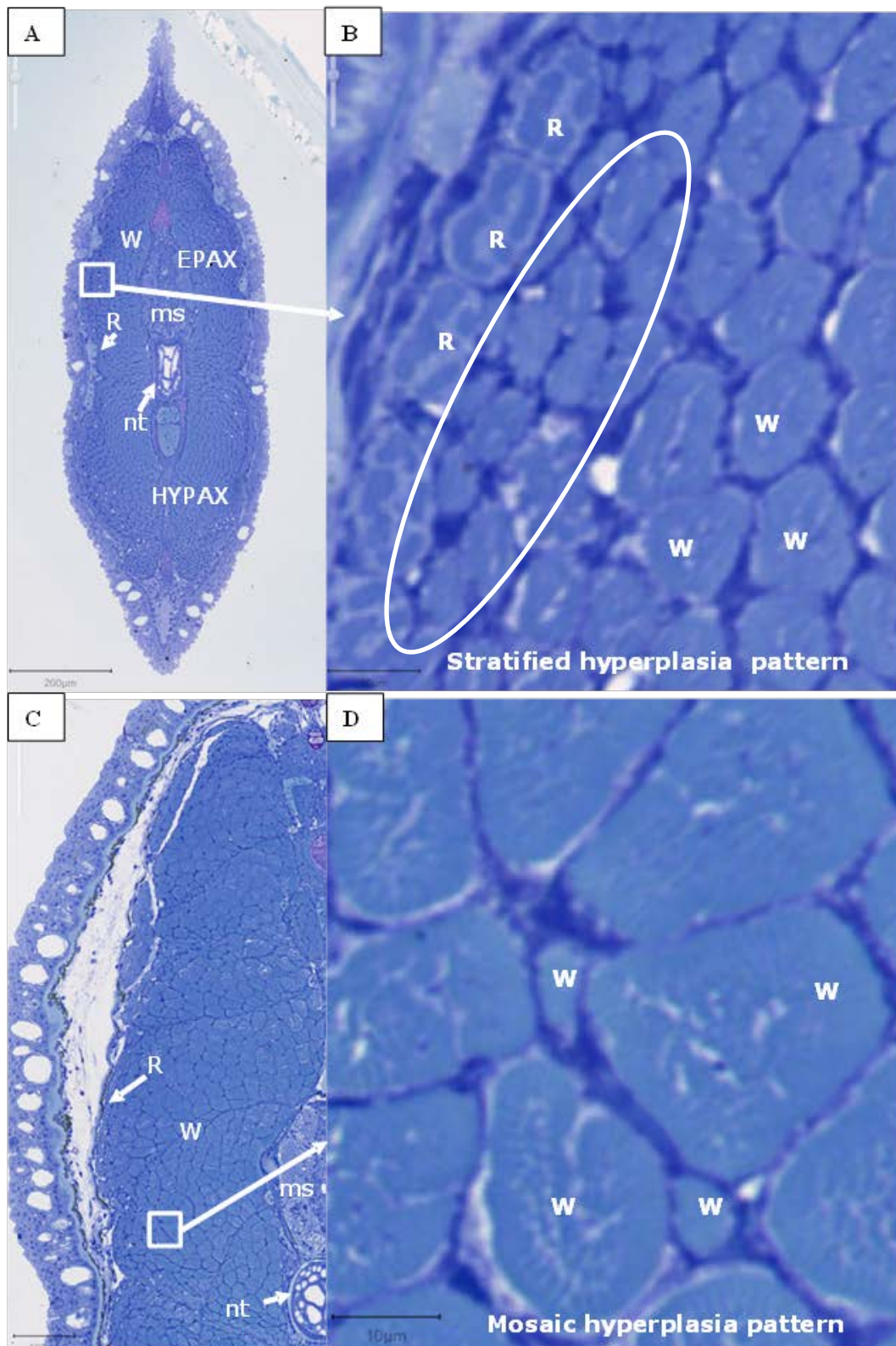
6.2.3 Larvenes muskelvekst

Vi fant ingen effekt fra forskjellige startfôrings-regimer på larvenes muskel-morfologi. Da larvene begynte å spise (2 dager etter klekking, ca. 5,8 mm SL), var størrelsen på hvite muskelfibre størst inne ved ryggraden, og ble gradvis mindre utover mot hudoverflaten (Fig. 6-9 og 6-10A og B). Det viste at stratifisert hyperplasi (områder med nye muskelfibre, typisk for tidlige stadier) hadde startet allerede før klekking, og økningen av røde nye muskelfibre var særlig sterk etter tilvenningen til formulert fôr (21 – 35 dager etter klekking). Ved 35 dager etter klekking (8-9 mm SL) var mellom 20 og 100 nye hvite muskelfibre observert mellom andre muskelfibre, og indikerte at mosaisk muskelvekst (voksen type vekst) var etablert i myotomen (Fig. 6-10C og D). Ved 5,5 – 10 mm SL, økte antallet og størrelsen (hyperplasi og hypertrofi) på røde og hvite muskelfibre eksponentielt i forhold til SL. Hyperplasi i hvit muskel og hypertrofi i rød muskel økte kontinuerlig for larvene i dette størrelsesområdet (Fig. 6-11), mens hypertrofi i hvit muskel og hyperplasi i rød muskel var ganske konstant for SL 5,5 - 7,5 mm.

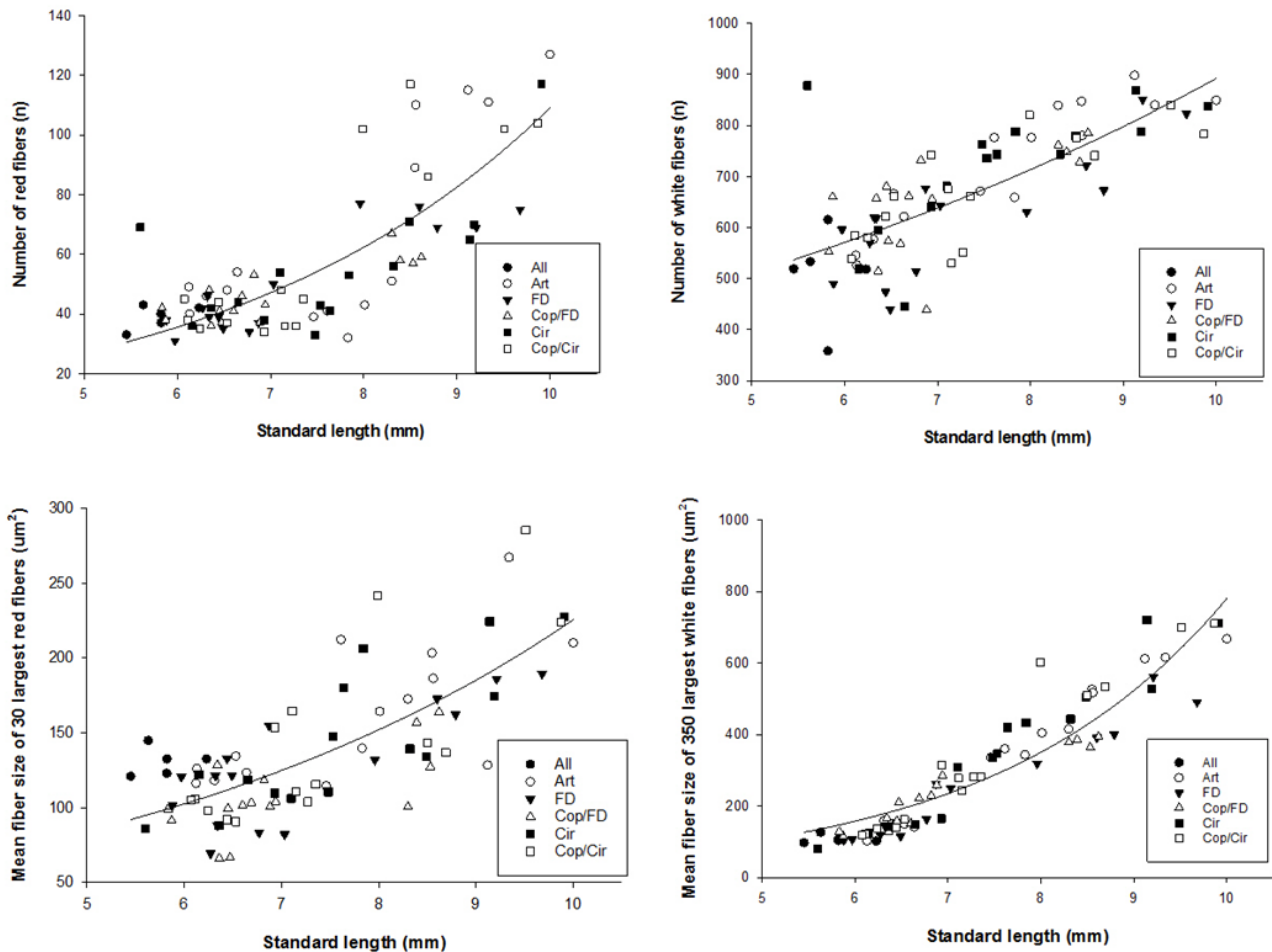
Rognkjeks-larver som var fôret med kun FD eller Cop/FD var signifikant mindre og hadde mindre muskelareal enn andre larvegrupper ved 21 dager etter klekking. Denne negative effekten på muskelvekst var synlig som mindre hyperplasi i rød muskel og mindre hypertrofi i hvit muskel enn hos andre larver ved dag 35. Resultatene viste en tydelig sammenheng mellom larvenes muskelvekstmønstre og larvens somatiske vekst, og det var ingen signifikant forskjell mellom larvegruppene i forhold til larvestørrelse.



Figur 6-9: Øvre kvadrant av myotom med hvit og rød muskulatur, rett bak anus for rognkjeks-larver. A) Formen til en myotom ved 6,3 mm SL (9 dph); B) røde muskelfibre i den øvre delen av myotomen ved 6,3 mm SL C) størrelsesgradienten hos hvite fibre i myotomen ved 6,3 mm SL. Forkortelser: nt= notochord; ms= medulla spinalis; W= hvite muskelfibre; R, røde muskelfibre. Målestokk: 100 µm (A) og 20 µm (B, C).



Figur 6-10: (A): Tverrgående snitt av skjelettmuskler rett bak anus hos *C. lumpus* larver (2 dager etter klekking; 6,2 mm SL). (B): Område som viser *stratifisert hyperplasi* (vekstsone) med nye hvite muskelfibre ved 6,2 mm SL; (C) i øvre kvadrant av myotomen ved 8,5 mm SL (35 dager etter klekking) med og (D) *mosaisk hyperplasi* (vekst av nye hvite muskelfibre mellom eksisterende fibre). Forkortelser: EPAX= øvre kvadrant av myotomen; HYPAX= nedre kvadrant av myotomen; nt= notochord; ms= medulla spinalis; W=hvite muskelfibre; R, røde muskelfibre. Målestokk: 10 μm i B og D, 200 μm i A og 100 μm i C.



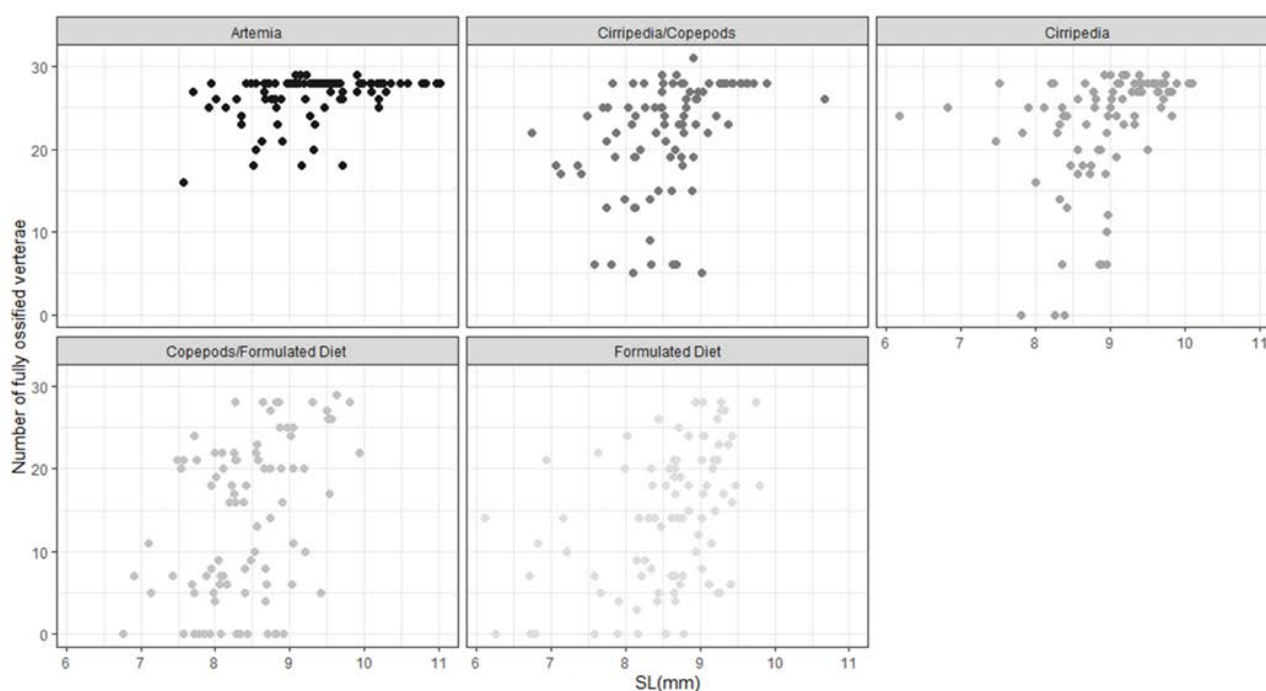
Figur 6-11: Forholdet mellom rød og hvit muskelvekst og standardlengde hos rognkjekslarver, med hyperplasi (økning i antall muskelfibre) i de to øverste, og hypertrofi (målt som størrelsen av de største 30 røde og 350 hvite muskelfibre). Hvert punkt i grafen representerer en larve ved 2 (n=5), 9,21 og 35 dph (n=5 per behandling). Eksponentielle regresjonslinjer ble lagt til: $r^2 = 0.6545$ for antallet røde fibre; $r^2 = 0.5563$ for den gjennomsnittlige fiberstørrelsen i røde muskler, $r^2 = 0.5811$ for antallet hvite fibre; og $r^2 = 0.8717$ for den gjennomsnittlige fiberstørrelsen i hvite muskler.

6.2.4 Beinutvikling

Rognkjekslarvene hadde 28 ryggvirvler. Ved avslutningen av forsøket, var Art-larvene signifikant større enn de andre larvene, beindannelsen i ryggvirvlene var langt sterkere, og alle virvlene hos disse larvene viste beindannelse (Tab. 6-2). Begge gruppene som hadde fått cirripedier var ganske like, og de hadde signifikant flere ryggvirvler med beinutvikling enn larvene som hadde fått hoppekreps og/eller formulert før. Disse to sistnevnte gruppene hadde de minste larvene og den dårligste beinutviklingen av alle gruppene. I de fleste Artemia-larvene mellom 8-9 mm SL var beinutviklingen i gang i de fleste ryggvirvlene, mens beindannelsen var svært variabel i alle de andre larvegruppene i samme størrelsesintervall (Fig. 6-12). Score for beindannelse i finner var også langt bedre i Art-larvene enn i de andre gruppene, etterfulgt av Cir- og Cop/Cir-larvene (Tab. 6-3).

Tabell 6-2: Beinutvikling i rognkjeks 34 dager etter klekking. Data er gitt som antall ryggvirvler \pm SD.

Behandling	n	SL (mm)	Fully ossified	Compact	Partly	Transparent	Antall ryggvirvler
Art	90	9,31 \pm 0,56a	26,5 \pm 2,8a	1,46 \pm 2,7	0,02 \pm 0,21	0,00 \pm 0,0	28 \pm 0,62a
Cir	89	9,09 \pm 0,54b	22,8 \pm 7,2b	5,06 \pm 7,0	0,124 \pm 0,5	0,00 \pm 0,0	28 \pm 0,55a
FD	90	8,47 \pm 0,73c	13,8 \pm 8,4c	11,8 \pm 7,4	2,07 \pm 1,8	0,42 \pm 0,69	28,1 \pm 0,57a
Cop/FD	90	8,40 \pm 0,75c	13,6 \pm 9,6c	12,8 \pm 8,6	1,38 \pm 2,7	0,267 \pm 0,6	28,1 \pm 0,47 a
Cop/Cir	90	8,54 \pm 0,69c	22,1 \pm 6,7b	5,7 \pm 6,2	0,189 \pm 0,7	0,03 \pm 0,24	28 \pm 0,66a


Figur 6-12: Antall fullt forbeinede ryggvirvler hos rognkjeks larver på dag 34 etter klekking etter fôring med fem ulike fôringsregimer.

Tabell 6-3: Forbeining av hale- og dorsalfinner i rognkjeks larver 34 dager etter klekking. Signifikante forskjeller i finneforbeining er angitt med ulike bokstaver. Høyeste score for hver finne er uthevet.

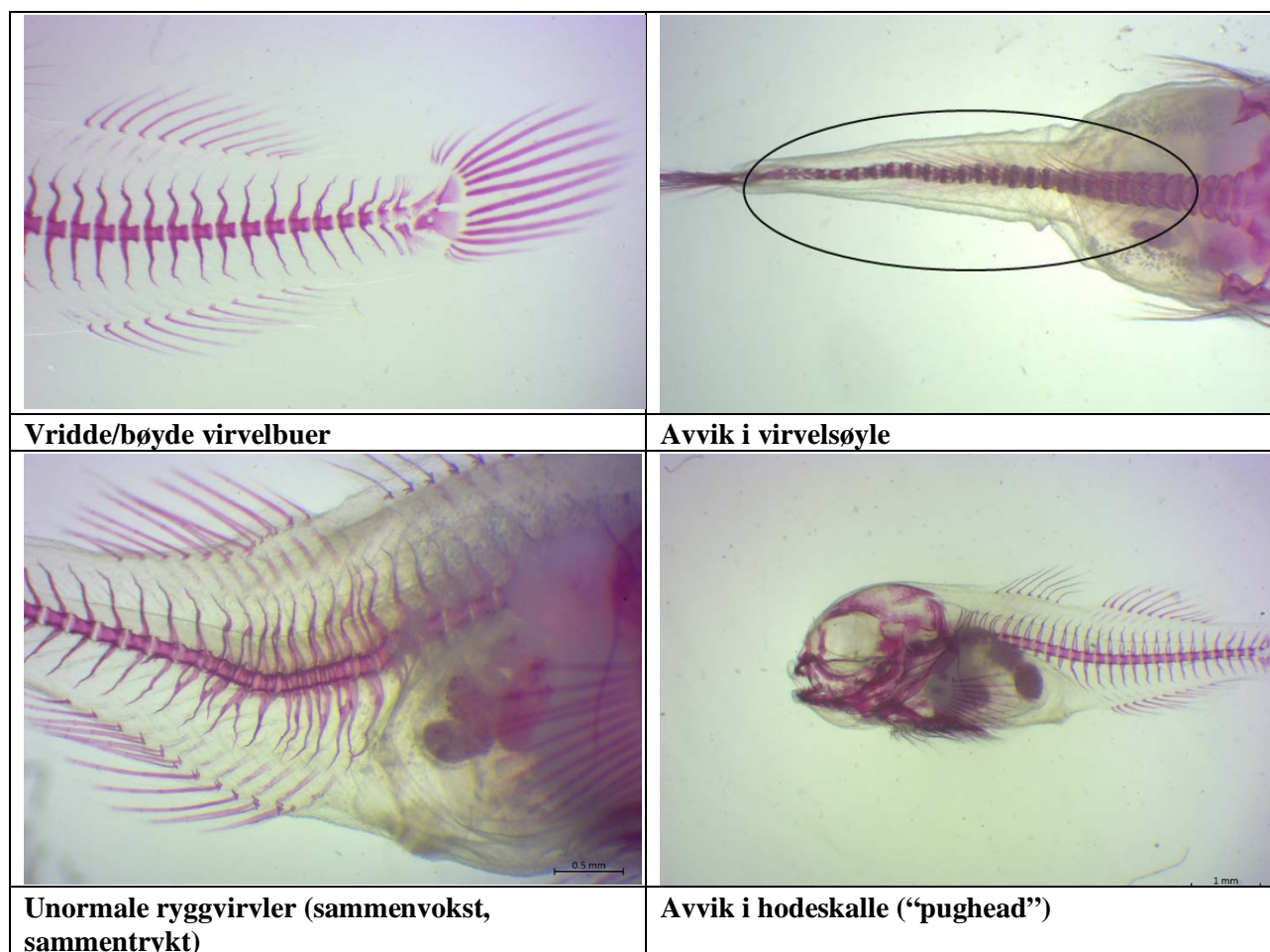
Behandling	Halefinne score				Ryggfinne score						Gattfinne score		
	HY		LA		Framre			Bakre					
	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Art	1,1 ^a	98,9	51,1 ^a	48,9	0	64,4 ^a	35,6	0	78,9 ^a	21,1	0	88,9 ^a	11,1
Cir	9,0 ^b	91,0	70,8 ^b	29,2	1,1	84,3 ^a	14,6	1,1 ^b	89,9	9,0	2,3	93,3 ^a	4,5
FD	68,9 ^c	31,1	100 ^c	0	5,6	94,4 ^b	0	15,6 ^c	83,3	1,1	28,9	71,1 ^b	0
Cop/FD	44,4 ^d	55,6	94,4 ^d	5,6	10	87,8 ^b	2,2	15,6 ^{bc}	81,1	3,3	24,4	74,4 ^b	1,1
Cop/Cir	14,4 ^b	85,6	81,1 ^b	18,9	1,1	95,6 ^b	4,4	0 ^b	94,4	5,6	2,2	96,7 ^a	1,1

Avvik/deformiteter i beinutviklingen:

Veldig få larver hadde alvorlige deformiteter, og det mest utbredte avviket var såkalte vridde og/eller bøydde virvelbuer (Tab. 6-4). Artemia-larvene hadde en signifikant høyere andel normalt utviklede larver enn de andre gruppene, med ca. 77 % av larvene uten noen observerte avvik i beindannelsen. Larver føret med cirripedier (Cir- og Cop/Cir-) fulgte etter, mens Cop- og FD-larver hadde signifikant høyere andel av larver med avvik i virvelbuene (se også Fig. 6-13).

Tabell 6-4.: Forbeinede rognkjeks-larver ved dag 34 etter klekking, med gjennomsnittlig % uregelmessigheter etter fôring med ulike startfôr (n=90). Signifikante forskjeller mellom gruppene er gitt som ulike bokstaver etter gruppe-betegnelsene i venstre kolonne.

Behandling - gruppe	Normale larver	Vridde/bøyde virvelbuer	Avvik i virvelsøyale	Avvik i hodeskalle
	Prosent (%) av larver			
Art a	76,7	20,0	0	3,3
Cir b	31,5	64,0	4,5	1,2
FD c	1,1	96,7	2,2	0
Cop/FD c	1,1	94,4	3,3	1,1
Cop/Cir b	24,4	73,3	2,2	0



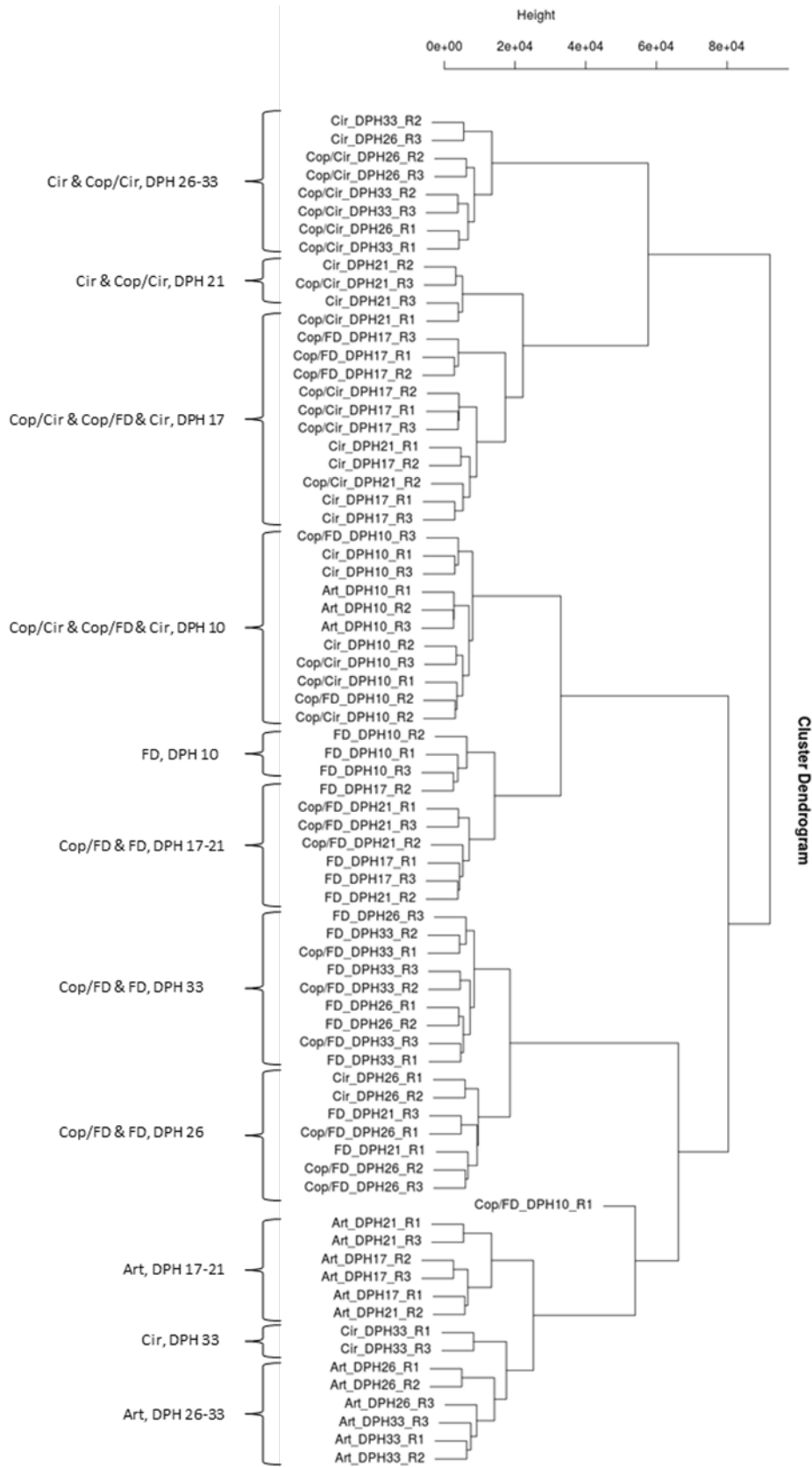
Figur 6-13: Uregelmessigheter i skjelett hos 34 dager gamle rognkjeks-larver- Den mest vanlige uregelmessigheten var vridde/bøyde virvler (se også Tab. 6-4).

6.2.5 Genuttrykk

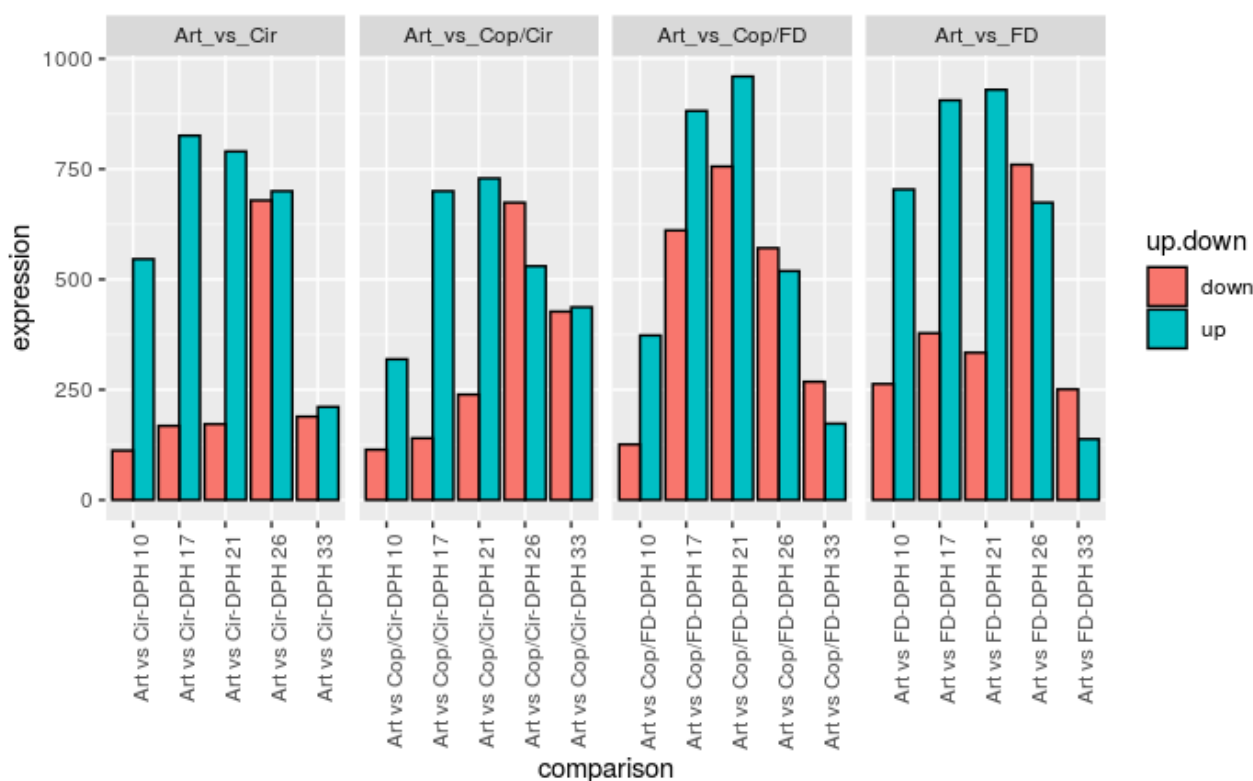
I forhold til den totale gen-ekspressjons-profilen, ble ulike prøver gruppert som vist i Figur 6-14. Ved 10 dager etter klekking, ble alle larvene gruppert sammen, bortsett fra FD-larvene, som ble gruppert i en nærliggende under-gruppe. Resultatene tydet på svært lik genekspressjonsprofil for alle behandlinger på dette tidspunktet. Etter dag 10 ble ulike larver fra de ulike behandlingene gruppert forskjellig, som følge av både tidsforløp og fôrregime (behandling).

Etter 10 dager dannet Artemia-larvene en helt separat gruppe (også inkludert to Cir-prøver fra 33 dager etter klekking), noe som indikerte en ganske forskjellig genekspressjonsprofil fra de øvrige fôr-regimene. Ved 17 dager etter klekking var Cop/Cir-, Cop/FD- og Cir-larvene gruppert sammen, noe som viser ganske lik genekspressjons-profil. Ved det tidspunktet fikk larvene hoppekreps eller cirripedier, og Cop/FD hadde akkurat begynt å få formulert fôr. I samme periode blir FD-larvene gruppert for seg, noe som indikerer en ganske forskjellig ekspressjonsprofil sammenlignet med de andre gruppene. Allerede på dag 21 etter klekking blir imidlertid FD-larvene gruppert sammen med Cop/FD ettersom genekspressjonsprofilen blir mer lik for de larvene som får formulert fôr. Likeledes forblir Cop/Cir og Cir-larvene gruppert sammen ved 21 dager, trolig også en konsekvens av at samme fôrtype tilbys. Det samme mønsteret vises i perioden 26-33 dager etter klekking, hvor Cop/Cir og Cir-larver deler ganske lik genekspressjonsprofil, nå som de også har fått samme formulert fôr siden 21 dager etter klekking. Til forskjell, hadde Cop/FD- og FD-larvene fortsatt ganske lik genekspressjonsprofil og ble gruppert annerledes enn de forrige nevnte gruppene. Dette kan tyde på at den tidligste fôringen med formulert fôr til Cop/FD (fra 9 dager etter klekking) ga denne larvegruppen en annen retning på utviklingen av genekspressjonen, sammenliknet med Cop/Cir-larvene som også startet med hoppekreps.

For den differensielle genekspressjons-analysen ble Artemia-larvene brukt som utgangspunkt for sammenligningene (kontroll/best somatisk vekst), selv om de fleste rognkjeksprodusenter i dag bruker tørrfôr i sin produksjon. Larver fra alle behandlinger ble derfor sammenlignet med Artemia-larvene. Figur 6-15 viser totalt antall av differensielt uttrykte gener mellom behandlinger og kontroll. Forskjellene i genuttrykk mellom larvegruppene er minst for alle ved 10 dager etter klekking, og øker noe ved 17 dager, når et maksimum ved 21-26 dager, og blir mindre igjen ved 33 dager. Dette er likt for alle behandlinger når de sammenlignes med Artemia-larvene. Dette indikerer at forskjellige gener slås på og av på grunn av ulike fôrtyper, men mot slutten av forsøket ser det likevel ut til at den differensielt uttrykte genprofilen er mindre uttrykt ved slutten av forsøket.

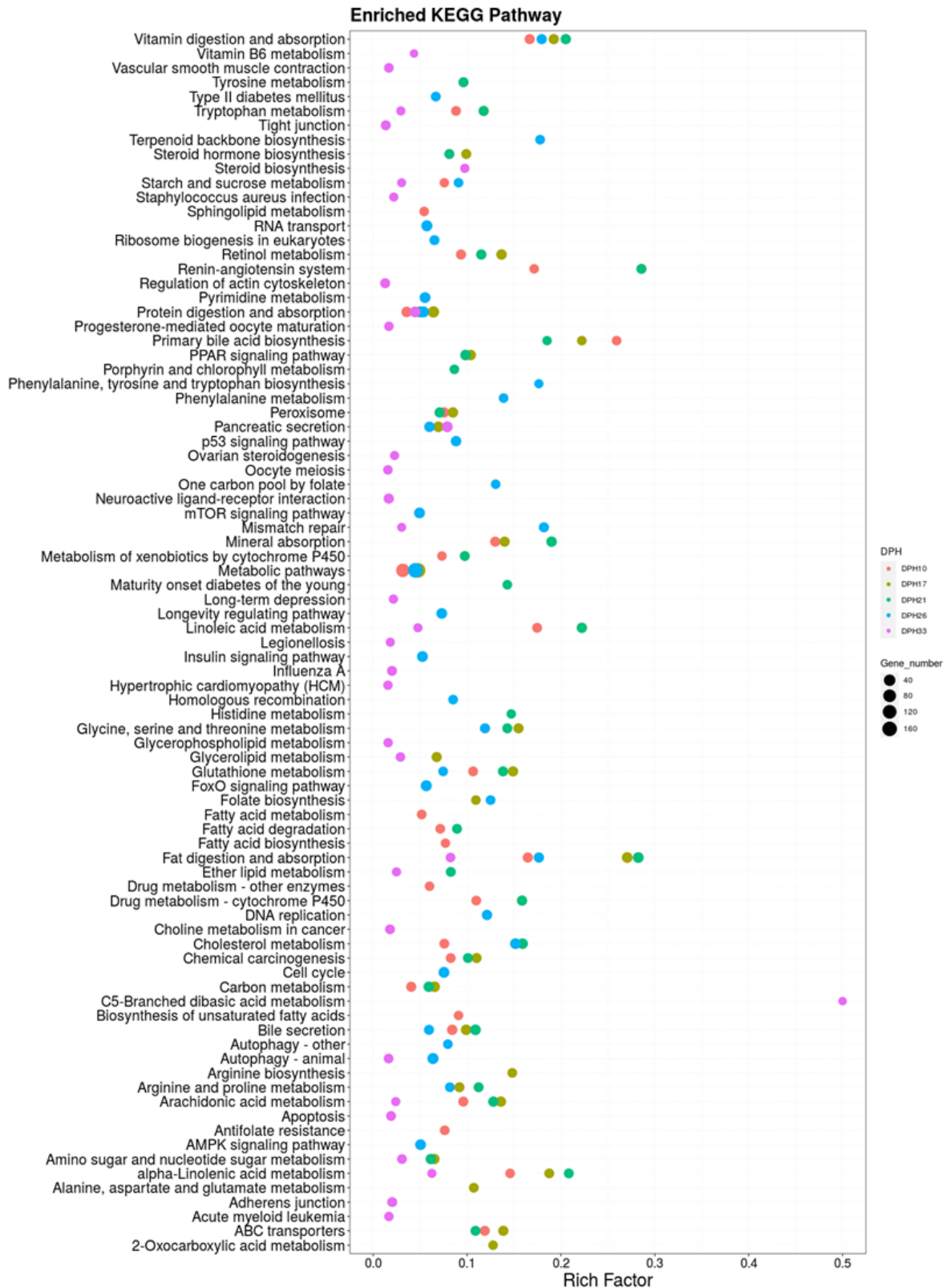


Figur 6-14. Klyngeanalyse for alle samples av rognkjekslarver basert på genekspressjonsprofil.



Figur 6-15: Forskjeller i genuttrykk i løpet av forsøket hos rognkjeks larver gitt fire forskjellige fôringsregimer. Søylen viser antall gener som er enten opp- eller nedregulert for de ulike behandlingene sammenliknet med Art-behandlingen (kontroll).

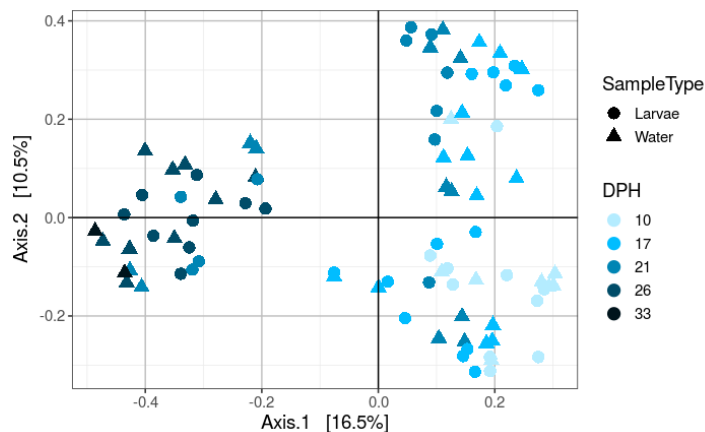
Oversikter over “anrikede KEGG metabolske reaksjoner” (Enriched KEGG pathways) viste en rekke forskjeller i responser mellom de ulike behandlingene og ulike dager etter klekking. Disse resultatene er fortsatt til vurdering og ikke ferdig for presentasjon. Som eksempel viser Figur 6-16 resultatene for sammenligningen mellom Cir- og Art-larvene. De mest oppregulerte gener var blant annet involvert i vitamin fordøyelse og absorpsjon, gallesyre biosyntese, mineral absorpsjon, fett-fordøyelse, -absorpsjon, og -metabolisme. Se også Appendiks E - *KEGG Pathway map for lumpfish larvae* for illustrasjon av endringer i genuttrykk mellom behandlinger over tid. Disse data er fortsatt til vurdering.



Figur 6-16: KEGG Pathway Map of differential gene expression ("anrikede KEGG metaboliske reaksjoner") hos rognkjeks larver i Cir- og Art- behandlingen i løpet av startfôringsforsøket. x-aksen representerer oppreguleringsfaktoren, y-aksen representerer pathway/reaksjon. Fargen indikerer dager etter klekking, og punktstørrelsen indikerer antall gener som er involvert. "Rich Factor" er verdien av oppreguleringsfaktoren, som er en kvotient av antall gener i forhold til totalt antall gener. Jo større verdi, jo mer signifikant oppregulering.

6.2.6 Mikrobiologi

Den fulle rapporten om mikrobiologi er presentert i Appendiks B - *Rognkjeks (Cyclopterus lumpus) start-feeding experiment microbiome analysis report*. Her gis kun et sammendrag i det følgende. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom vann og larver når alle behandlinger og tidsforløp ble tatt i betraktning. Larve-prøvene viste signifikant høyere mikrobiell diversitet enn vann-prøvene. Dette indikerte at vann-prøvene var dominert av færre bakteriegrupper sammenlignet med larvene. For vannets mikrobielle samfunn viste Art-behandlingen en signifikant høyere mikrobiell artsrikdom enn Cir- og FD-behandlingen, men var lik Cop-behandlingene. Vi fant signifikante forskjeller mellom larvenes og vannets mikrobiota, og det var også en forskjell i forhold til tidsforløpet. Tre grupper ble observert (Fig. 6-17), hvor 10 og 17 dager etter klekking (nedre høyre kvadrant), 17 og 21 dager etter klekking (høyre øvre kvadrant), og 26 og 33 dager etter klekking (venstre side) viste like sammensetninger.



Figur 6-17. Beta-diversitet (jfr. Appendiks B) i det mikrobielle samfunnet hos larver og vann, vist ved sample-type (form) og ved samplingstidspunkt (farge). Hvert punkt representerer den totale mikrobielle samfunnsstrukturen i en prøve, plassert i et 2D rom. Hvis to prøver hadde vært identiske ville de overlappet perfekt i plottet. Jo mer forskjellige to prøver er, jo lengre fra hverandre vil de vises i plottet.

6.3 Diskusjon

Startfôring med *Artemia* eller *CryoPlanktonLarge* mellom 2 – 21 dager etter klekking resulterte i større larver ved avslutningen av forsøket, sammenliknet med de som ble fôret med hoppekreps eller formulert fôr. For små, pelagiske fiskelarver som for eksempel torsk, kveite og berggyllt, har startfôring med zooplankton/hoppekreps generelt gitt mye bedre vekst og utvikling enn fôring med rotatorier og *Artemia* (Næss et al., 1995, Shields et al., 1999, Evjemo et al., 2003, Imsland et al., 2006, Koedijk et al., 2010, Busch et al., 2011, Øie et al., 2017). Disse effektene skyldes byttedyrenes sammensetning av både proteiner, lipider og mikronæringsstoffer. Hoppekreps inneholder ca. dobbelt så mye protein som rotatorier og *Artemia*, og dette er en av de viktigste årsakene til de store observerte vekstforskjellene hos torsk (Karlsen et al., 2015). I tillegg bidrar hoppekrepsens hurtige svømmemønstre til økt svømmeaktivitet hos torskelarvene, som igjen kan bidra til økt transport over membraner og mer effektiv glukose-metabolisme (Vo et al., *submitted*) og mindre glykogen-lagring i leveren hos larver fôret med hoppekreps (Kjørsvik, *upublisert*). Overlevelsen var høy i alle gruppene gjennom hele forsøket, og ingen av førene førte derved til umiddelbare effekter i dødelighet.

Rognkjeks-larvene hadde, i motsetning til torsk og berggyllt, allerede ved klekking bygd opp et energilager av glykogen i leveren, noe som trolig gjør dem mer i stand til å tåle suboptimale ernærings-forhold de første dagene (Hoehne-Reitan and Kjørsvik, 2004). Disse plommesekk-larvene er større og har mer plommemasse som kan brukes til utvikling. De starter økningen og veksten av muskelfibre allerede før de begynner å spise, og den sensitive fasen med rask hyperplasi er derved ikke avhengig av startfôrets næringsverdi, slik som hos torsk (Vo et al., 2016; i trykk). Leverens næringsstatus (% vakuolisering i cellene) 10 dager etter klekking

viste tydelig at de opprinnelige energilagrene ble raskest oppbrukt hos larver som fikk formulert fôr og copepoder. Hos larver som fikk copepoder eller cirripedier til 21 dager etter klekking var det også lite vakuolisering i leveren hos disse, mens for de som ble tilvent formulert fôr ble det observert økning av leverens energilager. I perioden 2 – 21 dager etter klekking hadde Art-larvene den største somatiske veksten, og de hadde også de største glykogenlagrene i leveren. Denne høye veksten var trolig knyttet til at de hadde mer energi tilgjengelig for vekst, og ikke hadde begrenset glukose-metabolisme som hos torsk fôret med rotatorier og Artemia (Vo et al., *submitted*).

Artemia var også mye større enn de andre levendefôr-organismene, og den større biomassen med mer næringsstoffer var trolig mer energetisk riktig for rognkjeks-larver (Pastorok, 1981, Olsen, 2004). At Artemia-larvene fikk nedsatt vekst ved tilvenningen, tyder på at det er fôr-kvaliteten og ikke leverens energilager som er avgjørende for god vekst på dette tidspunktet.

Ved avslutning av forsøket var det ingen forskjell mellom larvegruppene i leverens næringsstatus, noe som samsvarte godt med larvenes daglige vektøkning. Også beinutviklingen var raskere hos de larvene som ble fôret med Artemia, og det var mindre avvik i beindannelsen enn hos larver fra de andre gruppene. Her var det dårligst resultat hos larver som ble fôret med copepoder (Cop/FD) og formulert fôr (FD). Disse resultatene viste at også hos rognkjeks er optimal fôring og energistatus de første dagene avgjørende for den videre veksten; de med dårligst vekst i de første 20 dagene kunne ikke ta igjen det tapte i løpet av forsøket.

I løpet av tilvenningen til formulert fôr (21 – 35 dager etter klekking), var det en nedgang i daglig tilvekst fra ca. 8 % til 4 % i larver fôret med Artemia, mens den forble på et høyere nivå (7 %) hos de som ble fôret med cirripedier. På dag 21 hadde Art-larvene høyeste somatiske vekt og størst energilagre, mens Cir-larvene hadde signifikant dårligere vekt og nesten ikke glykogenlagre i leveren. Dette tyder på at den økte veksten hos Cir-larvene ved tilvenning til formulert fôr ikke var avhengig av leverens energi-status, men at de kan ha fått bedre evne til glukose og lipid-metabolisme etter fôringen med cirripedier, slik at lagret energi var raskere tilgjengelig for vekst.

Genekspresjonsanalysene støtter disse antakelsene. Disse analysene viste at Art-larvene utviklet en egen profil sammenlignet med de andre behandlingene, bortsett fra 10 dager etter klekking. På det tidspunktet var det ingen forskjell mellom gruppene, noe som kan forklares med at alle larvene fortsatt brukte mye av plommemassen som energikilde. Plommemassen blir gradvis oppbrukt i løpet av de første 20 dagene etter klekking (Marthinsen, 2018), noe som kan være en viktig årsak til at alle hadde svært like genuttrykk på dag 10. Etter 10 dager ble det stadig større forskjeller i genekspresjonsprofilene, og generelt viste Cop/Cir- og Cir-larvene ganske like mønstre, og det gjorde også Cop/FD- og FD-larvene. Disse to gruppene viste imidlertid klare forskjeller mellom hverandre i genekspresjonsprofiler. Dette samsvarer godt med de forskjellige fôr-regimene, ettersom Art-larvene fikk kun Artemia til 21 dager etter klekking, mens Cir og Cop/Cir fikk samme fôr fra 9 dager etter klekking, noe som selekterte for like forhold mellom disse gruppene. Tilsvarende observasjoner ble funnet for Cop/FD- og FD-larvene, mens introduksjon av nye fôr ville bestemme den videre profilen og utviklingen av genekspresjonen.

Den differensielle genekspresjons-analysen (DEG) ble gjort ved å sammenligne larvene fra alle behandlingene med Artemia-larvene, ettersom dette fôret ga best vekst gjennom forsøket og også er industri-standard for mange arter. I løpet av forsøket ble det større forskjeller i genuttrykk mellom larvegruppene. Særlig i perioden 21 – 26 dager etter klekking økte den differensielle genekspresjonen, deretter ble alle larvegruppene mer like. Dette samsvarer med de ulike effektene på vekst som ble observert i tørrfôr-tilvenningsperioden for Art- og Cir-larvene, og at fôrene var like for alle etter dette.

DEG-analysen av «KEGG pathways» (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) viste flere signifikante og klart oppregulerte genreaksjoner, blant annet knyttet til vitamin fordøyelse og absorpsjon, gallesyre-biosyntese, mineral absorpsjon, linolsyre metabolisme, glycine, serin og threonine metabolisme, glutathion metabolisme, fettfordøyelse og absorpsjon, fettsyre-nedbrytning og -biosyntese, kolesterol metabolisme, arginine og proline metabolisme, og alpha-Linolsyre metabolisme.

Torskelarver som er føret med standard industri-dietten rotatorier og Artemia får også nedregulerte gener som er involvert i glukose metabolismen, sammenlignet med de som får copepoder (Penglase et al., 2015; Vo et al., *submitted*). Torskelarvene fikk imidlertid også dårligere vekst, mens rognkjekslarver vokste best med Artemia av de testede diettene. Andre forsøk med “largemouth bass” (Yu et al. 2019), viste at ekspresjonen av gener knyttet til fettsyresyntese og metabolisme ble oppregulert med dietter tilsatt ekstra gallesyrer. Dette forbedret glukose- og fett-metabolismen, og bidro til mindre energilagring i leveren og bedre vekst. Rognkjeks-larvene fikk en tidlig og rask vekst fra Artemia i den første fasen, men de som ble føret med cirripedier fikk muligens en tilsvarende effekt som fra copepoder på energimetabolismen, og de var muligens raskere i stand til å utnytte næringsstoffene i det formulerte føret enn Art-larvene. RNA-Seq kan gi flere svar på hvordan rognkjekslarvenes fordøyelse og metabolisme er påvirket av de ulike førene. Disse analysene har gitt et stort og svært sammensatt datasett, som krever ytterligere analyser og tolkninger som kan bidra til å kaste lys over larvenes utvikling og optimale fôr-regimer.

Både størrelsen og aktiviteten hos byttedyrene/fôrpartiklene kan spille en rolle for næringsopptak og vekst hos rognkjekslarvene. I naturen jakter rognkjekslarver og yngel på byttedyr med økende størrelse etter hvert som de vokser (Ingólfsson and Kristjánsson, 2002). Artemia var større enn de andre byttedyrene, og copepoder var trolig for små (og for raske?) selv for de minste rognkjekslarvene, slik at de ikke fikk nok energi til å vokse. Cirripedia-larvene hadde noenlunde samme størrelse som det største formulerte føret, og dette kan ha vært avgjørende for at de hadde best relativ tilvekst i tilvenningsfasen.

Videoobservasjoner av rognkjekslarvenes atferd viste også at Art-larvene svømte mer og orienterte seg mer enn de andre larvene ved 16 og 22 dager etter klekking, mens larver føret med cirripedier hadde flest vellykkede angrep mot både Artemia og cirripedier ved 28 dager etter klekking (Ibon Garcia-Gallego *upublisert*). Disse resultatene viser at cirripedier kan være et godt alternativ som levende startfôr til rognkjeks, og videre studier av mulig samføring med Artemia og cirripedier og av hvordan næringsinnholdet og partikkelstørrelse kan påvirke larvenes næringsopptak og vekst anbefales.

Den mikrobielle dynamikken viste en forskjell mellom fiskelarvene og sjøvannet i karene, og det kunne se ut som om tidsforløpet var en viktig faktor i utviklingen, ettersom perioden 26 – 30 dager etter klekking ga et mer unikt «fingeravtrykk» enn 10 – 21 dager etter klekking. I likhet med berggyltforsøket, så det ut til at vanngjennomstrømmingen påvirket etableringen av en spesifikk mikroflora. Dette resulterte i et mindre stabilt mikrobielt miljø ved at nye mikroorganismer ble tilført karene, men de ble også skylt ut, mens karet selv har et rikt miljø for at nye mikroorganismer kan få gode vilkår (Attramadal, Truong et al. 2014). Mikrobiota fra føret spilte også en rolle i utviklingen av det mikrobielle miljøet (se også Vadstein et al. 2018). Vannets mikrobiota var forskjellig mellom behandlingene, men ikke mellom de som startet med copepoder (Cop/FD og Cop/Cir) eller mellom Cir og Cop/Cir, antakelig som følge av førets rolle i utviklingen av systemets mikrobielle miljø.

Vi observerte at karmiljøet selekterte for bakterielle samfunn som koloniserte nyklekkede larver (Vadstein, Bergh et al. 2013). Fôrkomponentene vil ha liten påvirkning på larvenes mikrobielle sammensetning, sammenlignet med effekten av vannmiljøet, selv om det er påvist «shared OTUs» mellom larvens tarm og førets mikrobiom (Giatsis et al., 2015). I likhet med vannets mikrobiota, viste larvenes mikrobielle samfunn signifikant forskjellige mønstre mellom behandlingene. Likevel var det kun en svak signifikant sammenheng for behandlinger som startet (Cop/FD vs Cop/Cir) eller sluttet (Cop/Cir og FD vs Cop/FD) med samme fôr. Våre resultat tydet på at bakteriell kolonisering av larvene er aktivt styrt av samspillet mellom de mikrobielle samfunn i vann og i fôr, og vil med miljøforholdene ellers spille en viktig rolle utviklingen av larvenes mikrobiom.

6.4 Konklusjoner og anbefalinger

Å bruke anrikede Artemia som startfôr for rognkjeks ga en tidlig rask vekst og god utvikling av larvene, mens føring med cirripedier ga bedre relativ vekst i senere stadier og ved tilvenning til tørrfôr. Startføring med hoppekreps og formulert fôr ga det dårligste resultatet, og det kan se ut som om larvenes tidligste

næringsstatus med disse førtypene medførte at larvene fikk en varig effekt med dårligere vekst og utvikling gjennom fôringsforsøket. Vårt inntrykk var at larvene ikke fikk i seg nok energi med copepoder og formulert fôr, vi har tidligere sett at tarmen etter slik fôring hadde tydelig preg av sult (Marthinsen, 2018). De første fordøyelseskjertler ved dannelsen av mage ble funnet ca. 10 dager etter klekking, og mage med pylorus blindsekker var observert ved dag 34 (Marthinsen, 2018). Da er heller ikke formulert fôr optimalt fra starten.

Anrikede Artemia i samfôring med cirripedier kan være et mer optimalt første fôringsregime, da kan utbyttet av både energi fra Artemia og mulig mer optimalt næringsinnhold i cirripediene sikre en god vekst og utvikling. Dette vil imidlertid kreve ekstra ressurser i klekkeriene siden det må håndteres to arter samtidig. Næringsinnholdet i cirripediene bør kartlegges mer for evaluering av disse organismene som industrielt levendefôr. Svært tidlig tilvenning til formulert fôr (10 dager etter klekking) ga dårligere resultat enn om en starter tilvenningen fra 20 dager etter klekking. Våre resultater tyder på at næringskvaliteten for rognkjekslarvene de første 20 dagene var avgjørende for en god vekst fram til 35 dager etter klekking. Videre studier av effekter av samfôring og av hvordan næringsinnholdet og partikkelstørrelse kan påvirke larvenes næringsopptak, vekst og videre funksjonelle utvikling og atferd anbefales.

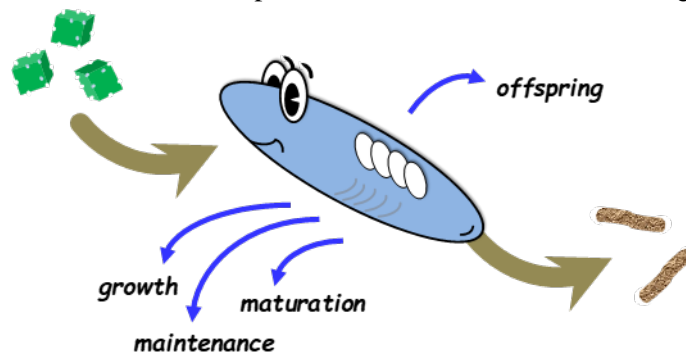
6.5 Referanser

- Attramadal, K.J., Truong, T.M.H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y. and Vadstein, O., 2014. RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture*, 432, pp.483-490. BUSCH, K. E. Busch, K.E.T., Peruzzi, S., Tønning, F. and Falk-Petersen, I.B., 2011. Effect of prey type and size on the growth, survival and pigmentation of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), pp.e595-e603. EVJEMO, J. O., REITAN, Evjemo, J.O., Reitan, K.I. and Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 227(1-4), pp.191-210. Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J. and Verdegem, M., 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific reports*, 5(1), pp.1-15. Hanssen, J.T., 2018. Effects on growth, survival and bone development from start feeding lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*) larvae with Artemia, copepods and formulated feed (Master's thesis, NTNU). Hoehne-Reitan, K. and Kjørsvik, E. 2004. Functional development of the exocrine pancreas and liver in teleost fish. In Govoni, J.J. (Ed.), *The Development of Form and Function in Fishes, and the Question of Larval Adaptation*. American Fisheries Society Symposium 40: 9-36. Imsland, A.K., Foss, A., Koedijk, R., Folkvord, A., Stefansson, S.O. and Jonassen, T.M., 2006. Short-and long-term differences in growth, feed conversion efficiency and deformities in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) started on rotifers or zooplankton. *Aquaculture Research*, 37(10), pp.1015-1027. Ingólfsson, A. and Kristjánsson, B.K., 2002. Diet of juvenile lumpsucker *Cyclopterus lumpus* (Cyclopteridae) in floating seaweed: effects of ontogeny and prey availability. *Copeia*, 2002(2), pp.472-476. Karlsen, Ø., van der Meeren, T., Rønnestad, I., Mangor-Jensen, A., Galloway, T.F., Kjørsvik, E. and Hamre, K., 2015. Copepods enhance nutritional status, growth and development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae—can we identify the underlying factors?. *PeerJ*, 3, p.e902. Kjørsvik, E., Pittman, K. and Pavlov, D., 2004. From fertilisation to the end of metamorphosis—functional development. *Culture of cold-water marine fish*, pp.204-278. Koedijk, R.M., Folkvord, A., Foss, A., Pittman, K., Stefansson, S.O., Handeland, S. and Imsland, A.K., 2010. The influence of first-feeding diet on the Atlantic cod *Gadus morhua* phenotype: survival, development and long-term consequences for growth. *Journal of Fish Biology*, 77(1), pp.1-19. López, D.A., López, B.A., Pham, C.K. and Isidro, E.J., 2012. Potency of barnacle in aquaculture industry. *Aquaculture*, pp.295-316. Lorange, P., Cook, R., Herrera, J., de Sola, L., Florin, A. and Papaconstantinou, C., 2015. *Cyclopterus lumpus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015 e. T18237406A45078284. Marthinsen, J.L., 2018. Ontogeny of the digestive system in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) larvae in relation to growth and start feeding diet—A histological and stereological approach (Master's thesis, NTNU). Næss, T., Germain-Henry, M. and Naas, K.E., 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of Artemia and wild zooplankton. *Aquaculture*, 130(2-3), pp.235-250. Pastorok, R.A., 1981. Prey vulnerability and size selection by Chaoborus larvae. *Ecology*, 62(5), pp.1311-1324. Olsen, Y., 2004. Live food technology of cold-water marine fish larvae. *Culture of cold-water marine fish*, pp.73-128. Penglase, S., Edvardsen, R.B., Furmanek, T., Rønnestad, I., Karlsen, Ø., van der Meeren, T. and Hamre, K., 2015. Diet affects the redox system in developing Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Redox biology*, 5, pp.308-318. Powell, A., Treasurer, J.W., Pooley, C.L., Keay, A.J., Lloyd, R., Imsland, A.K. and Garcia de Leaniz, C., 2018. Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), pp.683-702.

- Shields, R.J., Bell, J.G., Luiz, F.S., Gara, B., Bromage, N.R. and Sargent, J.R., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary essential fatty acids. *The Journal of nutrition*, 129(6), pp.1186-1194.
- Vadstein, O., Attramadal, K.J., Bakke, I. and Olsen, Y., 2018. K-selection as microbial community management strategy: a method for improved viability of larvae in aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.2730.
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchietti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K. and Defoirdt, T., 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture*, 5, pp.S1-S25.
- Vo, T.A., Galloway, T.F., Bardal, T., Halseth, C.K., Øie, G. and Kjørsvik, E., 2016. Skeletal muscle growth dynamics and the influence of first-feeding diet in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.). *Biology open*, 5(11), pp.1575-1584.
- Øie, G., Galloway, T., Sørøy, M., Holmvaag Hansen, M., Norheim, I.A., Halseth, C.K., Almli, M., Berg, M., Gagnat, M.R., Wold, P.A. and Attramadal, K., 2017. Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first-feeding of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 23(1), pp.3-17.

7 Dynamisk Energibudsjett (DEB) Modelling

Dynamisk energibudsjett (DEB) teori (Jusup et al., 2017; Kooijman, 2001) er det mest omfattende rammeverket for å forstå metabolsk organisering til dags dato. Teorien er generisk og dekker alle livsformer, og det er funnet mange praktiske applikasjonsområder for teorien blant annet innen økotoksikologi (Jager et al., 2006) og, hvilket er mer relevant for dette prosjektet, innen akvakultur (Føre et al., 2016; Serpa et al., 2013; Stavrakidis-Zachou et al., 2019). Teorien er strukturert rundt lovene for bevaring av masse og energi, som illustrert i Figur 7-1. Ressurser blir tatt opp fra miljøet og deretter brukt til forskjellige energikrevende prosesser som vekst, utvikling og vedlikehold. DEB-teori gir et enkelt sett med regler for opptak og allokering av ressurser på tvers av ulike prosesser. Disse reglene varierer lite mellom arter; arter varierer hovedsakelig i størrelsesordenen av de ulike forandringene. For praktiske modeller som er avledet fra denne teorien, kan den samme modellstrukturen anvendes for mange arter som er i samme taksonomiske gruppe. De fleste fiskearter kan for eksempel forklares med bruk av samme grunnleggende modellstruktur, men ulike arter vil ha forskjellige verdier i deres modellparametere som derav leder til veldig ulike livssykluser.



Figur 7-1: Dynamisk energibudsjett teori er strukturert rundt lovene for bevaring av masse og energi i organismer relatert til ressursopptak fra miljøet og ressursbruk for vekst, utvikling, vedlikehold og reproduksjon.

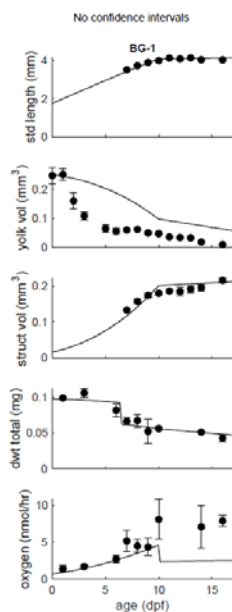
DEB-modeller kan derfor gi oss muligheten til å analysere og forutsi den komplette livssyklusen til en art i dynamiske miljøer, og muligheten til å simulere ulike miljøer for å optimalisere fiskeoppdrett. Men, parametersetting i en DEB-modell for en enkelt art er ikke en triviell oppgave, og særlig ikke for en såkalt "standard DEB-modell". For selv om denne oppgaven er understøttet av et bibliotek med parametere, regler for utfylling av datahull og dedikert programvare til formålet (Marques et al., 2018), er det ofte vanskelig å etablere unike parametere for en art. I dette prosjektet ble det bestemt å bruke et noe forenklet DEB-rammeverk (DEBkiss, Jager et al., 2013) som er tettere knyttet opp mot målbare parametere og derfor er enklere å bruke. For livsstadier som tar opp føde eksternt, gir DEBkiss rammeverket et enkelt oppsett med ligninger som virker godt for flere arter (se liste over publikasjoner på http://www.debttox.info/debkiss_appl.html). Modellen er mindre utprøvd på fiskelarvers plommesekkfase, men den har vist seg å fungere veldig godt på Atlantisk torsk ved bruk av kun tilgjengelige litteraturdata (Jager et al., 2018).

Det er ikke helt rett frem å liste opp hvilke data som behøves til DEBkiss-modellering fordi det er avhengig av både type modell og særegenheten til artens livshistorie. For å modellere de tidlige livsstadierne til fiskelarver trenger vi gode estimater på biomassen i plommesekken og strukturelle vev over tid. Dette lar seg vanskelig gjennomføre rent praktisk da det er vanskelig å separere plommesekk og struktur, endringer i form over ontogenesen, endringer vanninnhold og ikke minst individuelle forskjeller mellom individer. For noen arter, og noen livsstadier, kan det å måle kroppslengde være nok, men kun der hvor kroppslengde har et konstant forhold til tørrvekt. I tillegg kan oksygenopptak (respirasjon) være svært verdifullt for å kunne forstå underliggende metabolske prosesser. Målinger av fôropptak kan også brukes, spesielt når det kan observeres spesifikke avvik i vekstmønster (Kooijman et al., 2011). Til tross for at det finnes omfattende datasett for artene som modelleres, vil det alltid være hull i disse som medfører at man enten må foreta 'kvalifisert gjetning' eller gjøre avgrensede forsøk. En DEB-modell vil avdekke disse kunnskapshullene og teste betydningen av disse ved å implementere ulike antakelser.

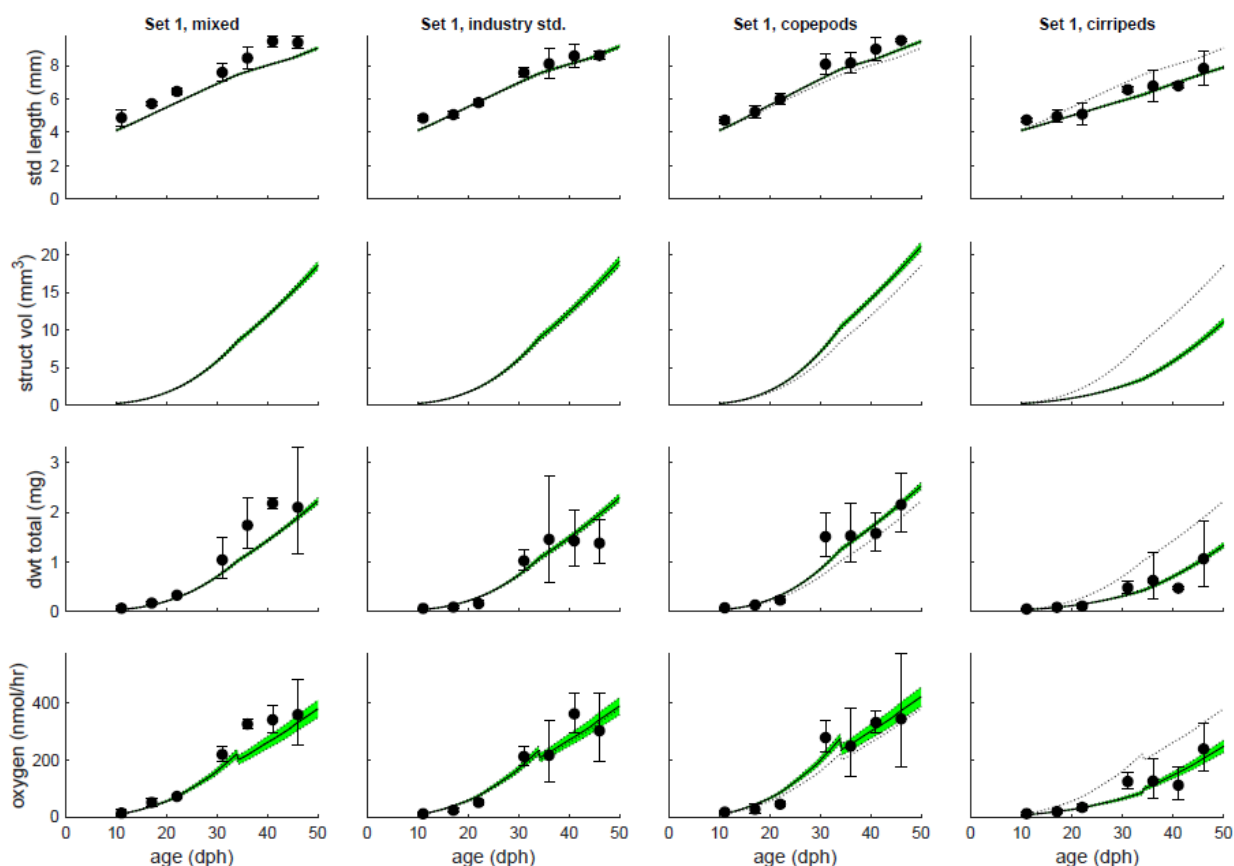
En DEB-modell kan brukes til å forstå tidlig utvikling hos fiskelarver bedre fra et bioenergetisk perspektiv. Dette kan brukes til å forutsi sensitive utviklingsstadier og hvordan utviklingsrater i en kommersiell produksjon kan oppnås på en bioenergetisk forsvarlig måte. I AP1 i STARTRENS-prosjektet var målet å produsere grunnleggende energidata for å utvikle en DEB-modell for berggylt (**Appendiks C**) og for rognkjeks (**Appendiks D**), fra befruktede egg, gjennom embryoutviklingen og til fiskelarvene var klare til å ta til seg føde eksternt. Data fra AP1 ble kombinert med data fra startfôringsforsøkene i AP2 slik at hele perioden fra befruktning av egg frem til fiskelarvene var tilvent tørrfôr var inkludert, hvor også effekten av ulike fôringsregimer og fôrtyper var med i vurderingen. Arbeidet er under publisering i journalen *Ecological Modelling*.

7.1 Resultater, diskusjon og videre anbefalinger

En rekke målinger ble foretatt i vårt forsøk på å parametrisere DEB-modeller for tidligstadier av berggylt og rognkjeks, herunder målinger av vekt (tørrvekt, karbonvekt, nitrogenvekt), biometri (lengde, høyde, kroppsareal mm.) og respirasjonsrater (oksygenforbruk). Til tross for bred kartlegging av parametere oppstod det en del problemer underveis som krever ytterligere forskning før disse modellene kan brukes i praksis. Disse utfordringene er beskrevet nærmere i Appendiks C og D. Eksempler på hvordan data fra DEB-modeller visualiseres er vist i Figur 7-2 og 7-3 (hentet fra Appendiks C). I det følgende gis det et kort sammendrag av funnene for begge artene, og for mer utdypende lesning henvises det til Appendiksene (C & D)



Figur 7-2: Simulering med DEBkiss-modellen for plommesekkstadier av berggylt (*Labrus berggylta*) mot eggkvalitetsdata for gruppen BG-1 (jf. kap. 4). Fra topp til bunn: standardlengde (mm); plommesekkvolum (mm³); kropps volum (mm³); tørrvekt (mg) og oksygenforbruk. Feillinjer er 95 % CI.



Figur 7-3: Tilpasninger av DEBkiss-modellen med data for de ulike fôringsregimene som ble brukt til startfôring av berggylt (*Labrus berggylta*). Feillinjer er 95 % CI. Grønt areal er konfidensintervall på modellkurven basert på usikkerheter for parametere i kurvetilpasningen. Stiplet linje viser referansekurven ("mixed"). Fra topp til bunn: standardlengde (mm); kroppsvolum (mm³); tørrvekt (mg) og oksygenforbruk (nmol per time). Fôringsregimer (jf. Kap.5): Set1 mixed= Cop – Cir; Set1 Industry std.= Rot – Art; Set1 Copepods= Cop – Art; Set1 cirripeds= Exp. Cir – Cir.

7.1.1 DEB Berggylt

Måling av kroppslengde og kroppsareal så ut til å gi gode estimater av kroppsvolum, men måling av C og N-innhold så ut til å gi lite meningsfulle data for slike beregninger. Vi fant et karboninnhold på 0,44 mg/mg og nitrogeninnhold på 0,096 mg/mg, og disse verdiene var relativt konstante gjennom de tidlige livsstadiene. Videre ser det ut som en Arrhenius-temperatur på omtrent 9900 K passer til berggylt for tilpasning av vekst i henhold til ulik eller varierende temperaturer. Modellen fant også at berggyltlarvene endrer form etter at plommesekken er brukt opp, og at dette inntreffer når larvene når omtrent 4-8 mm standardlengde (SL). Derfor er SL en dårlig proxy for beregning av kroppsmasse i dette størrelsesområdet. Konklusjonen fra den begrensede DEB-analysen er at parametrene for berggylt ikke var veldig forskjellig fra torsk når man korrigerer for temperatur. For startfôringsfasen, ble det funnet at fôringsregimene hvor det ble brukt hoppekreps i begynnelsen gjorde det bedre enn de øvrige behandlingene. Det ble også observert at overgangen til tørrfôr på dag 34 etter klekking medførte suboptimal ytelse hos berggyltlarvene.

7.1.2 DEB Rognkjeks

Måling av kroppslengde og kroppsareal så ut til å gi gode estimater av kroppsvolum også for rognkjeks, og likt som for berggylt var det ikke mulig å bruke C- og N-innhold til DEB-modelleringen. Årsaken er at plommesekk og kropp så ut til å ha ganske lik sammensetning slik at målingene ikke kunne brukes til å skille mellom disse to. Vi fant et karboninnhold på 0,50 – 0,55 mg/mg for rognkjeksegg/-embryo, mens dette var

mye lavere i startfôringsperioden (0,30 – 0,35 mg/mg). N-innholdet var ganske konstant under hele perioden (0,10 – 0,12 mg/mg). Rognkjekslarvene endret form etter klekking. Formendringen er rask i begynnelsen, og fortsetter deretter gradvis. Dette betyr at standardlengde er en dårlig proxy for kroppsstørrelse i startfôringsfasen. Konklusjonen foreløpig er at DEB parameterne for rognkjeks ikke er veldig ulik torsk under embryonalutviklingen, men at den skiller seg fra torsk under startfôringsfasen hovedsakelig på grunn av de store forskjellene i energibidrag fra plommesekken. Modellen viste at fôringsregiment hvor det ble brukt Artemia og tørrfor (FD) ga mellom 8 – 17 % bedre ytelse hos rognkjekslarvene sammenliknet med de øvrige fôringsregimene.

7.2 Referanser

- Føre, M., Alver, M., Alfredsen, J.A., Marafioti, G., Senneset, G., Birkevold, J., Willumsen, F.V., Lange, G., Espmark, Å., Terjesen, B.F., 2016. Modelling growth performance and feeding behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in commercial-size aquaculture net pens: Model details and validation through full-scale experiments. *Aquaculture* 464, 268-278.
- Jager, T., Heugens, E.H.W., Kooijman, S., 2006. Making sense of ecotoxicological test results: Towards application of process-based models. *Ecotoxicology* 15, 305-314.
- Jager, T., Martin, B.T., Zimmer, E.I., 2013. DEBkiss or the quest for the simplest generic model of animal life history. *Journal of Theoretical Biology* 328, 9-18.
- Jager, T., Nepstad, R., Hansen, B.H., Farkas, J., 2018. Simple energy-budget model for yolk-feeding stages of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Ecological Modelling* 385, 213-219.
- Jusup, M., Sousa, T., Domingos, T., Labinac, V., Marn, N., Wang, Z., Klanjšček, T., 2017. Physics of metabolic organization. *Physics of life reviews* 20, 1-39.
- Kooijman, S.A.L.M., 2001. Quantitative aspects of metabolic organization: a discussion of concepts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 356, 331-349.
- Kooijman, S., Pecquerie, L., Augustine, S., Jusup, M., 2011. Scenarios for acceleration in fish development and the role of metamorphosis. *Journal of sea research* 66, 419-423.
- Marques, G.M., Augustine, S., Lika, K., Pecquerie, L., Domingos, T., Kooijman, S.A., 2018. The AmP project: comparing species on the basis of dynamic energy budget parameters. *PLoS computational biology* 14, e1006100.
- Serpa, D., Ferreira, P.P., Ferreira, H., da Fonseca, L.C., Dinis, M.T., Duarte, P., 2013. Modelling the growth of white seabream (*Diplodus sargus*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in semi-intensive earth production ponds using the Dynamic Energy Budget approach. *Journal of sea research* 76, 135-145.
- Stavrakidis-Zachou, O., Papandroulakis, N., Lika, K., 2019. A DEB model for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Parameterisation and application in aquaculture. *Journal of Sea Research* 143, 262-271.

8 Hovedfunn / Main Findings

Hovedfunn:

- Vi identifiserte flere potensielle lipidbiomarkører i berggyltegg som kan forutsi eggkvalitet. Heriblant fant vi 32 lipider som var positivt korrelert med størrelsesrelaterte eggkvalitetsmål, og 24 andre lipider var negativt relatert til samme eggkvalitetsmål hos berggylt.
- Lipidprofilen i rognkjeksegg var tett knyttet opp til størrelsen på hunnfisken, befruktning- og klekkesuksess, og lipidprofilen var forskjellig mellom egg-grupper avhengig av opprinnelse og/eller diett. Phosphatidylethanolamines (PEs) og phosphatidylcholines (PCs) viste potensielle for bruk som bioindikatorer for klekkesuksess og befruktningsrate i rognkjeksegg.
- Ved startfôring av berggyltlarver bør rotatorier erstattes av hoppekreps (*A. tonsa*) for god vekst og overlevelse. Artemia kan erstattes av *Semibalanus balanoides*-nauplier (CryoPlanktonLarge) da dette fôret så ut til å gi bedre kapasitet i fordøyelsen. Det virker være viktig for beindannelsen å ha et dynamisk fôringsregime og begynne tørrfôrtilvenningen i henhold til størrelse når larvene når fleksjon ved ca. 6 mm SL, og ikke i henhold til alder. Dette kan sikre at larvene får dekket mineralbehovet under forbeiningen.
- Ved startfôring av rognkjeks bør det brukes anrikt Artemia, muligens i kombinasjon med rur-nauplier (*S. balanoides*), for å oppnå rask vekst og god utvikling. Det beste resultatet ble oppnådd når tørrfôrtilvenningen ble startet på dag 20 etter klekking når larvene hadde en fullt utviklet mage.
- Larvenes fôringshistorikk fra de første dagene med eksogen fôring kan fortsatt spores lenge etter larvene er ferdig med tørrfôrtilvenning. Disse forskjellene var størst mellom larver som hadde spist naturlig og anrikt levendefôr. Genekspresjonsanalyser vil gi flere svar på hvordan rognkjeks- og berggyltlarvenes fordøyelse og metabolisme påvirkes av ulike fôrtyper og -organismer.
- Basert på våre resultater anbefaler vi å studere langtidseffekter av tidligernæring i fisk.

Main findings:

- We identified several potential lipid biomarkers in ballan wrasse eggs for predicting egg quality. Herein, we found 32 lipid species which were positively correlated to size related egg parameters, and 24 other lipids which were negatively correlated to the same parameters.
- The lipid profile in lumpfish eggs was tightly related to female size, fertilization- and hatching success, and the lipid profile was different between egg batches depending on origin and/or diet. Phosphatidylethanolamines (PEs) and phosphatidylcholines (PCs) showed potential to be used as bioindicators for hatching- and fertilization success in lumpfish eggs.
- For startfeeding of ballan wrasse larvae, rotifers should be replaced by copepods (*A. tonsa*) for good growth and survival. Artemia could be replaced by cirripede nauplii (*S. balanoides*) as this seemed to give a higher digestive capacity. It seems important for ossification to have a dynamic feeding regime and start weaning according to size when the larvae reach flexion at around 6 - 7 mm standard length, and not to age. This could ensure that the larvae receive the necessary minerals for ossification.
- For startfeeding of lumpfish larvae, enriched Artemia should be used, possibly in combination with cirriped nauplii (*S. balanoides*), to achieve rapid growth and good development. Best results were obtained when weaning started on day 20 post hatch, when the larvae developed a fully formed stomach.
- The feeding history of the first days of exogenous feeding can be traced long after the larvae are weaned onto a common, formulated diet. These differences were most apparent between larvae that were fed natural *versus* enriched live feeds. Gene expression analyses will provide further answers to how digestion and metabolism is affected by prey and feed types in lumpfish- and ballan wrasse larvae.
- Based on our results, we recommend to study long-term effects of early nutrition in fish.

9 Leveranser

Prosjektet har hatt flere interne og eksterne leveranser underveis. De interne leveransene som har blitt overlevert eller kommunisert til prosjektets referansegruppe underveis i prosjektperioden er listet opp i det følgende. *Merk: noen leveranser ble tatt ut av prosjektet i forbindelse med revidering av opprinnelig prosjektbeskrivelse og nummereringen har derfor noen hull.*

L1 Møtereferat for oppstartsmøte Q2/2019 og statusrapport til FHF.	Dato: 03.07.2019
L2 Fødringsregimer for småskalaforsøk og forsøksdato bestemt.	Dato: 15.12.2019
L3 Møtereferat for referansegruppemøte Q4/2019 og statusrapport til FHF.	Dato: 15.12.2019
L4 Datasamling ferdigstilt for berggyllt fra egg frem til startfôring	Dato: 31.12.2019
L5 Datasamling ferdigstilt for rognkjeks fra egg frem til startfôring.	Dato: 31.12.2019
L6 Screeningmetodikk for egg fra rognkjeks.	Dato: 30.11.2020
L7 Screeningmetodikk for egg fra berggyllt.	Dato: 30.11.2020
L8 Møtereferat for referansegruppemøte Q2/2020 og statusrapport til FHF.	Dato: 15.06.2020
L10 DEB-modell for berggylltarver fra egg til og med startfôring.	Dato: 30.11.2020
L11 DEB-modell for rognkjeks larver fra egg til og med startfôring.	Dato: 31.03.2021
L14 Genespresjonsanalyser for rognkjeks og berggylltarver	Dato: 30.09.2020
L15 Møtereferat for referansegruppemøte Q4/2020 og statusrapport til FHF.	Dato: 15.12.2020
L16 Rapport på effekt av ulike startfôringsregimer for rognkjeks.	Dato: 15.11.2021
L17 Rapport på effekt av ulike startfôringsregimer for berggyllt.	Dato: 15.11.2021
L18 Forslag om vurdering av kommersiell testing i ulike vannbehandlings-systemer (RAS vs.FTAS) på bakgrunn av resultater oppnådd i AP2.	Dato: 15.12.2020
L19 Administrativ sluttrapport sendt til FHF	Dato: 03.12.2021
L21 Manuskript til faglig sluttrapport sendt til FHF referansegruppe	Dato: 15.12.2021

Følgende eksterne leveranser har blitt gjennomført, eller er i ferd med å ferdigstilles, i prosjektperioden:

Vitenskapelige publikasjoner (5):

- Arne M. Malzahn, Antonio Sarno, Andreas Hagemann, Julia Farkas, Luciana A. Musialak, Elin Kjørsvik and Bjørn H. Hansen (2021). Can lipidomics help identifying egg quality in ballan wrasse? *Short Communication, manuscript submitted to the journal Aquaculture on August 3rd, 2021. Accepted and currently being revised.*
- Tjalling Jager, Arne M. Malzahn, Andreas Hagemann and Bjørn H. Hansen (2021). Testing a simple energy-budget model for yolk-feeding stages of cleaner fish. *Research paper, manuscript submitted to the journal Ecological Modelling on September 17th, 2021.*
- Bjørn H. Hansen, Elin Kjørsvik, Antonio Sarno, Arne M. Malzahn, Ole M. Kulild, Julia Farkas, Rebecca Rye, Trond Nordtug, Bjarne Kvæstad, Ingrid Lein and Andreas Hagemann. Oocyte lipid profile is associated with larvae larval quality in lumpfish, *Cyclopterus lumpus* (Linnaeus, 1758). *In prep.*
- Arne M. Malzahn, Deni Ribicic, Bjørn Henrik Hansen, Antonio Sarno, Elin Kjørsvik, Anna Sigrid Nordberg Aase, Luciana Alves Musialak, Laura García-Calvo and Andreas Hagemann. First feed matters: The first diet of larval fish programmes growth, survival and metabolism of larval ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *In prep.*
- Startfôring av rognkjeks. *In prep.*

Populærvitenskapelig publisering (2):

- L9 Populærvitenskapelig publisering – Eggkvalitetsparametere for rensefisk. **Date:** 15.06.2020
- Hansen, BH, Hagemann A, Kvæstad B, Sarno A, Ribicic D, Malzahn AM., Farkas J, Nordtug T, Kulild OM, Rye R, Kjørsvik E. 2020. Leter etter molekylære markører for god egg- og yngelkvalitet hos rensefisk. *Norsk Fiskeoppdrett 2020, Volum 6/7. s. 40-43*

L20 Populærvitenskapelig artikkel om effekt av startfôringsregimer

Date: 15.05.2021

- Malzahn, A.M. First feed matters. *Hatchery International Magazine, July/August, 2021*
<https://www.hatcheryinternational.com/first-feed-matters/>
<https://mydigitalpublication.com/publication/?m=53689&i=709635&p=38&ver=html5>

Muntlige presentasjoner (6):

- Kjørsvik, E. et al., 2021. STARTRENS - Optimalisert startfôring av rensefisk. *AquaNor 2021, Forskningsstorgets miniseminarer, 25. august 2021, fysisk og digitalt foredrag.*
- Malzahn, A.M. et al., 2021. "The effect of different live feed organisms on larval Ballan wrasse larvae (*Labrus bergylta*)". *Aquaculture Europe 2021, October 4th – 7th, Funchal, Madeira.*
- Malzahn, A.M. et al., 2021. "STARTRENS project WP2: Start feeding Ballan wrasse". *Webinar - Produksjon av berggylt, 11. Mars 2020, Digitalt arrangement arrangert av FHF.*
- Hansen, B.H. et al., 2021. "Bruk av lipidomics for å vurdere eggkvalitet hos berggylt". *Webinar - Produksjon av berggylt, 11. Mars 2020, Digitalt arrangement arrangert av FHF.*
- Kjørsvik, E. et al., 2020. "STARTRENS – Optimalisert produksjon av Rensefisk." *Havbrukskonferansen HAVBRUK2020, 9. - 10. juni 2020, Digital konferanse..*
- Dahle, S.W. et al., 2019. "STARTRENS – Optimalisert produksjon av Rensefisk." *"Fagseminar for rensefiskprodusenter", Kiel-ferga, 5.-7. november 2019.*
- Malzahn, A.M. et al., 2019. "STARTRENS – Optimalisert produksjon av Rensefisk." *FHF Arbeidsmøte Produksjon av Rensefisk, 3. juni 2019, Scandic Hell, Norway.*

Poster presentasjon (2):

- Hagemann A, Malzahn AM, Sarno A, Farkas J, Musialak LA, Kjørsvik E and Hansen BH. Can lipidomics help identifying egg quality in Ballan wrasse (*Labrus bergylta*)? *E-poster, Aquaculture Europe 2021, October 4th – 7th, Funchal, Madeira.*
- García-Gallego I, Vo TA, Mlingi F, Musialak LA, Miljeteig C, Lindskog MS, Akbar S, Kvernø S, Hagemann A, Malzahn AM, Kjørsvik E. 2021. Dietary effects on growth, survival and behavioural feeding responses in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) larvae. *E-poster, Aquaculture Europe 2021, October 4th – 7th, Funchal, Madeira.*

MSc studenter i det internasjonale Masterprogrammet Ocean Resources, Institutt for biologi, NTNU**(8):**

- Aase, Anna Sigrid Norberg. "Nutritional condition of Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae reared on different live feed diets." *Master's thesis, NTNU, 2022.*
- Akbar, Saba. "Lipid composition of lump sucker (*Cyclopterus lumpus*) larvae fed with Artemia, copepods and formulated feed." *Master's thesis, NTNU, 2022.*
- García-Calvo, Laura. "Effects of different live feeding regimes on the development and lipid composition of ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae." *Master's thesis, NTNU, 2022.*
- Hagen, Heidi. "The effect of different live prey on behavior and feed preferences in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) larvae." *Master's thesis, NTNU*
- Kværnø, Sunniva Brevik. "Effects of start feeding of lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) larvae with Artemia, Cirripedia, copepod (*Acartia tonsa*) and formulated diet, on growth and nutritional condition factor of the digestive system." *Master's thesis, NTNU, 2022.*
- Lindskog, Marte Solli. "Muscle development in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) larvae fed Cirripedia, copepods (*Acartia tonsa*), Artemia and formulated diet." *Master's thesis, NTNU, 2021.*
- Rye, Rebecca Zhichao. "Egg quality in wild lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and effects of broodstock diets on egg quality in broodstocks." *Master's thesis, NTNU, 2022.*
- Shabbir, Fahad. "Degumming of Ballan wrasse eggs." *Master's thesis, NTNU, 2021.*

MSc studenter i Masterprogrammet Bioteknologi (1):

- Rosvoll, Ann Isabel Carmo. "Vannmikrobiota i startfôring av berggylt." *Master's thesis, NTNU, 2021*

MSc studenter i studieprogrammet Lektorutdanning i realfag (LUR), NTNU (1):

- Kulild, Ole-Martin. "Sammenligning av embryoutvikling for rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) stamfisk og villfisk." *Master's thesis, NTNU, 2020.*

Gjesteforskere (1):

- Ibon García-Gallego. Universidad Las Palmas de Gran Canaria, Spania. *Research scholarship for transnational access to NTNU Sealab/Department of Biology, through the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 652831 (AQUAEXCEL2020). TNA project ID number: AE170011*

*Appendix A - Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) start-feeding experiment microbiome analysis report*

STARTRENS

Ballan wrasse (*Labris bergylta*) start-feeding experiment microbiome analysis report

10/12/2020

1. Sample info

1.1. Taxonomy and phylogeny stats

Table 1. Analyzed sample information

```
phyloseq-class experiment-level object
otu_table() OTU Table: [ 9975 taxa and 183 samples ]
sample_data() Sample Data: [ 183 samples by 11 sample variables ]
tax_table() Taxonomy Table: [ 9975 taxa by 7 taxonomic ranks ]
phy_tree() Phylogenetic Tree: [ 9975 tips and 9877 internal nodes ]
refseq() DNASTringSet: [ 9975 reference sequences ]
```

From sample statistic one can read that there are in total 183 samples with 9975 amplicon sequence variants (ASV) detected. One can refer to ASV as to (sub)species.

1.2. Samples and sequencing depth

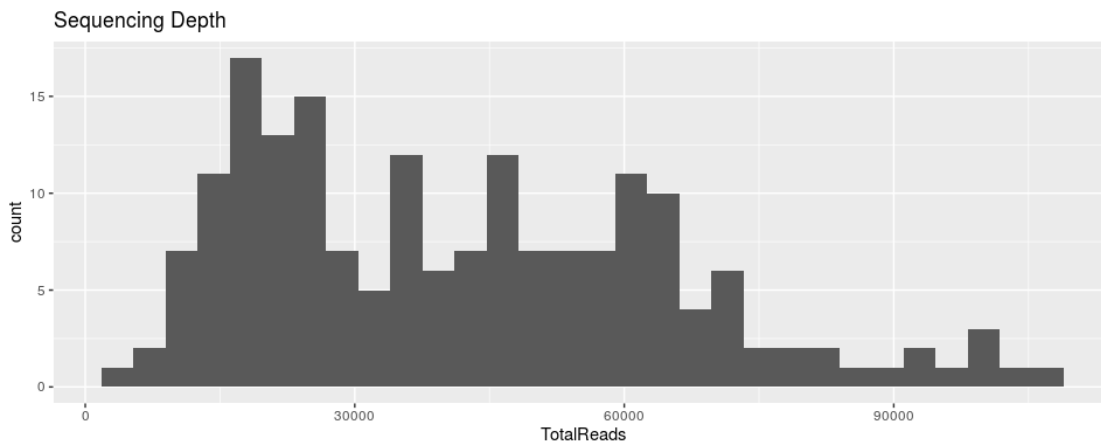


Figure 1. Sequencing depth. x-axis represents number of reads (sequences), while y-axis cumulative number of samples.

From figure 1 one can see that sequencing depth varies from 2,500 up to 106,000 sequences per sample. In order to make data across samples comparable for statistical analysis, one has to

reduce differences in sequencing depth between samples. One way to do this is to perform so-called rarefying. By doing so, one subsamples (without replacement) to defined number of reads (sequences).

Table 2. Sample info after removing low-occurrence ASVs and rarefaction to even sampling depth

```

phyloseq-class experiment-level object
otu_table()  OTU Table:      [ 6737 taxa and 165 samples ]
sample_data() Sample Data:    [ 165 samples by 11 sample variables ]
tax_table()  Taxonomy Table: [ 6737 taxa by 7 taxonomic ranks ]
phy_tree()   Phylogenetic Tree: [ 6737 tips and 6645 internal nodes ]
refseq()     DNASTringSet:  [ 6737 reference sequences ]
  
```

First, we have removed from the dataset all ASVs that were present with less than 10 sequences. Afterwards, we have subsampled (with no replacement) all samples to even depth of 15,000 sequences. After doing that, all samples that had less than the threshold value were filtered out of the dataset. Ultimately, 165 samples were retained with 6739 amplicon sequence variants, as seen in table 2.

1.3. Rarefaction curves

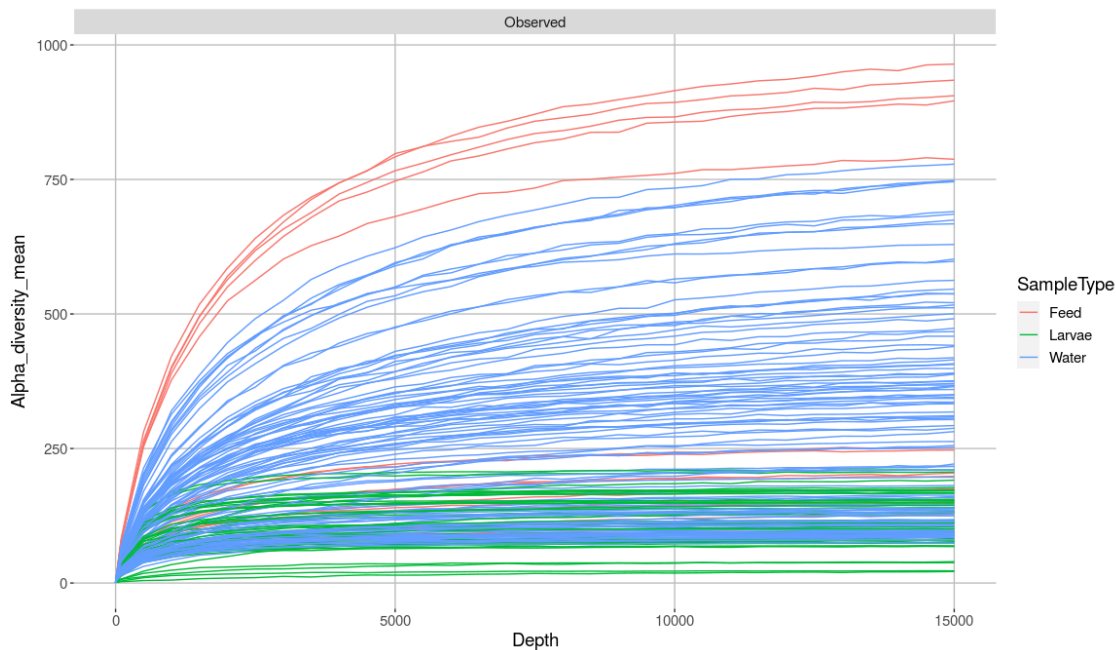


Figure 2. Rarefaction curves

Plotting rarefaction curves with sequencing depth on x-axis (number of sequences per sample) and observed OTUs (species) on the y-axis, one enables to observe how much fraction of the microbiota is actually depicted. If the curves of a sample flattens, that means that with further

sequencing it is unlikely that new/additional species will be captured apart from the ones we have already observed. On the contrary, if the curves remain steep, that would indicate that most probably with more sequencing one would find new species.

As seen from figure 2, choosing a threshold of 15,000 sequences for subsampling is optimal, as the majority of curves flattens out. Choosing lower threshold than 15,000 reads would in return select for less samples to be discarded, but it would also yield steeper rarefaction curves, indicating poorer snapshot of microbial community. On the contrary, choosing higher threshold would discard more samples from the dataset.

One has to be aware that with rarefying one loses a lot of sequence information. E.g. samples that had >100k reads (sequences), by subsampling they have lost >85k reads if the threshold was set at 15,000 reads like we did here.

2. Diversity analysis

2.1. Alpha diversity

Alpha diversity measure recaptures diversity within sample. In this instance, observed species number is taken into account (*Chao1*) and evenness diversity index (*Shannon*). Shannon diversity index, in addition to species richness (abundance), takes also into account the evenness.

In addition to check which statistical test to choose to evaluate alpha-diversity one has to look at the data distribution.

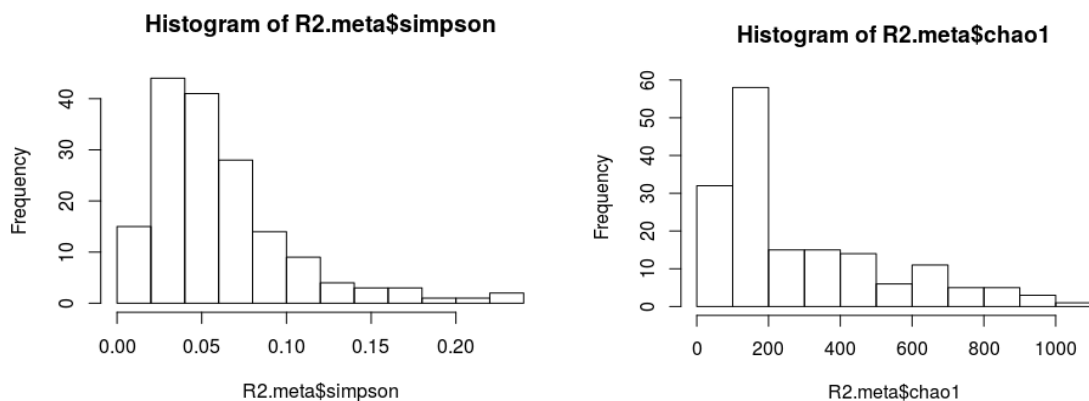


Figure 3. Data distribution when both indices are taken into account.

From figure 3. It is possible to observe that data is not normally distributed and is skewed to the left-hand side. In this case ANOVA test is not suitable and a non-parametric pairwise test like Kruskal-Wallis should be chosen.

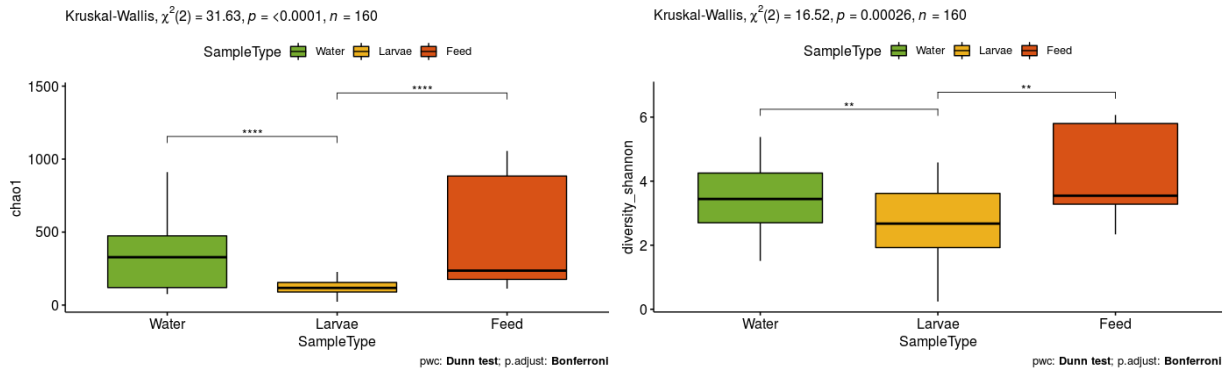


Figure 4. alpha-diversity of different sample types

When richness is taken into account, both feed and water samples show higher diversity compared to larvae microbiota. Similarly, when evenness is additionally calculated there are no significant differences between water and feed microbiota diversity. However, microbiota diversity was significantly higher in water and feed compared to larvae. This also means that larvae samples were more dominated by certain ASVs compared to water and feed ones.

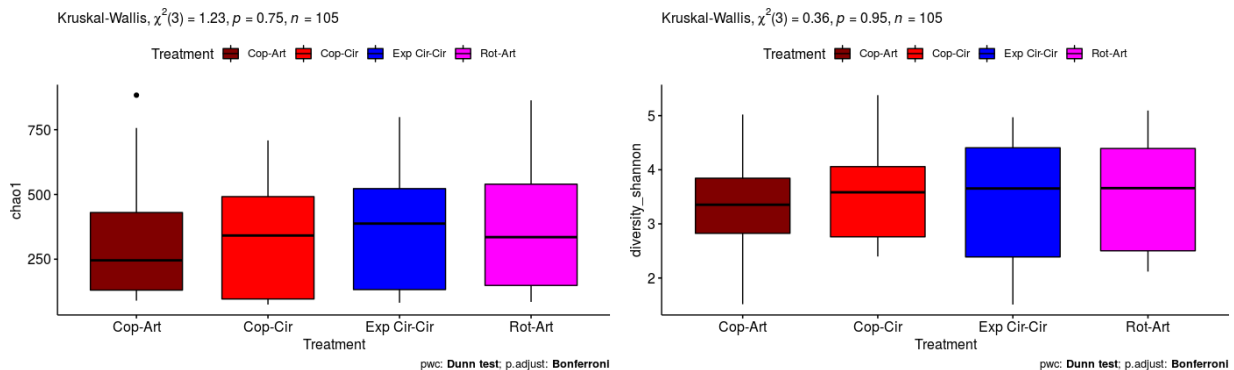


Figure 5. alpha-diversity between treatment of water samples

There were no significant differences in diversity between treatments of water samples when only richness and evenness was taken into account.

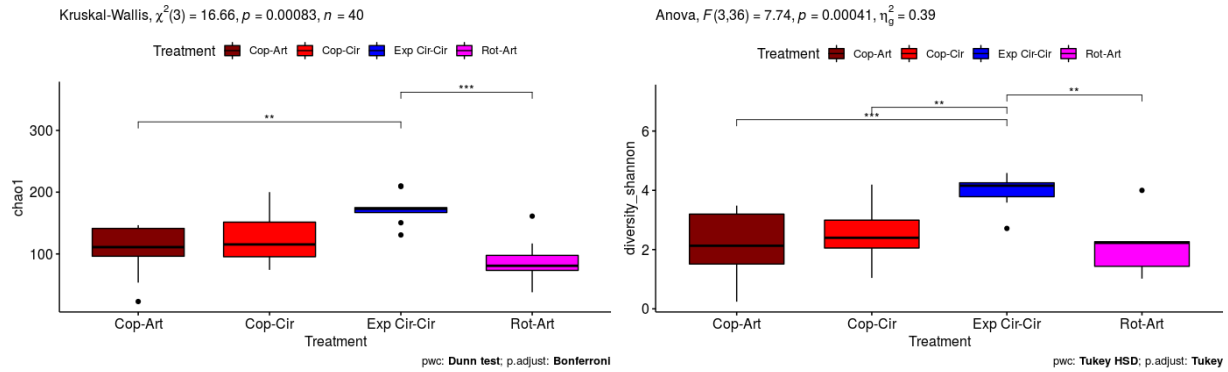


Figure 6. Alpha-diversity between treatment of larvae samples

For both diversity measurements exp. Cirriped/Cirriped treatment showed significantly higher diversity compared to other treatments (except for Cop-Cir with chao1), while there were no differences between rest of the treatments between each other.

2.2. Beta-diversity, or diversity between samples

Unlike alpha-diversity, beta-diversity is a measure of diversity between samples. It is usually depicted by a two-dimensional PCoA plot, as seen here. Here different samples are color coded and time-points are additionally indicated.

How to properly read the plot: Each dot represents total microbial community structure of a sample, placed in 2D space. If two samples would be identical in microbial community structure, they would perfectly overlap on the plot. The more the samples are diverse, they will appear more distant on the plot.

All samples

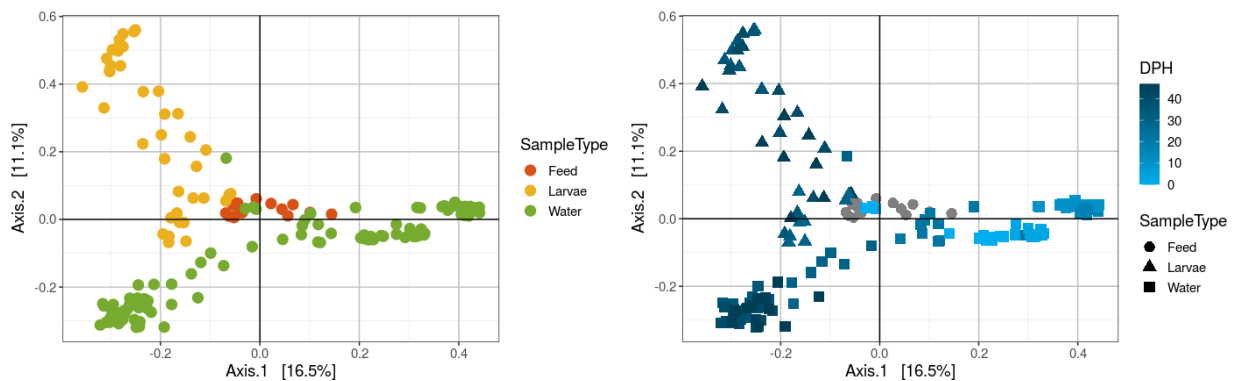


Figure 7. Beta-diversity between sample types

From the figure 7. on the left-hand side one can read that water and larvae samples show differences in community composition, however with a large spread along both axes. Feed microbiota shows similarity in microbial community to both, larvae and water samples. On the right-hand figure, it is possible to observe that the spread of the samples is influenced by experimental time (DPH). Water samples starting in the middle of the graph to the right side

and advancing to the lower left-hand side corner. Larvae microbial community dynamics showed pattern from the top left corner to the center of the figure.

After statistical analysis of beta-diversity significance between the sample types, ADONIS showed that the sample types were statistically different between each other (Table 3). However, homogeneity test showed (it was significant) that the data is underrepresented for some of the sample types and that might have influenced ADONIS (Table 4).

Table 3. ADONIS statistical analysis of different sample types

Sample Type	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Feed vs Water	1	2.315	2.31465	6.1962	0.04833	0.001 ***
Feed vs Larvae	1	2.6171	2.61709	7.2465	0.11832	0.001 ***
Water vs Larvae	1	6.761	6.7611	18.61	0.1117	0.001 ***

Table 4. Betadisper test for homogeneity of data used for ADONIS

Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions

Permutation: free

Number of permutations: 999

Response: Distances

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	N.Perm	Pr(>F)
Groups	2	0.05561	0.0278062	3.1813	999	0.042 *
Residuals	162	1.41597	0.0087406			

Signif. codes: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Water samples

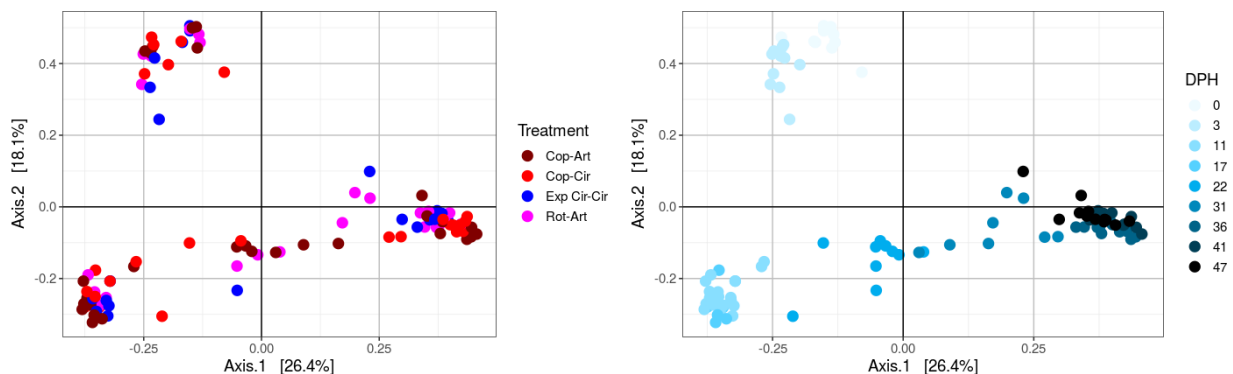


Figure 8. Beta-diversity between treatments of water samples

From figure 8 one could read that there are no real differences in community composition between the treatments of water samples (left-hand figure), since they are suppressed by larger differences in community composition between different days themselves (DPH) (right-hand graph).

In order to explore for differences between treatments we can dissect dataset for each DPH separately:

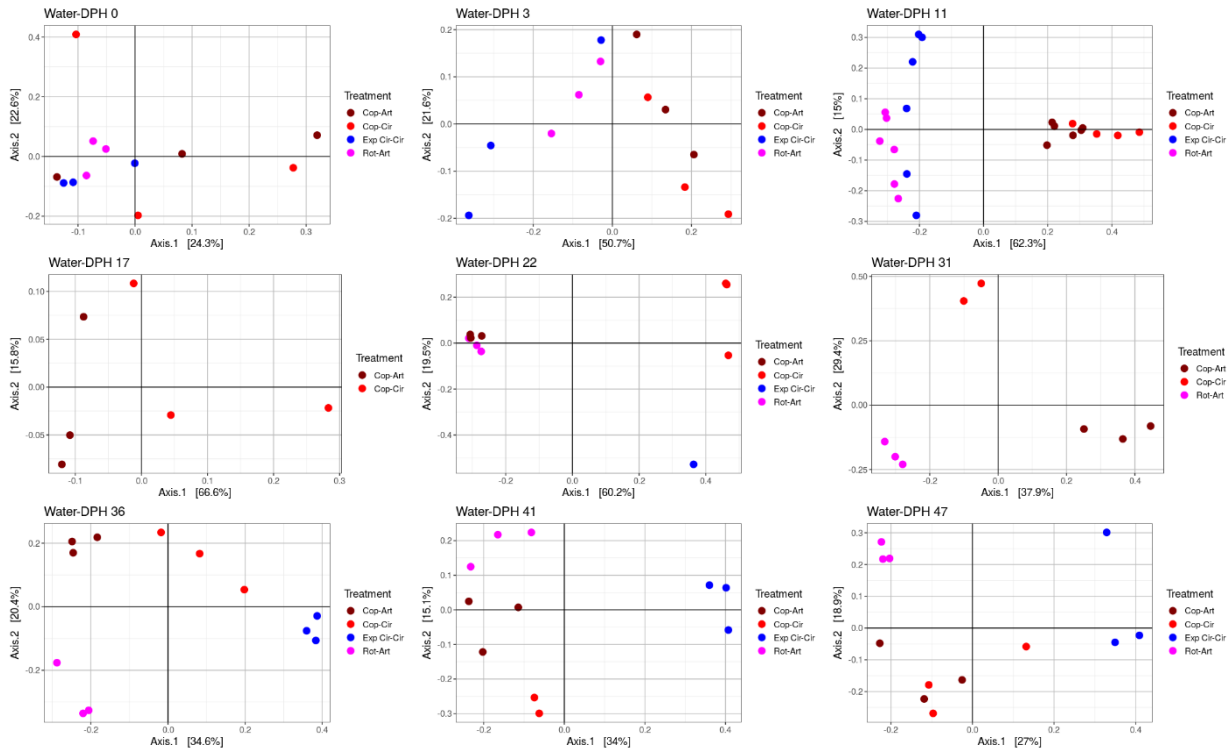


Figure 9. Beta-diversity between treatments of separate DPH of water samples

Community development in different treatments can be observed when broken down to specific DPH. Microbiota started to develop differently after DPH 3, with Copepods/Artemia and Copepods/Cirripeds treatment showing similarity and were different from exp. Cirriped/Cirriped and Copepod/Cirriped. This became more apparent after DPH 11. After DPH 22, however, Copepods/Artemia and Rotifer/Artemia showed more similarity and were apart of Copepod/Cirriped treatment and exp. Cirriped/Cirriped, which were also different. After DPH 31 all treatments showed unique water microbiota, this continued over DPH 36 to DPH 41. At DPH 41 although still unique microbiota for different treatments, more similarity was seen between Rotifer/Artemia, Copepods/Cirripeds and Copepods/Artemia treatment, while exp. Cirriped/Cirriped were significantly apart. At DPH 47 Copepod/Artemia and Copepods/Cirripeds treatment were very similar and were different from Rotifer/Artemia and exp. Cirriped/Cirriped.

Statistical test ADONIS showed that water samples from different treatments were significantly different, except for Copepods/Cirripeds and Copepod/Artemia treatment (Table 5).

Additionally, homogeneity test confirmed that data was well dispersed (Table 6), and that ADONIS results are valid.

Table 5. ADONIS statistical analysis of different treatments in water samples

Treatment	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Exp. Cir/Cir vs Cop/Cir	1	0.9661	0.96614	2.7902	0.05719	0.013 *
Exp. Cir/Cir vs Rot/Art	1	0.7644	0.76438	2.1626	0.04399	0.036 *
Exp. Cir/Cir vs Cop/Art	1	1.0909	1.09086	3.1282	0.05888	0.008 **
Cop/Cir vs Rot/Art	1	1.0275	1.02749	2.9398	0.0545	0.011 *
Cop/Cir vs Cop/Art	1	0.4027	0.40269	1.1661	0.02114	0.286
Rot/Art vs Cop/Cir	1	0.796	0.79599	2.2645	0.03954	0.027 *

Table 6. Betadisper test for homogeneity of data used for ADONIS

Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions

Permutation: free

Number of permutations: 999

Response: Distances

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	N.Perm	Pr(>F)
Groups	3	0.002301	0.00076686	0.3397	999	0.794
Residuals	101	0.228010	0.00225752			

Larvae samples

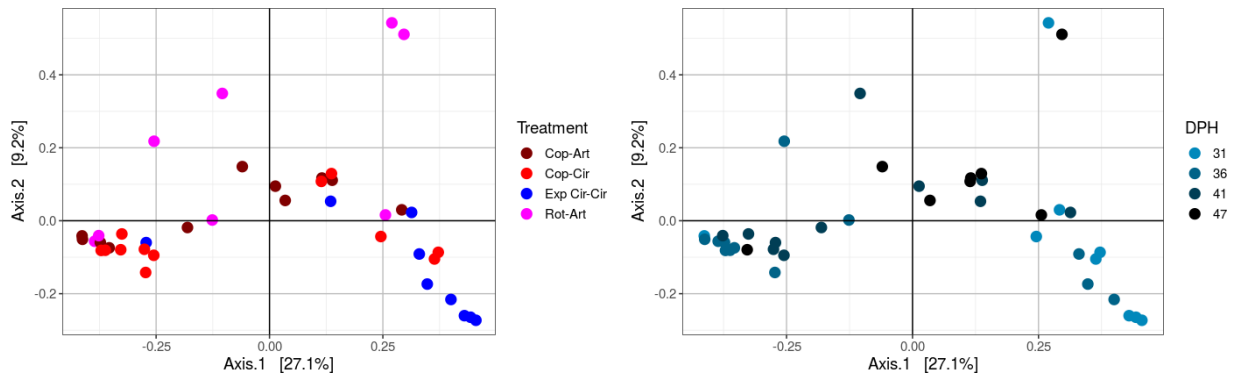


Figure 10. Beta-diversity between treatments of larvae samples

Larvae samples for microbiological analysis were collected only after DPH 31. From figure 10 (left-hand figure) one can observe some pattern based on samples origin in regard to treatment. Most exp. Cirriped/Cirriped samples can be located on the lower left portion, while Copepod/Cirriped and Copepods/Artemia are occupying central and lower right-hand side of the figure. Rotifer/Artemia samples show some similarity to Copepods/Cirripeds and Copepods/Artemia samples, but show some differences as well, as they can be found in upper portion of the figure.

When broken down according to DPH and plotted separately, differences are becoming more apparent (Figure 11). At DPH 31 clear distinction between exp. Cirriped/Cirriped and the rest can be observed as they are tightly located central and left-hand side. Samples from Copepods/Cirripeds treatment are to be found central and up, clustering with one Copepods/Artemia sample. Another Copepods/Artemia sample with Rotifer/Artemia sample can be found at right-hand bottom part. Coming to DPH 36, clear distinction between exp. Cirriped/Cirriped and the rest is still present. Now Copepods/Cirripeds and Copepods/Artemia cluster tightly together, and Rotifer/Artemia samples (two of them), slightly apart. Following DPH 41, Copepod/Artemia and exp. Cirriped/Cirriped start to form separate cluster each, while Rotifer/Artemia and Copepod/Artemia treatment cluster closely together and apart from rest. At DPH 47, no exp. Cirriped/Cirriped samples were obtained. Copepod/Artemia and Copepod/Cirriped samples were closer together than Rotifer/Artemia samples.

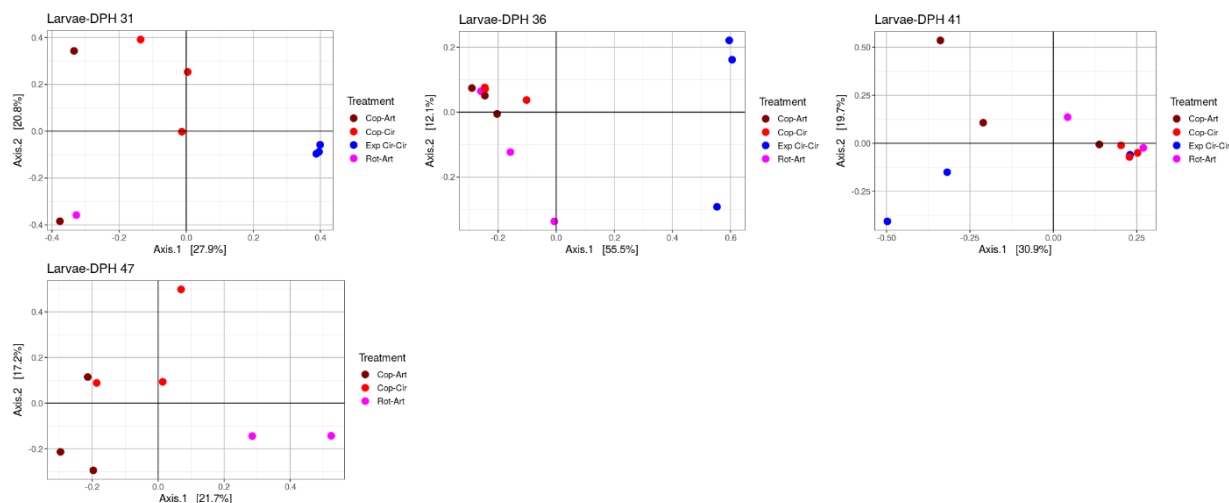


Figure 11. Beta-diversity between treatments of separate DPH of larvae samples

Statistical test ADONIS confirmed that there were significant differences in microbial community composition between exp. Cirriped/Cirriped treatment and all the other treatments (Table 7). Copepod/Cirriped, Copepod/Artemia and Rotifer/Artemia treatments were not significantly different between each other. However, both Copepod/Cirriped and Copepod/Artemia treatment when compared to Rotifer/Artemia showed differences which were close to significant.

Additionally, homogeneity test confirmed proper distribution of data and validity of ADONIS (Table 8).

Table 7. ADONIS statistical analysis of different treatments in larvae samples

Treatment	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Exp. Cir/Cir vs Cop/Cir	1	1.0683	1.06832	3.5362	0.15691	0.003 **
Exp. Cir/Cir vs Rot/Art	1	1.1375	1.13752	3.5777	0.19258	0.006 **
Exp. Cir/Cir vs Cop/Art	1	1.2220	1.22203	3.9158	0.17867	0.001 ***
Cop/Cir vs Rot/Art	1	0.5248	0.52479	1.7886	0.09039	0.071 .
Cop/Cir vs Cop/Art	1	0.3443	0.34427	1.1795	0.05318	0.245
Rot/Art vs	1	0.4916	0.49161	1.6201	0.08701	0.082 .

Cop/Art

Table 8. Betadisper test for homogeneity of data used for ADONIS

Permutation test for homogeneity of multivariate dispersions

Permutation: free

Number of permutations: 999

Response: Distances

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	N.Perm	Pr(>F)
Groups	3	0.02208	0.007359	0.1914	999	0.892
Residuals	36	1.38411	0.038448			

3. Visualization of microbial community composition

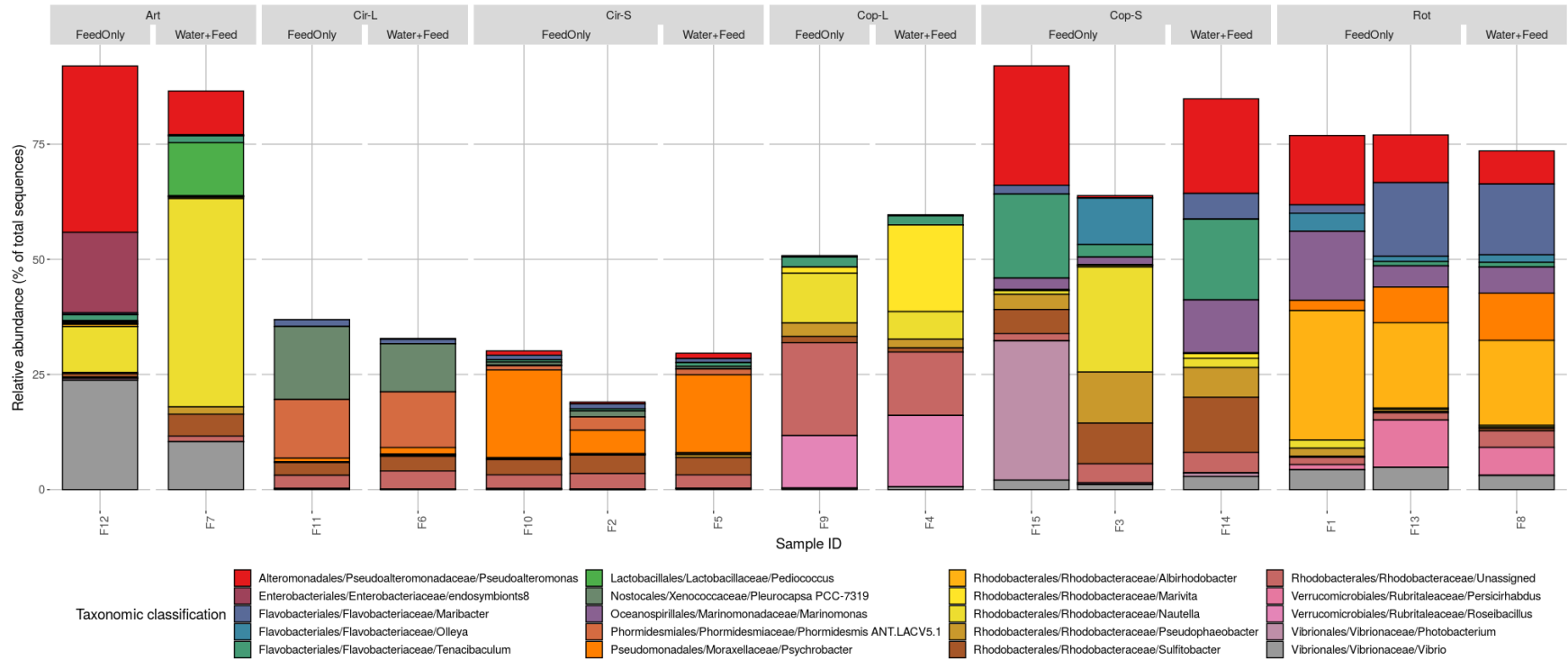


Figure 12. Microbiota composition for feed samples at Order/Family/Genus level at abundance cut-off of 7%. Main columns represent feed type, while sub-columns feed origin.

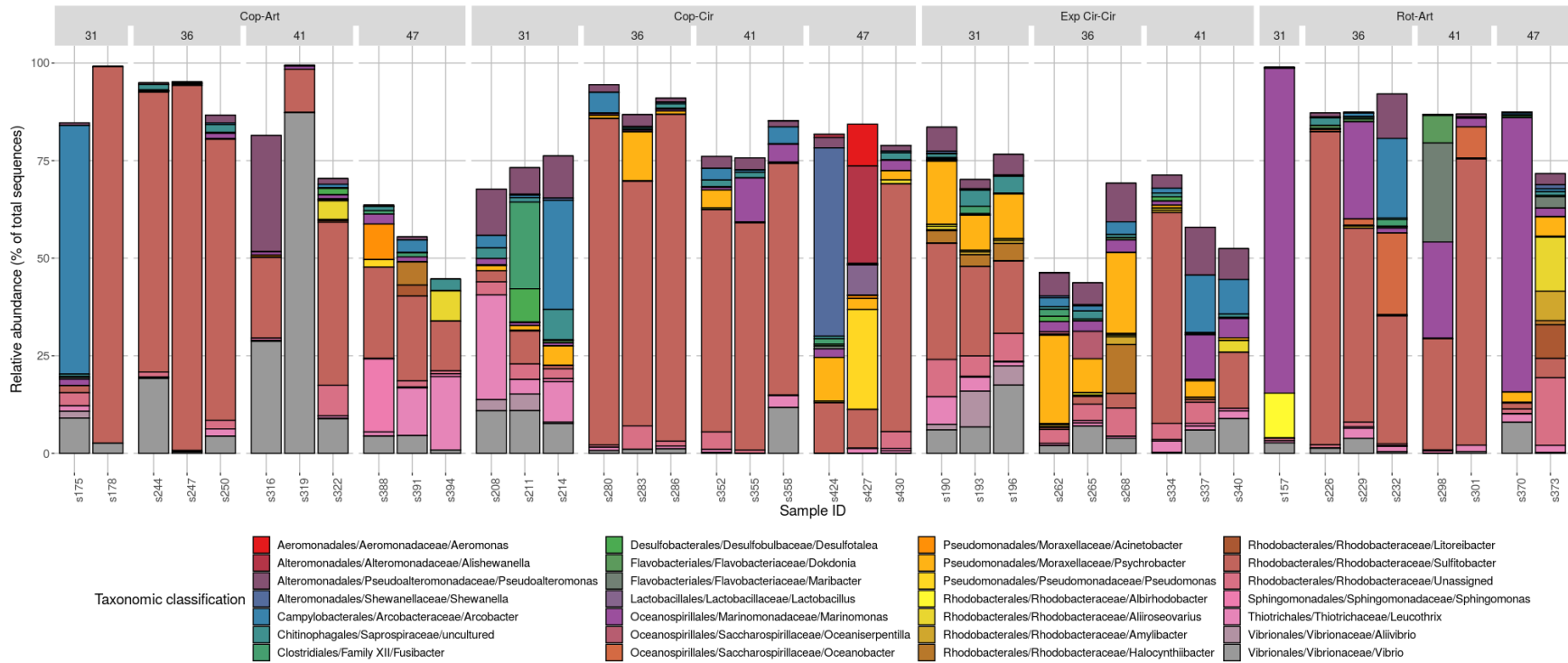


Figure 13. Microbiota composition for larvae samples at Order/Family/Genus level at abundance cut-off of 7%. Main columns represent feed type, while sub-columns DPH.

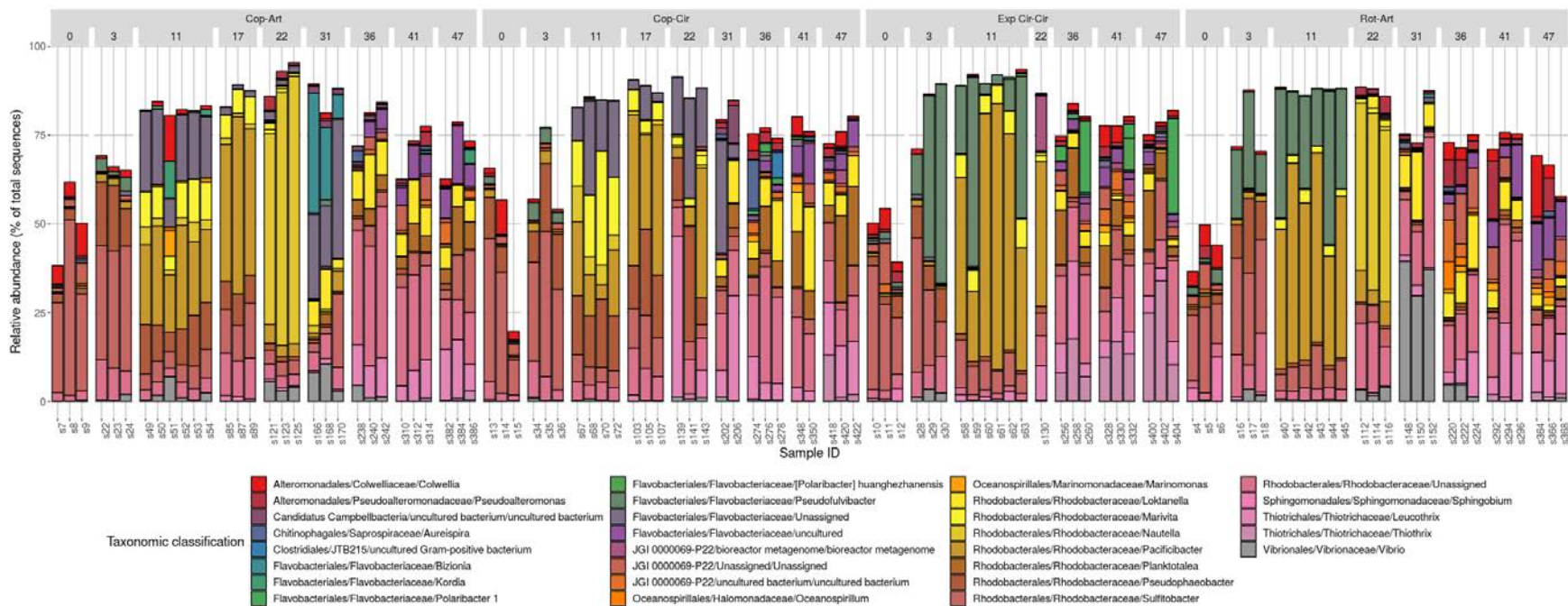


Figure 14. Microbiota composition for water samples at Order/Family/Genus level at abundance cut-off of 7%. Main columns represent feed type, while sub-columns DPH.

*Appendix B – Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) start-feeding experiment microbiome analysis report*

STARTRENS

Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) start-feeding experiment microbiome analysis report

22/04/2021

1. Sample info

1.1. Taxonomy and phylogeny stats

Table 1. Analyzed sample information

```
phyloseq-class experiment-level object
otu_table() OTU Table: [ 4650 taxa and 89 samples ]
sample_data() Sample Data: [ 89 samples by 7 sample variables ]
tax_table() Taxonomy Table: [ 4650 taxa by 7 taxonomic ranks ]
phy_tree() Phylogenetic Tree: [ 4650 tips and 4546 internal nodes ]
refseq() DNASTringSet: [ 4650 reference sequences ]
```

From sample statistic one can read that there are in total 89 samples with 4650 amplicon sequence variants (ASV) detected. One can refer to ASV as to (sub)species.

1.2. Samples and sequencing depth

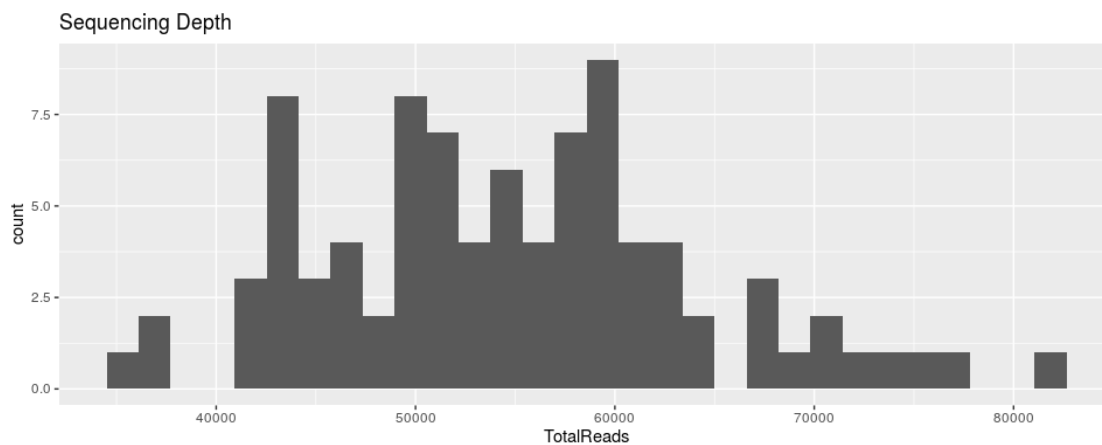


Figure 1. Sequencing depth

From figure 1 one can see that sequencing depth varies from 35,000 up to 82,000 sequences per sample. In order to make data across samples comparable for statistical

analysis, one has to reduce differences in sequencing depth between samples. One way to do this is to perform so-called rarefying. By doing so, one subsamples (without replacement) to defined number of reads (sequences).

Table 2. Sample info after removing low-occurrence ASVs and rarefaction to even sampling depth.

```
phyloseq-class experiment-level object
otu_table() OTU Table: [ 3323 taxa and 89 samples ]
sample_data() Sample Data: [ 89 samples by 7 sample variables ]
tax_table() Taxonomy Table: [ 3323 taxa by 7 taxonomic ranks ]
phy_tree() Phylogenetic Tree: [ 3323 tips and 3231 internal nodes ]
refseq() DNASTringSet: [ 3323 reference sequences ]
```

First, we have removed from the dataset all taxa that were present with less than 10 sequences. Afterwards, we have subsampled (with no replacement) all samples to even depth of 35,000 sequences. After doing that, theoretically all samples that had less than the threshold value would be filtered out of the dataset. Since, all samples contained 35,000 sequences or more, all were retained.

1.3. Rarefaction curves

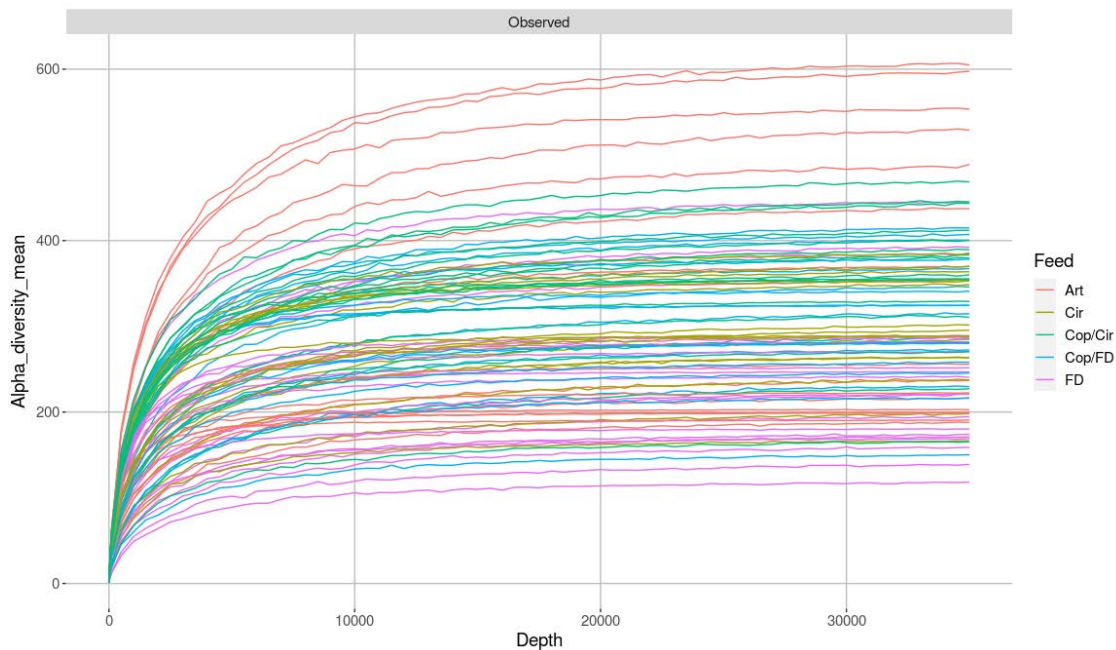


Figure 2. Rarefaction curves

Plotting rarefaction curves with sequencing depth on x-axis (number of sequences per sample) and observed ASVs (species) on the y-axis, one enables to observe how much fraction of the microbiota is actually depicted. If the curves of a sample flattens, that means that with further sequencing it is unlikely that new/additional species will be captured apart from the ones we have already observed. On the contrary, if the curves remain steep, that would indicate that most probably with more sequencing one would find new species.

As seen from figure 2, choosing a threshold of 35,000 sequences for subsampling is optimal, as all of curves flatten out.

One has to be aware that with rarefying one loses a lot of sequence information. E.g. samples that had >80k reads (sequences), by subsampling they have lost >40k reads if the threshold was set at 35,000 reads like we did here. However, this is a necessity for statistical analysis.

2. Diversity analysis

2.1. Alpha diversity

Alpha diversity measure recaptures diversity within sample. In this instance, observed species number is taken into account (*Chao1*) and evenness diversity index (*Shannon*). Shannon diversity index, in addition to species richness (abundance), takes also into account the evenness.

We have assessed alpha diversity on the total dataset between water and larvae sample types, regardless of feed or timeline. Furthermore, we have explored differences in alpha diversity between different feed types in each, water and larvae samples.

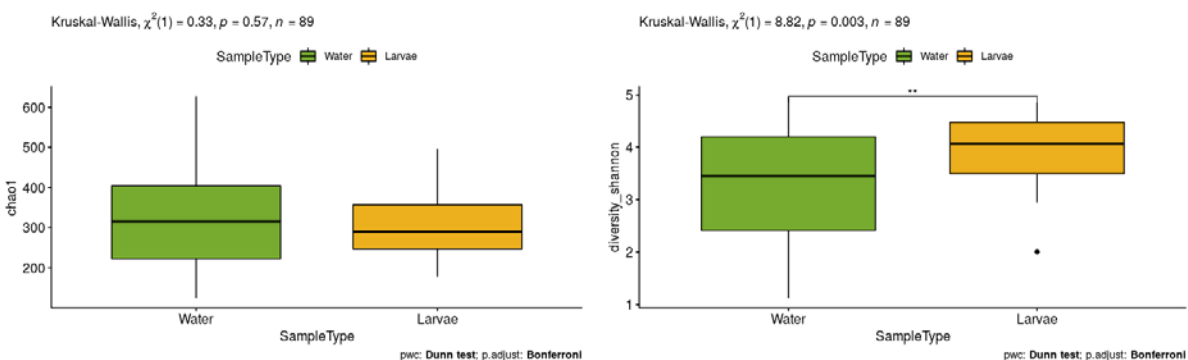


Figure 3. alpha-diversity of water and larvae microbial community

When richness of microbiota is taken into account (chao1), there were no significant difference found between water and larvae samples, considering the complete dataset regardless of treatment or timeline. On contrary, when evenness is additionally calculated (Shannon diversity) there larvae samples showed significantly higher microbial diversity compared to water samples. Taking into account results from both indices, this indicates that water samples are dominated by fewer taxa compared to larvae samples.

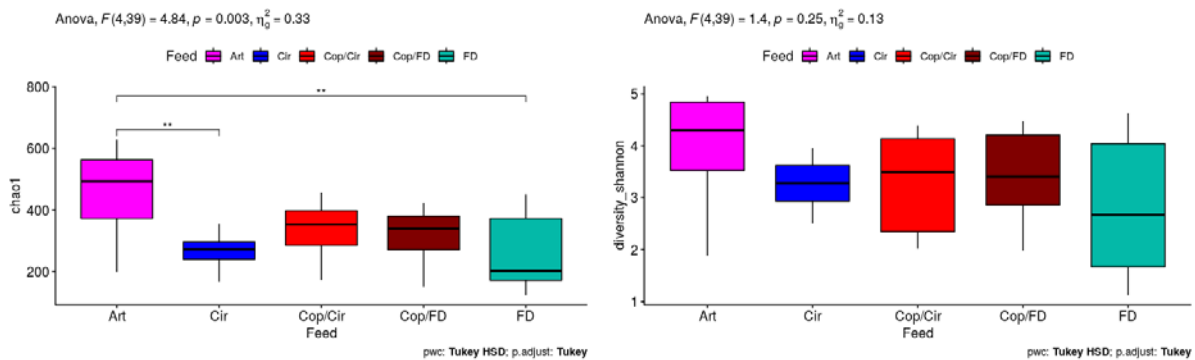


Figure 4. Alpha-diversity of different feed treatments in water samples

When it comes to water microbial community, there were found no differences between feed types when evenness (Shannon diversity) was assessed. Only significant difference was found when number of species was taken into account (chao1). Pairwise comparison showed that Art treatment had significantly higher richness in microbial species compared to Cir and FD treatment.

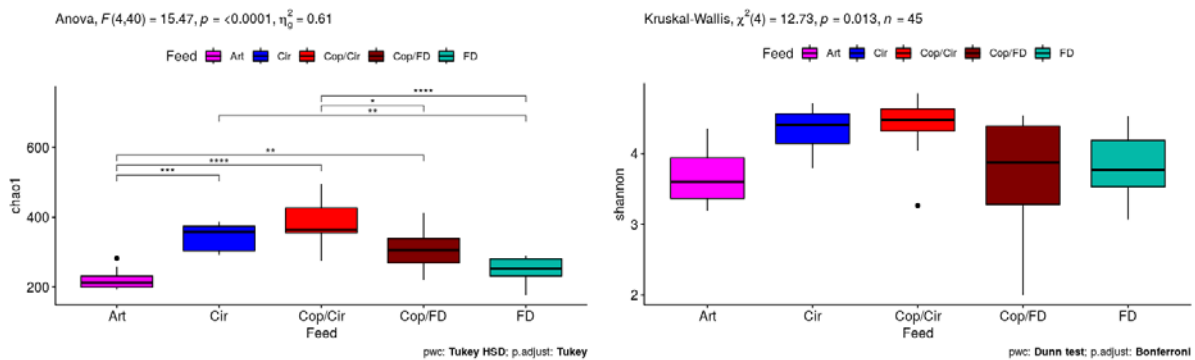


Figure 5. Alpha-diversity of different feed treatments in larvae samples

Considering alpha-diversity of larval microbial community, similarly to water one, no difference were observed when evenness was assessed (Shannon diversity index). However, exploring richness (chao1), significant difference in alpha diversity between microbial communities were found. Copi/Cir treatment was most diverse, while Art least diverse treatment.

2.2. Beta-diversity, or diversity between samples

Unlike alpha-diversity, beta-diversity is a measure of diversity between samples. It is usually depicted by a two-dimensional PCoA plot, as seen here. Here different samples are color coded and time-points are additionally indicated.

How to properly read the plot: Each dot represents total microbial community structure of a sample, placed in 2D space. If two samples would be identical in microbial community

structure, they would perfectly overlap on the plot. The more the samples are diverse, they will appear more distant on the plot.

We will start beta diversity analysis with total dataset and work our way down towards subsets based on metadata.

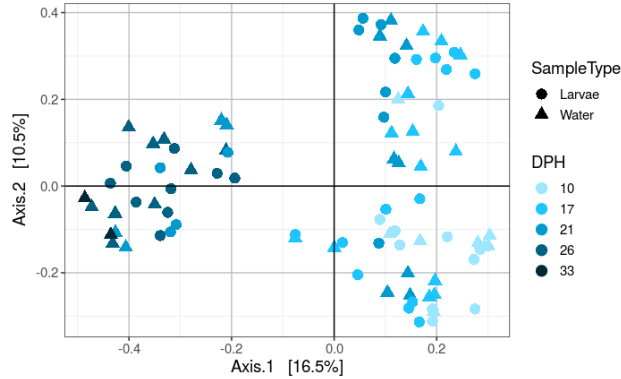


Figure 6. Beta diversity between sample types and according to the timeline

Considering total dataset, there were no apparent differences in microbial community composition between larvae and water microbiota. However, when statistically teste with PERMANOVA, there were found significant differences between water and larvae microbiota (Table 3). Larger differences driving clustering of groups of samples was based on DPH (figure 6). Three cluster of samples can be observed here: right hand lower side with DPH 10 and 17, right-hand upper one with DPH 17 and 21, and left-hand side one with mostly DPH 26 and 33.

Table 3. PERMANOVA statistical test across different types of samples.

	Dataset	PERMANOVA	BETADISPER
Larvae vs. Water	Total	0.001***	0.126
FD vs. Art		0.001***	
FD vs. Cop/FD		0.005**	
FD vs Cir	Water	0.001***	0.736
FD vs. Cop/Cir		0.001***	
Art vs. Cop/FD		0.004**	

Art vs. Cir		0.002**	
Art vs. Cop/Cir		0.001***	
Cop/FD vs. Cir		0.01**	
Cop/FD vs Cop/Cir		0.229	
Cir vs. Cop/Cir		0.037*	
FD vs. Art		0.002**	
FD vs. Cop/FD		0.024*	
FD vs Cir		0.002**	
FD vs. Cop/Cir		0.001***	
Art vs. Cop/FD		0.003**	
Art vs. Cir	Larvae	0.001***	0.28
Art vs. Cop/Cir		0.001***	
Cop/FD vs. Cir		0.001***	
Cop/FD vs Cop/Cir		0.016*	
Cir vs. Cop/Cir		0.019*	

Exploring only a subset of data, reveals some feed and DPH specific clustering for both sample type datasets (water and larvae) (figure 7 and figure 8).

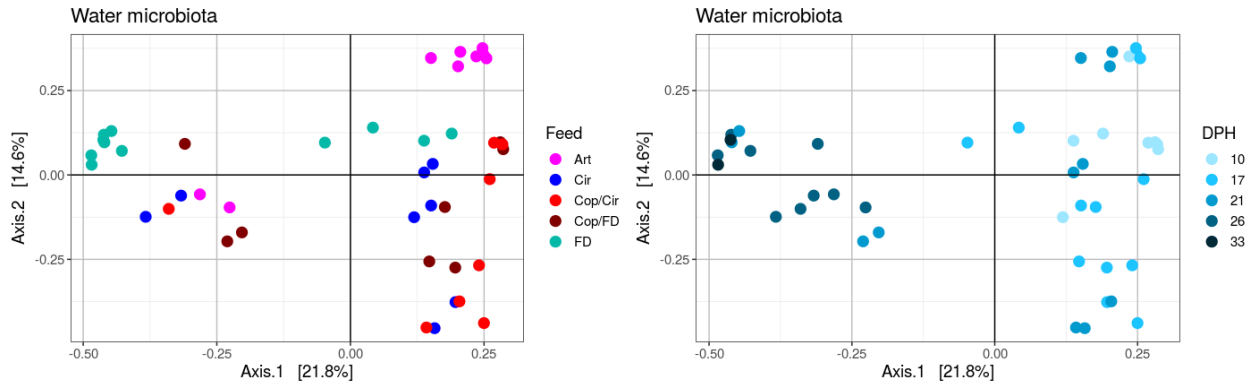


Figure 7. Beta diversity between feed types in water samples and according to the timeline

Two clusters can be observed when exploring water microbial community composition. The right-hand side contains DPH 10, 17, and 21, while the left-hand side contains DPH 26 and 33. In the right-hand side cluster, a small separate sub-cluster based on artemia feed can be seen, as well as a rather vague cluster based on dry feed. Other feed types in that cluster are more interconnected. The left-hand side cluster exhibits distinct clustering of dry feed samples, while others are more similar (figure 7).

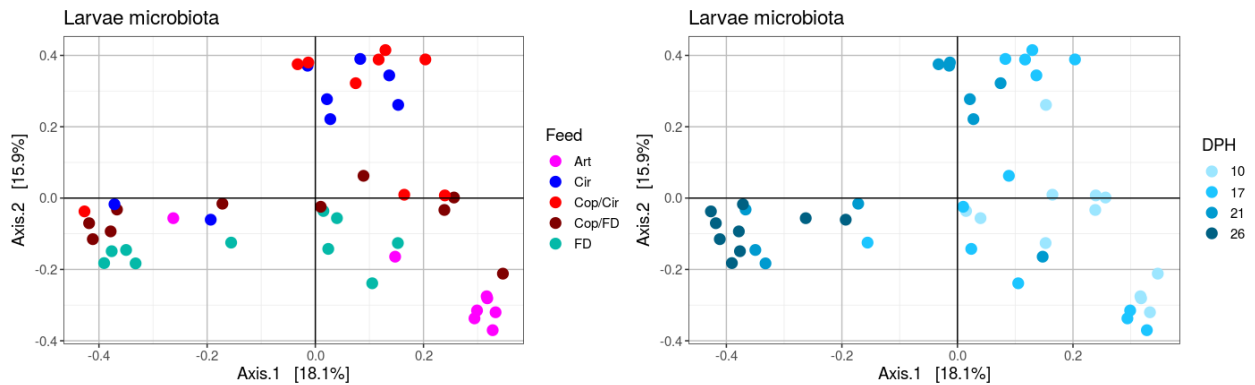


Figure 8. Beta diversity between feed types in larvae samples and according to the timeline.

When it comes to larvae microbiota, two separate clusters driven by the time component are apparent. The right-hand side is defined by DPH 10, 17, and 21, while the left-hand side is defined mostly by DPH 26.

In the right-hand side cluster, a separate sub-cluster of artemia feed is to be seen, also Cirripedia and mix feed clusters are separating from the rest. For the right-hand side, no clear separation can be seen (figure 8).

Separating further down to specific DPH, more differences between feed types can be observed (figure 9 and figure 10).

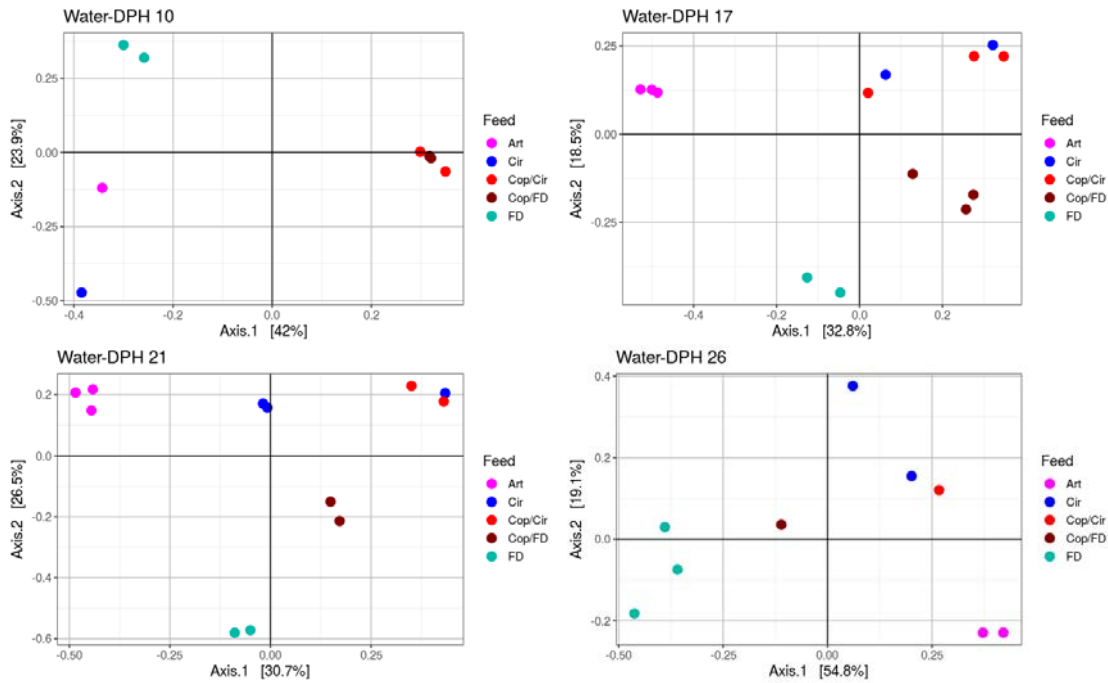
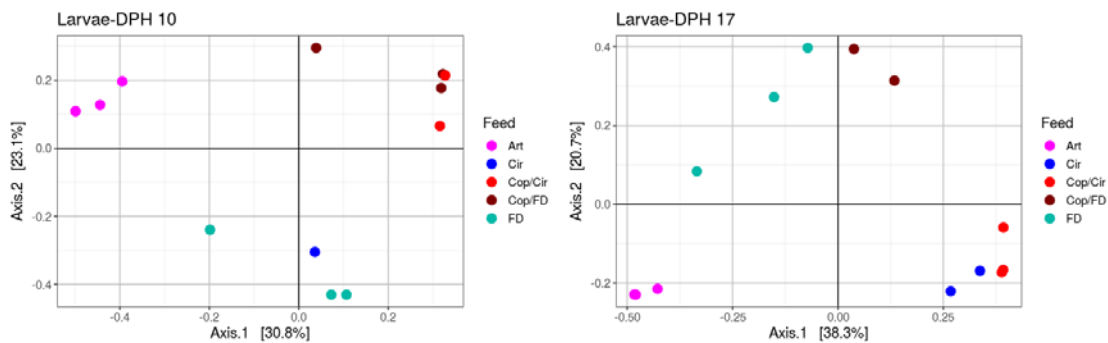


Figure 9. Beta-diversity in water samples fractionated to each sampling day.

At DPH 10 dry feed treatment exhibits different community compared to rest. Mixed treatment is also separated from artemia and cirriped, however a copepod samples seems to have similar microbial community structure. At DPH 17, distinct clusters are observed for each of the treatment, with Cirripedia and mixed treatment sharing similar composition. DPH 21 and 26 similar observation as for DPH 17.



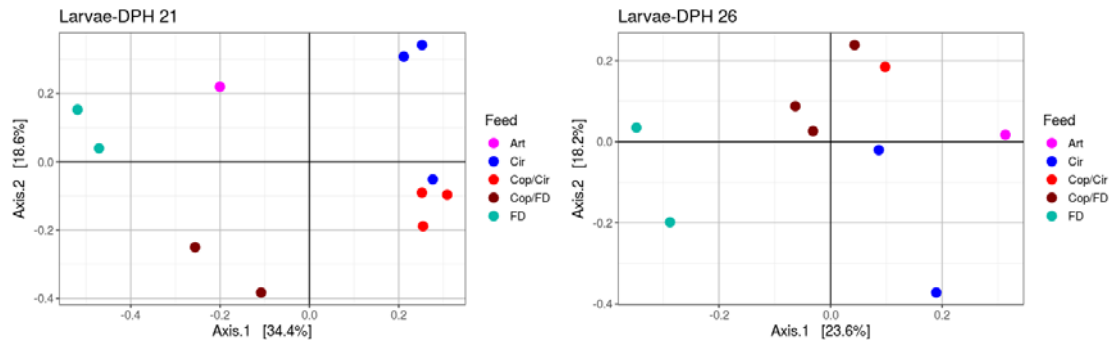


Figure 10. Beta-diversity in larvae samples fractioned to each sampling day.

At DPH 10 for larvae microbiota, artemia treatment showed different microbiota forming a separate cluster. Mixed and copepod treatment formed a separate cluster, while dry and Cirripedia treatment exhibited another cluster. Slightly different clustering was observed at DPH 17, where artemia showed still separate clustering from the rest. However, dry and copepod community showed similarities with cluster on their own. Finally, Cirripedia and mixed treatment larvae showed unique microbiota, similar to water samples. At DPH 21, Cirripedia and mixed treatment showed similar microbiota and cluster away from rest of samples. The other treatments cluster apart as well. DPH 2, dry treatment showed distinct microbiota compared to rest of samples. The other treatments did not exhibit significantly distinct clustering.

3. Visualization of microbial community composition

Art water treatment was dominated by *Nautella* and *Vibrio* genus from the start of monitoring (DPH 10). Thereafter, *Nonlabens* becomes abundant in addition to previously mentioned genera (DPH 17). At DPH 21, *Sulfitobacter* and *Nautella* were most dominating genera. Finally, at DPH 26 *Leucothrix* was dominating community with >70% in abundance.

Cir treatment was dominant in *Tenacibaculum* at DPH10 (only one replicate available). At DPH 17 *Tencibaculum* was still abundant, but increased abundance of *Polaribacter* and *Sulfitobacter* could be observed. By DPH 21 *Plaribacter* and *Sulfitobacter* were still dominating the community, and at DPH 26 *Leucothrix* took over as the most abundant genera contributing ca. 50% of community composition.

Cop/Cir treatment was also high in abundance with *Tenacibaculum* at DPH 10. Other abundant genera included unidentified taxa from *Rhodobacteraceae* family and *Pseudophaeobacter*. In addition to *Rhodobacteraceae*, *Polaribacter* was abundant at DPH 17, and by DPH 21 was dominating total community (> 60%). *Leucothrix* and *Lacinutrix* became abundant at the end of observation (DPH 26).

In Cop/FD

unidentified genera from *Arcobacteraceae* family was most abundant, followed by *Psychromonas* and *vibrio*. *Tenacibaculum* was still abundant. At DPH 21, *Fluviicola*, *Sulfitobacter* and *Leucothrix* were most abundant genera. Finally at DPH 26

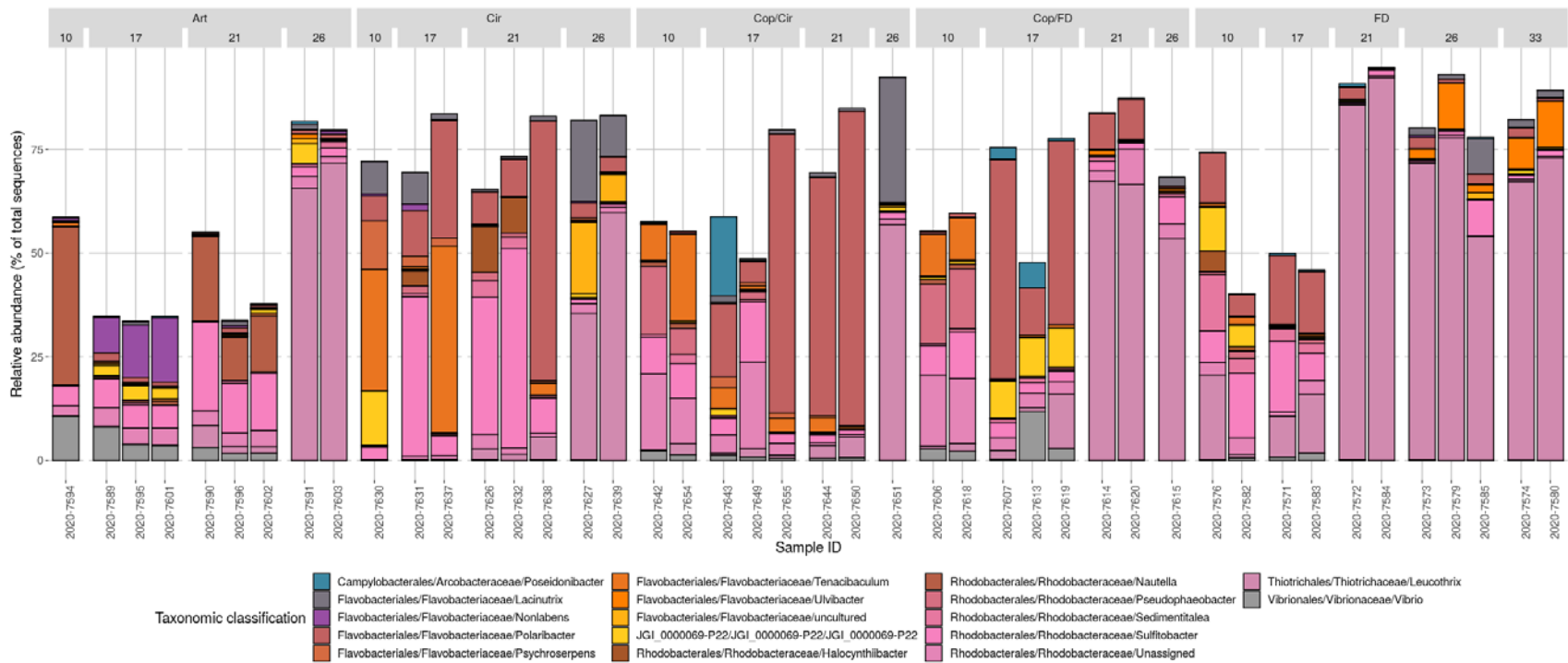


Figure 11. Microbiota composition at Order/Family/Genus level at abundance cut-off of 10% for water samples. Column names indicate treatment, while sub-columns DPH. Sample IDs are represented on x-axis, and relative abundance on y-axis.

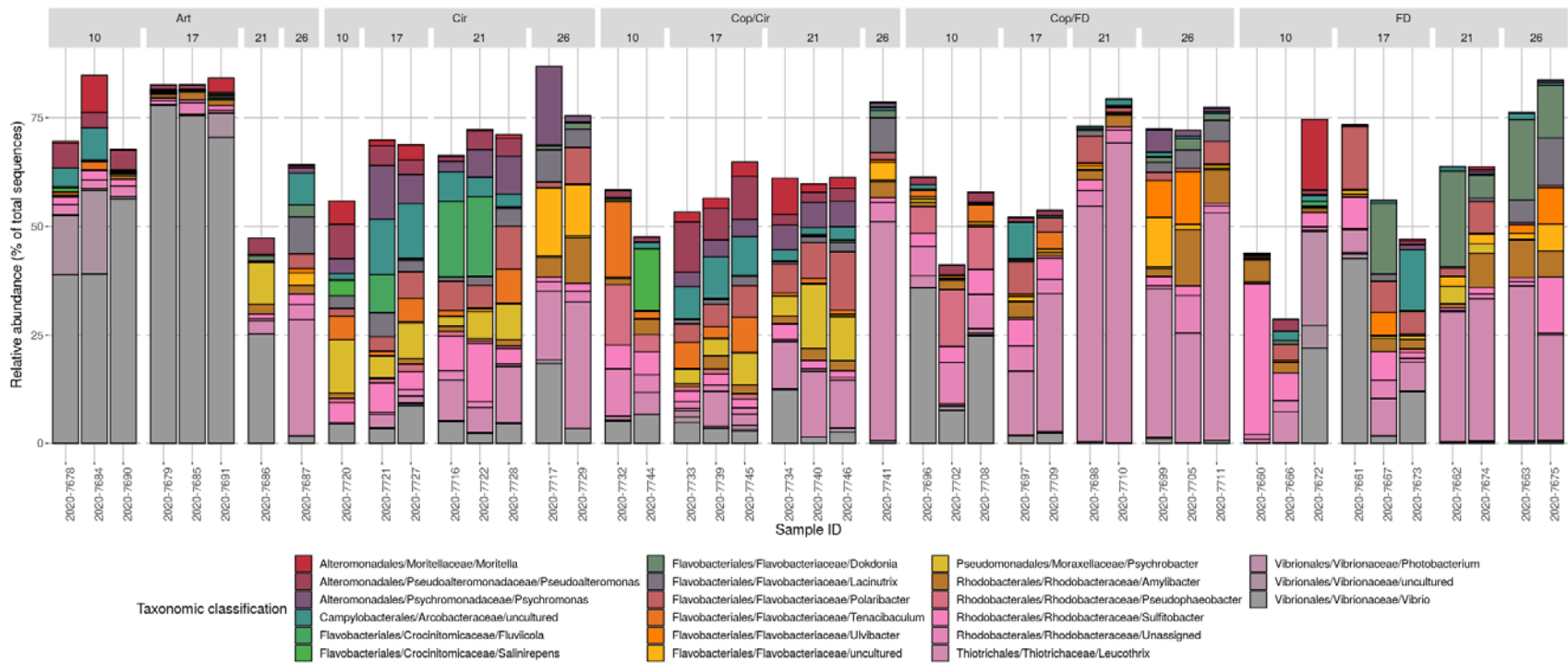


Figure 12. Microbiota composition at Order/Family/Genus level at abundance cut-off of 10% for larvae samples. Column names indicate treatment, while sub-columns DPH. Sample IDs are represented on x-axis, and relative abundance on y-axis

*Appendix C – Data analysis for ballan wrasse egg-quality and start-feeding
experiments (DEB)*

Data analysis for ballan wrasse egg-quality and start-feeding experiments

Tjalling Jager*

April 12, 2021



*DEBtox Research, Stevensweert, The Netherlands (tjalling@debtox.nl, <http://www.debtox.nl/>)

Contents

1	Executive summary	3
2	Data used	6
2.1	General overview	6
2.2	File details	6
2.3	General data treatment	7
3	Relationships length, area and volume	8
3.1	Sphere	8
3.2	Cylinder	9
3.3	Prolate spheroid	9
3.4	Use on wrasse eggs and larvae	10
4	Basic properties	12
4.1	Weights and carbon content	12
4.2	Water content of tissues	13
4.3	Shape-correction coefficient	17
4.4	Arrhenius temperature	20
5	Growth patterns	21
5.1	Egg-quality experiment	21
5.2	Feeding experiment	22
6	Respiration patterns	26
6.1	Egg-quality experiment	26
6.2	Feeding experiment	27
7	Comparison to DEBkiss model	28
7.1	Expected patterns from cod paper	28
7.2	Tries with egg-quality data	29
7.3	Tries with feeding experiment	34
7.4	Closer look at inter-individual variation	40
7.5	Fitting on the feeding experiment	43

1 Executive summary

Several experiments were performed with early-life stages of ballan wrasse, *Labris bergylta*. Separate experiments were performed on the yolk-feeding stages (egg-quality experiments, from fertilised egg till some 8 days post hatch) and the first feeding stages (from 3-50 dph) with different feeding regimes. A range of measurements was conducted, including various weights (dry weight, C and N weight), biometry (length and area of body components), and respiration (oxygen use). In this report, the data are explored from the perspective of bioenergetics: to what extent can we use these data to parameterise a Dynamic Energy Budget (DEB) for ballan wrasse early-life stages, and can we explain differences in life history between the various feeding regimes.

Advantages of using a DEB-based framework:

1. Explain all life-history traits (length, weight, volume, respiration), over time, within a single consistent framework. This also allows to identify inconsistencies in data sets.
2. Account for changes in temperature and food (quality/quantity) over time.
3. A well-calibrated DEB model would allow predictions of growth and development over time under time-varying temperature and food conditions.

Issues with the data set:

1. The feeding experiment was initiated with larvae aged 3 dph. However, these larvae does not match the animals of similar age in the egg quality experiment. The animals in the start-feeding experiment had a much lower yolk volume and lower dry-weight density than similar-aged larvae in the egg-quality experiment. This raises questions about the comparability of the two sets of experiments.
2. The initial carbon and nitrogen contents per dry weight in one set of measurements from the feeding experiment ('respiration data set') do not make biological sense. This likely relates to a experimental problems with the dry-weight measurements.
3. The results from another set of measurements (the 'extra data set'; weights and SL on individuals from the same tanks) do not match the results from the other series of measurements (the 'respiration data set'), and seem to be shifted. The extra data also shows a different growth pattern than the other data sets from the same experiment. Even though the animals were sampled from the same tanks, there is a rather consistent difference.
4. The data for the yolk-feeding stages can only be understood if there are large shifts in water content in yolk and structural tissues over ontogeny. However, the weight measurements do not distinguish between yolk and structural biomass, which hampers the bioenergetic interpretation.

5. In the feeding experiment, variation in the data sets is very large. Individuals differ up to a factor of 10 in dry weight and body volume, at the same time point, in the same treatment. For SL, the difference is up to a factor of 2. This makes it difficult to see growth and development patterns in the data, and hampers comparison of the treatments.

Specifically, there are several issues that prohibit meaningful DEB-based modelling:

1. The patterns in yolk depletion and growth are very different from those observed in cod yolk-feeding stages. The DEB model could describe cod well, but does not suffice for ballan wrasse. Model modification is needed for wrasse, but this is complicated by the unexpected large shifts in water content over development (which cannot be quantified from the current data set). A consistent-yet-simple model for the yolk-feeding stages of wrasse therefore requires considerable further study.
2. In the feeding experiment, the animals are switched to different food types several times during the experiment. For the preliminary model analysis, the choice was made to only include the last switch (to dry feed) in the model; otherwise, the number of free model parameters would be much too large given the strength of the data set. Additional complication is that there is no control treatment that can be considered *ad libitum* conditions (over the entire experimental period). Therefore, there is no objective reference.
3. The large variation between individuals in the feeding experiment makes it impossible to perform meaningful model analysis: the average response from such a diverse cohort is unlikely to represent the response of an average individual (see also [9]).

General learnings:

1. Measurements of body length and projected body area appear to be suitable to estimate body volume. There is no possibility to validate these estimates by direct measurement, but the results are very reasonable.
2. Measurements of C and N content have little added benefit for wrasse. Yolk and structure apparently have a very similar composition, so these measurements cannot be used to separate them. For one data set, we used the C content to estimate dry weight, as the direct dry-weight measurements were highly suspect. However, this likely relates to problems with the weight measurements that need to be avoided.
3. C content is around 0.44 mg/mg, and N content around 0.096 mg/mg. These values seem to be quite constant over the early life stages, and seem to hold for both yolk and structural biomass.
4. There seem to be large shifts in water content across the yolk-feeding stages. Both structure and yolk seem to change. The fresh egg has a dry-weight density of 0.26 mg/mm³. In feeding larvae, post-depletion of the yolk sac, the density is approximately 0.12 mg/mm³. Yolk density appears to increase rapidly after fertilisation, as

inferred from a rapid decrease in volume that cannot be explained by metabolic usage of the yolk. Structural biomass density appears to decrease steeply after hatching.

5. An Arrhenius temperature of around 9900 K seems to be appropriate for wrasse. This allows correction of growth and development for different (or time-varying) temperatures.
6. Yolk-sac larvae stop growing before the yolk sac is entirely depleted. This is not what was expected based on work with Atlantic cod, and does not match the current DEB model structure.
7. Wrasse larvae change in shape after yolk-sac depletion. This shape-change occurs roughly between a standard length (SL) of 4-8 mm. SL is thus a poor proxy for body mass in this size range. Until 7-9 dph, the shape correction coefficient is quite constant around 0.144, but after that increases to approximately 0.29 (a much more 'rounded' animal).

Some preliminary conclusions that can be drawn from the limited DEB analyses:

1. The DEB parameters for ballan wrasse do not seem to be very different from those of Atlantic cod, when corrected for temperature.
2. The results from the feeding experiment indicate that the copepods treatment outperforms the other treatments, and that the cirriped treatment performs worst. The switch to dry feed around 34 dph is associated with less-than-optimal performance.

Potential for improvement:

1. Understanding the bioenergetics of the yolk-feeding stages of wrasse would require more detail on the properties of yolk and structure (e.g., water content), and how they change over development.
2. In the feeding experiments, inter-individual variation must be decreased or controlled. If variation is increased by inter-individual competition, different feeding/housing conditions may improve the situation. Different measurements should, as much as possible, be conducted on the same individuals (or at least on the same sample).
3. The experimental design was rather fragmented; in retrospect, the design attempted to answer too many questions at the same time. To parameterise a DEB model, a more focussed and simpler test design, driven by the model's requirements, would have been preferable.

2 Data used

2.1 General overview

Two series of egg quality experiments were performed: an extensive experiment (with replication) for one set of eggs (BG-1), and a more limited experiment (no replication) with eggs from several sources. These two sets of experiments were performed at slightly different temperatures. For each set of experiments, there were two separate samplings for different measurements:

1. Dry weight, carbon content, nitrogen content, respiration rate. Measurements on eggs and yolk-sac larvae. Measurements on groups of individuals: 1-8 per data point.
2. Biometry of larvae: yolk area/length/height, body area, standard length, myotome length/height. For the BG-1 experiment, there are also biometrical measurements on the eggs (egg and yolk diameter). Measurements on individuals.

A feeding experiment was performed, starting with larvae 3 dph, and using four different feeding regimes. Temperature was increased over the course of the experiment. There were three separate samplings for different measurements:

1. Dry weight, carbon content, nitrogen content, respiration rate. Measurements on groups of individuals: 1-8 per data point. Additionally, standard length was measured.
2. Biometry of larvae: yolk area/length/height, body area, standard length, myotome length/height. Measurements on individuals.
3. An extra set of measurements on standard length and dry weight. Measurements on individuals.

2.2 File details

Excel file `DataForTjalling.xlsx` received from Arne 13 August 2020. This file contains data from three experiments: two with non-fed early life stages (the ‘egg-quality experiments’, following eggs and yolk-sac larvae in absence of food), and one starting with larvae, 3 days after hatch, and including food (the ‘feeding experiment’). The first egg-quality experiment used eggs from one source (BG-1) and has several replicates. The second used eggs from different sources and has no replication (on data point at each sampling time point). Measured endpoints are dry weight, carbon content, nitrogen content, respiration rate. For the feeding experiment, additionally, standard length was available. Arne added data points for standard length in the feeding experiment at $t = 3$ dph by email on 18 September 2020.

Excel file `AP-1 ballan wrasse biometry.xlsx` received from Björn-Henrik on 31 August 2020. This file contains biometrical information from pictures taken in the egg-quality

experiment. These are different replicates than those used for the dry weight and respiration measurements. Measured endpoints are yolk area/length/height, body area, standard length, myotome length/height.

Excel file `DataForTjalling biometry.xlsx` received from Björn-Henrik on 16 September 2020. This file contains biometrical information from pictures taken in the feeding experiment. These are different replicates than those used for the dry weight and respiration measurements. Measured endpoints are yolk area/length/height, body area, standard length, myotome length/height.

Excel file `Berggylt egg biometry.xlsx` received from Björn-Henrik on 21 September 2020. This file contains biometrical information from pictures taken in the first egg-quality experiment (BG-1). Measured endpoints are egg diameter and yolk diameter (at largest and smallest width).

Excel file `LW Data.xlsx` received from Arne on 12 October 2020. This file contains additional measurements from the feeding experiment, taking only standard length and dry weight.

2.3 General data treatment

Any method for bio-energetic analysis of growth and development requires proper estimation of the actual size of the yolk and larval structures. Length measures are only useful if the organism retains a constant shape, which is certainly not true for the early life stages of fish. Dry weights are useful, but for the yolk-feeding stages, we need to consider that dry weight has contributions from both yolk and structure (which are not easy to separate). Before we can relate the measurements to the DEBkiss-based fish embryo model [11], we thus need to establish relationships between various length measures, volumes and weights.

Measurements on weights, N/C content, and respiration were performed on pooled groups of animals. These results are recalculated per individual egg/larva. I assumed that the respiration rates are from the number of individuals that are reported to have been entered into the respiration chamber. Dry weight, carbon weight and nitrogen weight are from animals that have been taken out of the respiration chamber (which, in some cases, is a bit less). I also included, for the moment, the measurements where doubts were placed in the Excel file about whether they should be used. The yellow bar in the plots shows the approximate time of hatching. For BG-1, this was between day 6 and 7, and for the experiment with different egg sources between day 7 and 8.

3 Relationships length, area and volume

The pictures taken from the animals can be used to estimate lengths, areas and biovolumes for yolk and structural tissues. For estimating volumes, we need to assume a matching geometric shape for the various elements. The relationships between linear size measures and areas/volumes of various geometric shapes are taken from Wikipedia and recalculated into the desired form below.

3.1 Sphere

A sphere (<https://en.wikipedia.org/wiki/Sphere>) is a special case of an ellipsoid where all axes are of equal length. I will use the equations for a sphere to calculate egg volume from diameter.

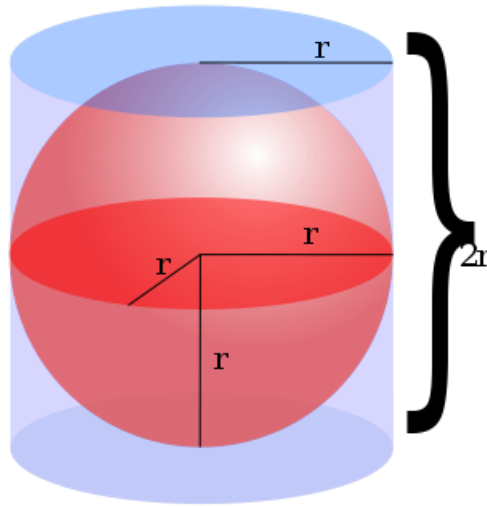


Figure 1: Sphere with radius r .

Volume is calculated from radius (r) or diameter (L):

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi(L/2)^3 \quad (1)$$

We could also use the projected area of the sphere, which is a circle with radius r (<https://en.wikipedia.org/wiki/Circle>):

$$A = \pi r^2 \rightarrow r = \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (2)$$

Volume is then related to projected area as follows:

$$V = \frac{4}{3\sqrt{\pi}}A^{3/2} \quad (3)$$

3.2 Cylinder

A cylinder (<https://en.wikipedia.org/wiki/Cylinder>) is probably a useful approximation for the structural biovolume of larvae post hatch. Especially when using the projected area and total length. This is the relationship used by [19] for the lipid sac of *Calanus finmarchicus*, and, in [20], we also used it as approximation of prosome volume for these copepods.

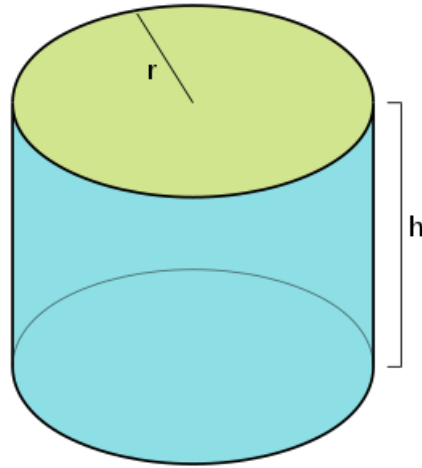


Figure 2: Cylinder.

Volume of a cylinder from radius (r) and height (h), or in length ($L = h$) and width ($W = 2r$) of the cylinder:

$$V = \pi r^2 h = \frac{\pi}{4} W^2 L \quad (4)$$

Projected area of the cylinder (A) is a rectangle with sides $2r$ and h , which can be used to derive r from area and height:

$$A = 2rh \rightarrow r = \frac{A}{2h} \quad (5)$$

Volume can then be calculated from area and length as follows:

$$V = \frac{\pi A^2}{4h} = \frac{\pi A^2}{4L} \approx 0.79 \frac{A^2}{L} \quad (6)$$

3.3 Prolate spheroid

The prolate spheroid (<https://en.wikipedia.org/wiki/Spheroid>) is often used as approximation for non-spherical eggs, lipid/yolk sacs, nauplii and prosome of copepodites. Here, I will use this shape to represent the yolk in eggs and in yolk-sac larvae.

Volume of a prolate ellipsoid can be calculated from the small and large semi-axes (a and c), or from length and width (L and W):

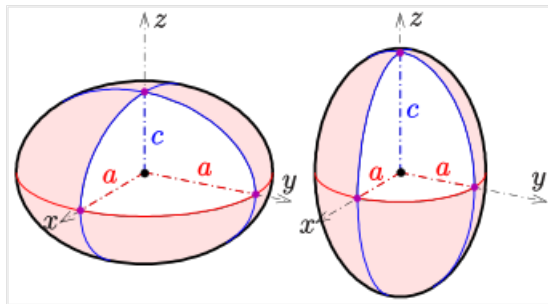


Figure 3: Ellipsoid oblate (left) or prolate (right).

$$V = \frac{4}{3}\pi a^2 c = \frac{4}{3}\pi (W/2)^2 (L/2) \quad (7)$$

Projected area of the spheroid is an ellipse (<https://en.wikipedia.org/wiki/Ellipse>). Area of an ellipse from small and large radius (a and c):

$$A = \pi a c \rightarrow a = \frac{A}{\pi c} \quad (8)$$

Filling in leads to:

$$V = \frac{4}{3} \frac{A^2}{\pi c} \quad (9)$$

Since $c = L/2$, volume can be calculated from project area and length as follows:

$$V = \frac{8}{3\pi} \frac{A^2}{L} \approx 0.85 \frac{A^2}{L} \quad (10)$$

The difference in assuming a cylinder or prolate spheroid for estimating volume from area and length is thus very small (less than 10%), so an inappropriate choice of shape here does not lead to strong bias. Note that a sphere is just a special case of a spheroid ($a = c$).

3.4 Use on wrasse eggs and larvae

For the eggs, I assume a sphere for the total egg (excluding the gum layer) and a prolate spheroid for the yolk. Just after fertilisation, the yolk sac is quite spherical, but its shape changes over development in the egg (Figure 4). A prolate spheroid seems like a good approximation. Volume is calculated from two length measurements (longest and shortest diameter).

An example of two pictures of wrasse larvae is shown in Figure 5. I will use the relationships for the prolate spheroid to calculate the volume of the yolk sac from area and length. The structural area of the larva is calculated as the total area minus the yolk-sac area. The structural area is combined with myotome length into a structural volume, assuming the relationship for a cylinder.

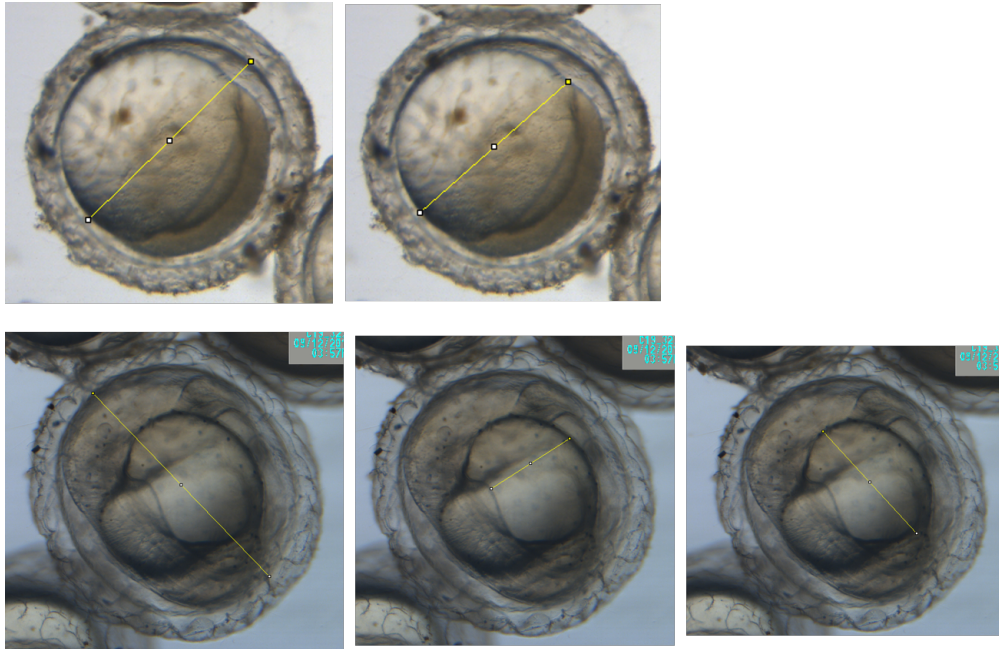


Figure 4: Pictures of eggs just after fertilisation (top row) and shortly before hatching (bottom row), showing the length measurements on the total egg and the yolk sac.

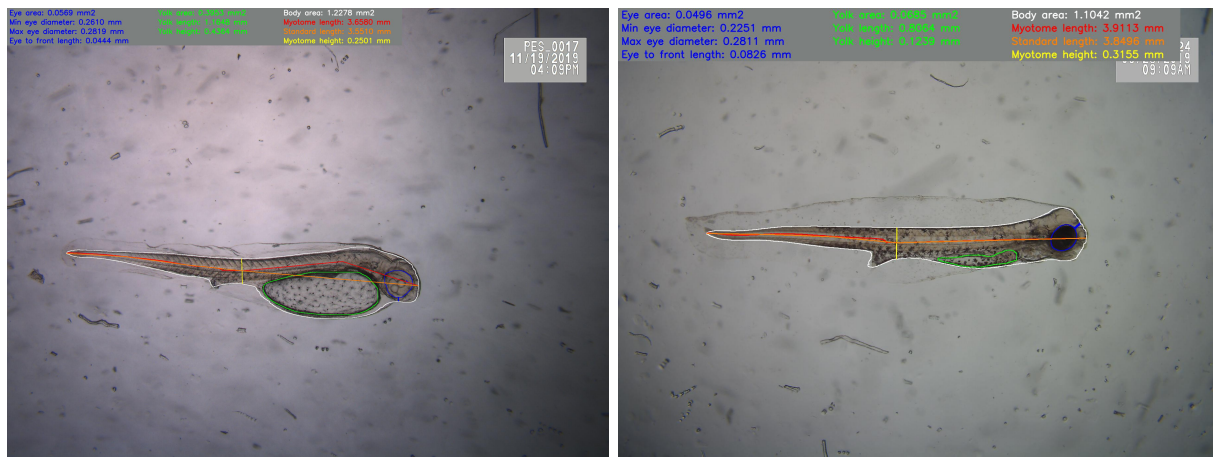


Figure 5: Pictures from early (left) and late (right) yolk-sac larvae of ballan wrasse. Measurements are indicated.

4 Basic properties

4.1 Weights and carbon content

Starting with the feeding experiment, Figure 6 shows C/dwt and N/dwt. These data show an increase in both elements over time. This is clearly unrealistic, as it suggests an inorganic fraction of the dry weight decreasing over time. Furthermore, the initial C/dwt and N/dwt in the feeding experiments are much lower than the values in the egg-quality experiments at similar age (see Figure 9). Therefore, I assume that this is a structural error in the dry weight measurements, and that the C-weights are a more reliable measure of biomass. Taking only the measurements at $t > 30$ dph, the relative C-content stabilises at 0.44 mg C/mg dwt. This is quite comparable to the value for cod used earlier (0.40 mg C/mg dwt [11]).

The left panel compares directly measured dry weight and dry weight estimated from C-content, using 0.44 mg C/mg dwt. For the high weight values, the results are the same, but there is a structural deviation for the small weights, for all feeding treatments. There is also no meaningful difference, in this comparison, between the treatments.

Conclusions: C-weight is more reliable than dry weight. For structural tissue, a relative C-content of 0.44 mg/mg is appropriate, and a relative N-content of 0.096 mg/mg.

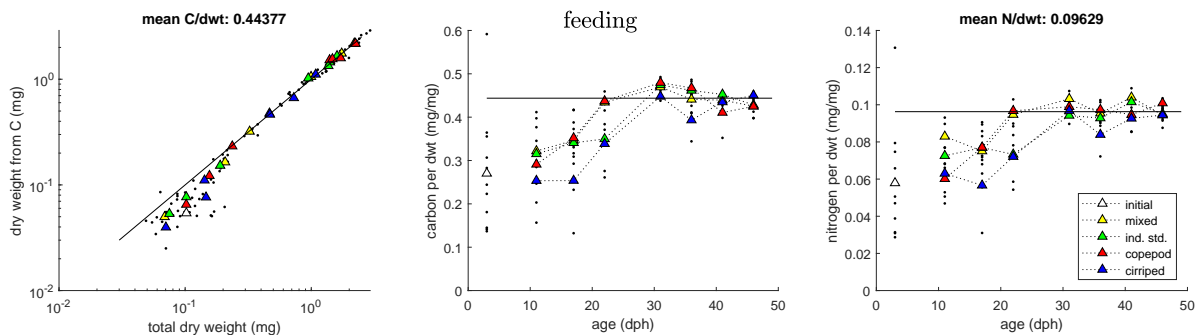


Figure 6: Carbon and nitrogen content as fraction of dry weight (second and third panel). Horizontal line is the overall mean for the data $t > 30$ dph. First panel shows the comparison of the measured dry weight to the dry weight estimated from C content and a C/dwt ratio of 0.44 mg/mg (line shows the 1:1 relation).

An additional set of animals were measured in the feeding experiment, on which only standard length and dry weight were determined. These are compared to the dry weights from the original data set in Figure 7. This shows that there is a typical difference between the dry weights from the original data set and the extra data set: the latter weigh less, and the difference is (relatively) larger for small individuals. When dry weight is estimated from C-content, there is still a difference, but with a rather constant factor across all weights. There is also a consistent difference in the standard lengths between both data sets. For some reason, the animals from the extra set are smaller, both in terms of dry weight and of standard length, than the animals in the original data set. The extra data set also provides a very different view on the growth patterns (Figure 8). In the original data set, growth

almost stops after $t = 30$ dph, while the extra data set shows continued growth throughout the experiment. This is surprising, given that these animals were sampled from the same tanks as those for the other sets of measurements.

Conclusions: this supports the earlier assumption that dry weights from the original data set are unreliable. Dry weight estimated from C-content will be used instead, for this set of measurements. In principle, the dry weights versus age from the extra set could be used, but the original data set also contains respiration rate, which was determined on the same animals. Since respiration is closely link to body weight, it makes sense to focus on measurements taken from the same group of animals. However, the structural difference between the data sets is worrying.

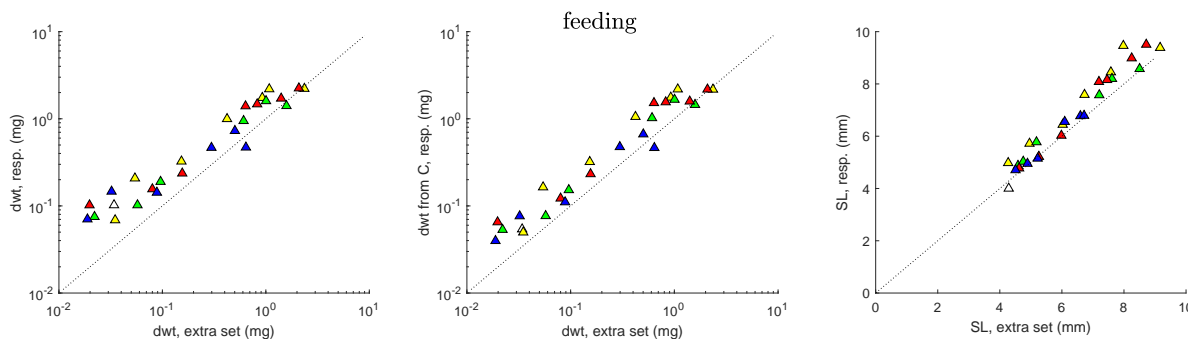


Figure 7: Comparison of mean dry weight from the original data (that included C, N and respiration measurements) to the data from the extra data set (SL and dry weight only) in the left panel. Middle panel compares the extra data set to the dry weight estimated from C-content. Right panel compares the standard lengths in both data sets.

Figure 9 shows the relative C and N content of the eggs/larvae in the two egg-quality experiments. There seems to be a slight decreasing trend over time, but overall the values for yolk-feeding stages match those for the late-stage feeding larvae (Figure 6). There is one strange high value at the first time point. This seems to relate to an unrealistically low dry weight. The more-or-less constant C and N content implies that yolk and structure must have a very similar composition. The slight decrease over time may relate to uptake of ions such as calcium from sea water, but could also be a bias in the measurements.

Conclusions: the results for the yolk-feeding stages support the assumption that the weight measurements in the first part of the feeding experiment are off. We can use the same relative carbon and nitrogen contents for yolk-feeding stages as for the feeding stages. Yolk has approximately the same C and N content per weight unit as structure. We cannot use the C and N measurements to distinguish between yolk and structure (as was for example done in [12] to distinguish between structure and lipid storage in copepods).

4.2 Water content of tissues

Starting with the feeding experiment, Figure 10 shows the dry-weight density of the larvae over time. Dry weight is either directly measured (left) or estimated from C-content (right). Volume is estimated from the pictures as explained in Section 3.4. Shortly after hatching,

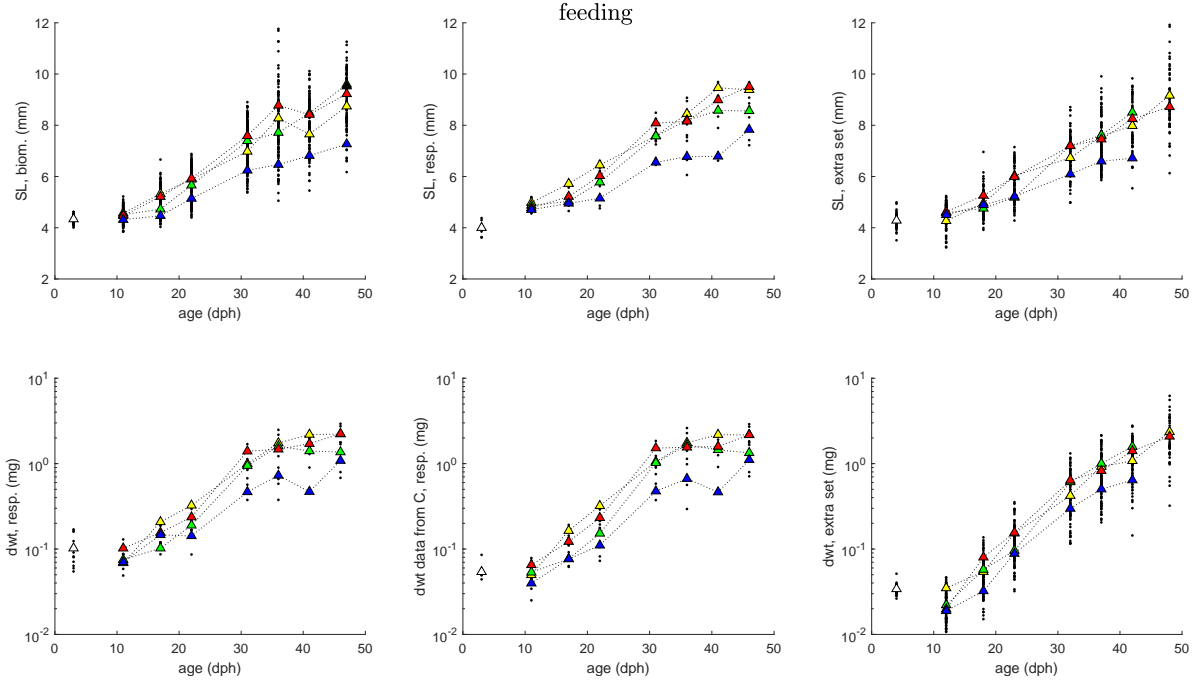


Figure 8: Comparison of growth patterns (standard length in top panels, dry weight in bottom panels) between the original data (that included C, N and respiration measurements) and the data from the extra data set (SL and dry weight only).

density appears to be quite large. If we focus on the dry weights estimated from C-content, dry weight density from $t = 10$ dph onwards is rather constant at 0.12 mg/mm^3 . Variability between the estimates increases towards the end of the experiment. However, it should be stressed that volume and dry weight were not established on the same individuals. An increasing variation between animals as the experiment progresses could easily lead to variation in these density estimates. It is therefore unlikely that these patterns reflect actual differences between the treatments.

The value of 0.12 mg/mm^3 is comparable to the 0.15 mg/mm^3 established for cod larvae [11]. The density at $t = 3$ dph is much higher, which could relate to the presence of yolk or to a different dry-weight density of structure for the larvae shortly after hatch. Since the yolk sac is only a tiny part of the total animal here (structure and yolk volumes are some 0.3 and 0.006 mm^3 , resp.), yolk density cannot explain this high value.

Conclusions: a dry-weight density of 0.12 mg/mm^3 is appropriate for structural biomass for the feeding larvae after complete absorption of the yolk sac. For cod, good results were obtained by assuming the same value for the yolk-feeding stages as well [11]. However, we have no direct evidence that this is appropriate for wrasse as well, and the data suggest higher densities for structure shortly post-hatch.

Figure 11 shows the dry-weight density as estimated for the first egg-quality experiment (BG-1). Again, dry weight was either measured or estimated from C-content. Total egg volume was derived from the diameter of the total egg. For the yolk-sac larvae, total volume was calculated as the sum of the estimated volumes of yolk and structural biomass.

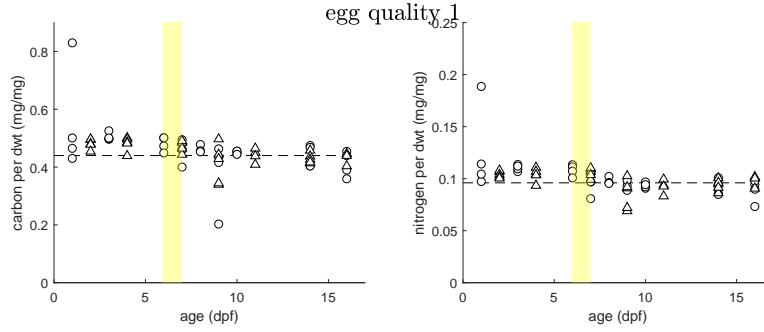


Figure 9: Carbon and nitrogen content as fraction of dry weight. These are the combined data for the BG-1 experiment (circles) and the second experiment with eggs from different sources (triangles). Broken lines are the values established for late-stage larvae in Figure 6 (C-density of 0.44 mg/mg and N-density of 0.096 mg/mg).

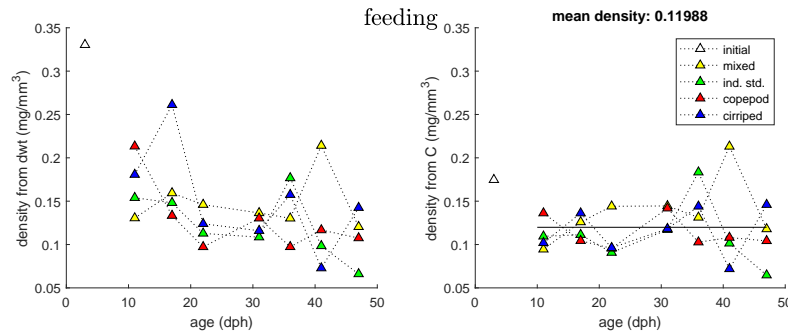


Figure 10: Dry weight density in the feeding experiment across age and treatments (shown in different colours). Left panel is with measured dry weight, and right panel with dry weight estimated from C-content. Estimates can only be made when weights and pictures were measured/taken at the same time point.

Several striking observations can be made from these estimates. Firstly, initial dry-weight density is very high around 0.26 mg/mm^3 . Initially, most of the egg is yolk, and for cod, we established a dry-weight density for yolk of 0.0745 mg/mm^3 [11]. However, there seems to be typical difference in yolk hydration between pelagic and demersal eggs [2]. For the latter, a water content of 68% was reported for eggs of the sand goby, and 74% for herring. For ballan wrasse, Finn *et al* [6] report a water content of 76%, which is very close to what we see in Figure 11. However, it is good to realise that the density of the fresh egg does not necessarily equal the density of yolk. The estimated volume of the total egg (excluding the gum layers) is approximately 0.4 mm^3 , while the yolk makes up some 0.25 mm^3 . The rest is structure, chorion and perivitelline space. However, since the largest part of the egg is yolk, the dry-weight density of yolk should not be radically different from 0.26 mg/mm^3 .

Second observation is that there is a huge step-up in dry-weight density at hatching. Density decreases over the egg stages, which represents the yolk resources that are burnt to fuel development and maintenance, while the overall volume of the egg remains rather

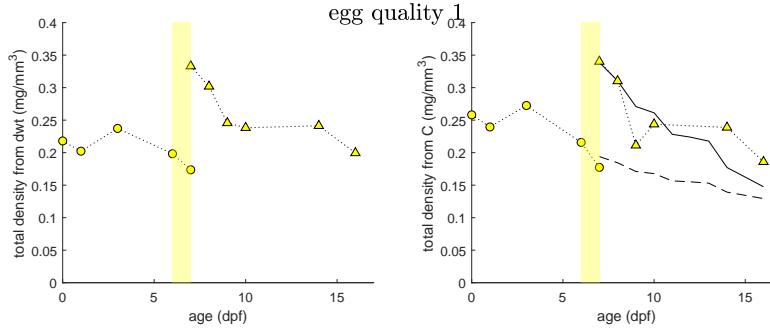


Figure 11: Dry weight density in the egg-quality experiment across age for BG-1 only. Left panel is with measured dry weight, and right panel with dry weight estimated from C-content. Circles are measured on eggs, triangles on larvae post hatch. Solid line in the right plot provides a crude estimate based on a dry-weight density of 0.12 mg/mm^3 for structure and a guessed 0.80 mg/mm^3 for yolk; broken line assumes 0.35 mg/mm^3 for yolk. Estimates of density can only be made when weights and pictures were measured/taken at the same time point (exception is made for the value at $t = 0$, which uses the dry weight at $t = 1$).

constant (implying uptake of water). The step-up at hatching indicates that, just before hatching, the egg contains a lot of water that is not part of the yolk or structure (presumably in the perivitelline space), that is lost at hatching.

For the (late) feeding stages, I established a dry-weight density for structural biomass of 0.12 mg/mm^3 . Let's assume that this value also holds for early stages. Shortly after hatching, the yolk sac is not so prominent anymore, so its density should not greatly affect overall density. Therefore, the value around 0.35 mg/mm^3 for total density shortly post hatch is odd. We need to assume a value of some 0.80 mg/mm^3 for yolk density to match the pattern in the data, taking the actual ratio of yolk versus structural volume. However, a yolk water content of only 20% seems quite unrealistic.

The initial value in the feeding experiment (Figure 10) indicates a total density of $0.17\text{-}0.18 \text{ mg/mm}^3$ (assuming that carbon-based dry weight is most accurate). This is considerably lower than the values in Figure 11. The initial time point of the feeding experiment is 3 dph, which should correspond to 10 dpf. However, the yolk content of the larvae 3 dph in the feeding experiment is much lower, and the structural volume much larger, than those of supposedly similar-aged larvae in the egg-quality experiment (in fact they are more similar to the larvae at 16 dpf). Clearly, there is some inconsistency between these sets of experiments.

Looking at the second egg experiment (eggs from different sources, Figure 12), we see an even clearer decrease in the estimated dry-weight density after hatch (fewer pictures of eggs were taken in this experiment, and they did not allow meaningful biometrical analysis). The decrease in density can be captured by yolk depletion, but again only by assuming an unrealistically-high density for yolk. It is possible that the early larval structure has a higher density than the later stages (so water content would increase post hatch), or that the volume estimation is biased. As an alternative explanation, structural density may

have decreased considerably post hatching. Unfortunately, we do not have more direct evidence for this process. Changes in water content over early development have been reported [13, 4], although not to the extent needed to explain the current data set.

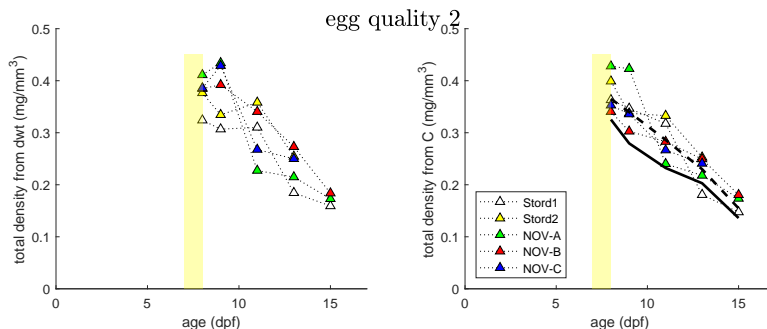


Figure 12: Dry weight density in the egg-quality experiment 2 (different egg sources). Left panel is with measured dry weight, and right panel with dry weight estimated from C-content. Symbols are individual observations (2-8 individuals pooled). Since the weight/carbon and length/area measurements were mostly not made at the same time points, the weights were interpolated to the time points of the length/area measurements. Solid line in the right plot provides a crude estimate based on a dry-weight density of 0.12 mg/mm^3 for structure and a guessed 0.80 mg/mm^3 for yolk. Broken line uses a rather arbitrary 0.40 mg/mm^3 for yolk, and a linearly decreasing density from $0.35\text{-}0.12 \text{ mg/mm}^3$ over time for structure.

Conclusions: dry-weight density of a fresh egg seems to be around 0.26 mg/mm^3 . We may expect the density of yolk to be somewhere in the neighbourhood of this value (at least initially). Note that the fresh egg is not completely consisting of yolk: the chorion etc. will also contribute to the dry weight. In the late feeding larvae, structural density is around 0.12 mg/mm^3 . However, the data suggest that it is higher in the yolk-feeding stages, and decreasing over development. The animals at the start of the feeding experiment are very different from the animals from the egg-quality experiment at similar age (they have less yolk and a lower density).

4.3 Shape-correction coefficient

Figure 13 shows the shape-correction coefficient for the larvae post-hatch in the egg-quality experiment (BG-1). The shape coefficient is the volumetric length (cubic root of structural volume) divided by the actual length (here: standard length). A cube has a shape coefficient of 1, and smaller values mean a more elongated animal. The coefficient is rather constant over the test at a value of 0.144. For cod larvae, a similar value of 0.157 was established [11].

Figure 14 shows the shape-correction coefficient for the larvae post-hatch in the second egg-quality experiment (eggs from different sources). These results are quite comparable to those for BG-1 although there seem to be somewhat higher values immediately post hatch and by the end of the experiment.

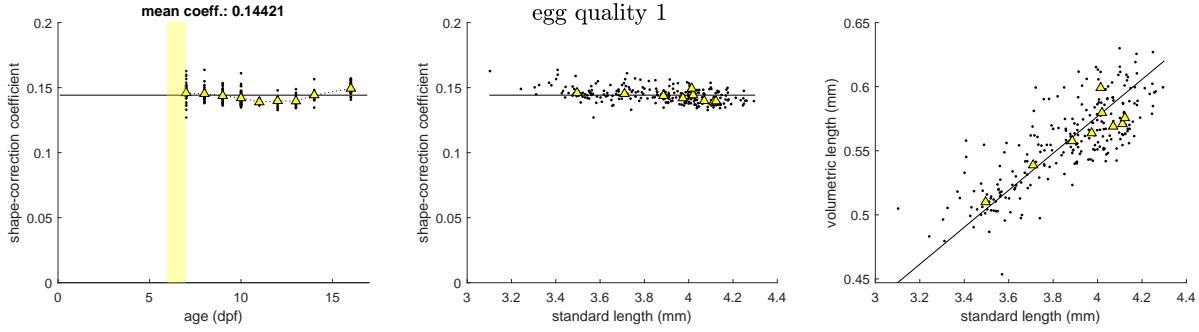


Figure 13: Shape-correction coefficient for yolk-feeding stages of BG-1, as calculated from standard length and the cubic root of estimated structural volume.

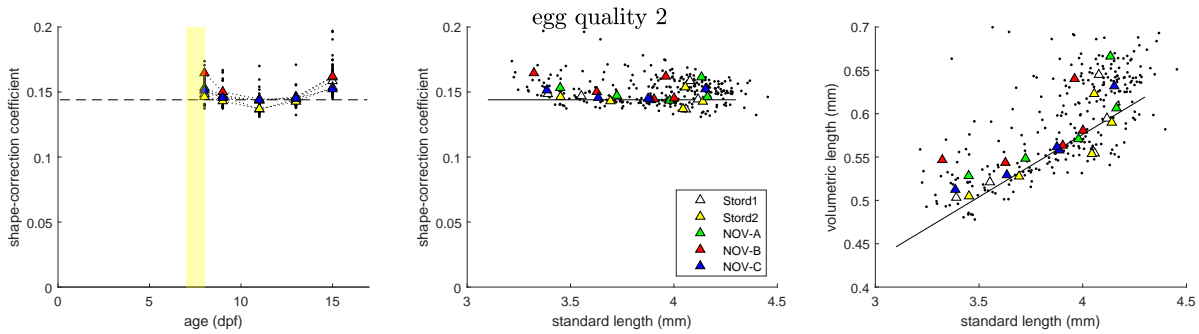


Figure 14: Shape-correction coefficient for yolk-feeding stages of the second egg experiment (eggs from different sources), as calculated from standard length and the cubic root of estimated structural volume. Lines are based on the shape correction coefficient of 0.144 as established for BG-1.

For the feeding experiment, the corresponding plot is shown in Figure 15. The first value (3 dph, which should correspond to approximately 10 dpf), is quite close to the value established in the egg-quality experiment. However, after that, the shape coefficient increases till it stabilises at approximately 0.29 for the larger animals (SL > 8 mm). The middle and right plots show that there is no difference in shape between the treatments; the difference in the left panel (with age at the x-axis) is only caused by a delay in growth for the blue treatment.

Conclusions: till approximately 7-9 dph, the shape-correction coefficient is quite constant at 0.144, which indicates that the larvae do not change substantially in shape. After that (roughly 10-35 dph), the coefficient increases till approx. 0.29, which indicates a ‘rounder animal’ (more volume per length unit). For feeding larvae, SL is thus a poor proxy for body mass or volume).

We can compare these results to the data of Gagnat *et al* [7], who also measured weights and volumes of ballan wrasse larvae (Figure 16). The pattern of an increasing shape coefficient is very similar. However, the values for the shape coefficient are much lower. Gagnat *et al* determined volume of various organs by measuring the area in thin slices of the animal. Total volume was given by the sum of the areas time the thickness

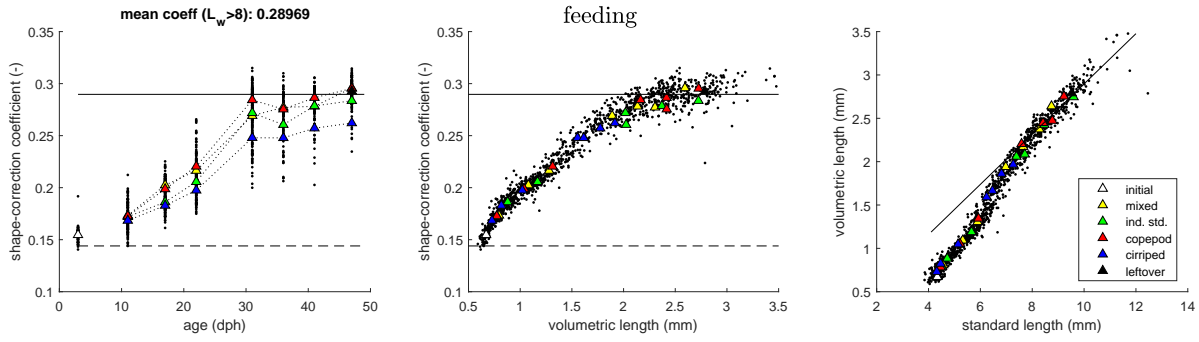


Figure 15: Shape-correction coefficient for feeding stages, as calculated from standard length and the cubic root of estimated volume. Treatments in different colours. Horizontal broken line is the shape coefficient established in the egg-quality experiment on non-fed yolk-sac larvae. Horizontal solid line is the mean for larger larvae (> 8 mm SL).

and distance of the slices. The measurement of standard length is pretty robust, so this difference is likely related to the estimation of body volume. A few days after hatching, the animals in our test and in Gagnat *et al* have an SL of 4 mm. In Gagnat *et al*, they have a total body volume of some 0.1 mm^3 , while I estimate some 0.2 mm^3 . Dry weight is somewhere around 0.05 mg. This gives a dry-weight density for our estimates of 0.25 mg/mm^3 , and for Gagnat *et al* a much higher value at 0.50 mg/mm^3 . It is entirely possible that our cylinder approximation overestimates the volume of the animals; e.g., because the animals are flattened sideways. However, a density of 0.50 mg/mm^3 is clearly unrealistic, and I therefore question the volume estimates of Gagnat *et al*.

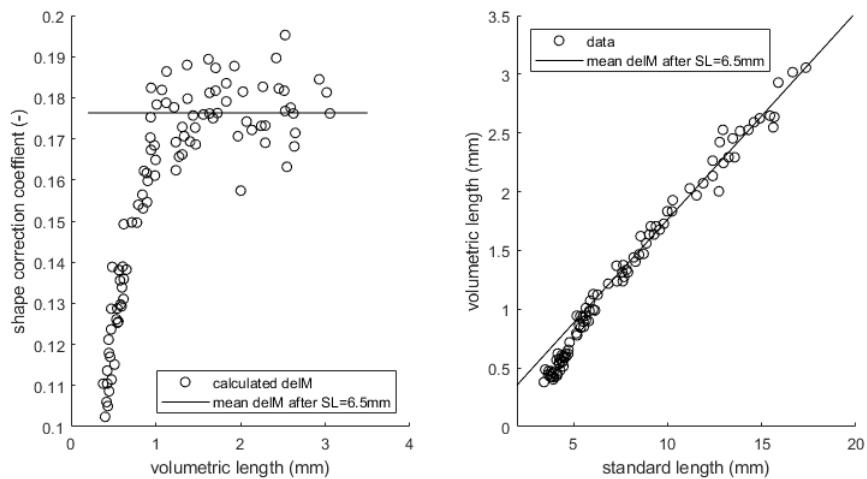


Figure 16: Shape-correction coefficient for feeding stages, as calculated from standard length and the cubic root of estimated volume, as reported by Gagnat *et al* [7].

4.4 Arrhenius temperature

The three experiments in this study were performed at different temperatures, and in the feeding experiment, the temperature increased over time. Therefore, temperature corrections are needed to compare the results to each other and to the DEB predictions. I used the collected data on hatching time at different temperatures from D’Arcy *et al* [3] to derive the Arrhenius temperature. The Arrhenius relationship is given by:

$$F_T = \exp\left(\frac{T_A}{T_{ref}} - \frac{T_A}{T}\right) \quad (11)$$

Where F_T is the temperature-correction factor by which all times and rate constants need to be multiplied or divided. In the case of hatching time, we need to divide by this factor, since hatching time decreases with increasing temperature. Further, T is the actual temperature, T_{ref} a reference temperature, and T_A the Arrhenius temperature. All T_* are in Kelvin in this equation. Using a reference temperature of 10°C, we obtain a hatching time at this reference of 8.3 days, and an Arrhenius temperature of 9900 K (with a 95% confidence interval of 5500-15000 K). I assume that this Arrhenius temperature holds for all times and rate constants throughout the life cycle of this species. This value is well in line with the default of 8000 K, often used as default for DEB analyses [16].

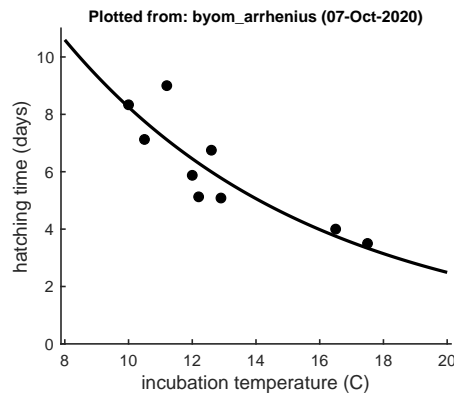


Figure 17: Fitting the Arrhenius temperature on the data for hatching time as collected by [3].

Conclusions: an Arrhenius temperature of 9900 K can be used for the temperature corrections between and within experiments. Even though it is uncertain, based on the available data, it should provide a reasonable approximation.

5 Growth patterns

5.1 Egg-quality experiment

Figure 18 shows the estimates of volumes and measured/estimated lengths over time in the egg-quality experiment (BG-1). Standard length shows the same ‘hockey-stick’ pattern as observed for cod [11]. However, for cod, the stop in length growth occurred at the same time as the depletion of the yolk sac. This is also the expectation from the DEBkiss embryo model [11]: growth stops because yolk is depleted. In this data set, however, the yolk sac shows a steady decrease over the entire time course of the experiment, and is not even completely depleted at the last time point (approx. 9 dph). Estimated structural volume of the larvae increases in a similar pattern as the length measurements, levelling off at around the same time. The last time point indicates an increase again. This might be simply variation, but it may also indicate an increase in water content of the larval structure. Total volume has a sharp drop at hatch, which likely relates a large water content of the egg prior to hatch (water that is not part of the embryo’s yolk or structure), plus a contribution from the shedding of the chorion etc.

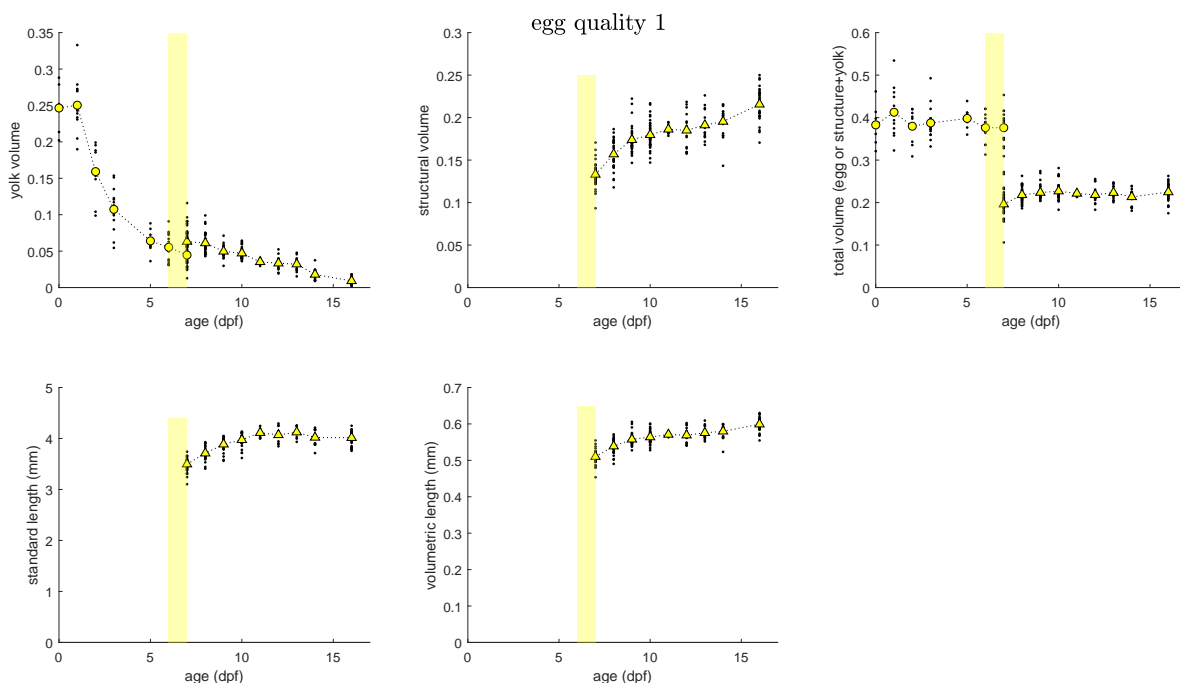


Figure 18: Volumes and lengths over time in the egg-quality experiment. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. Circles are estimates from measurements on eggs, while triangles are from measurements on hatched larvae.

Figure 19 shows the dry weights from the same experiments (but different animals). Dry weight decreases over time, which is to be expected as the animals do not take up food: their tissue growth is fuelled completely by depletion of the yolk sac. I expected a drop in dry weight around hatch, as the chorion is shed by the larva. In earlier work with

cod, the data set (taken from the literature) showed a clear decrease in dry weight at hatch [11]. In Figure 19, there is no clear drop in weight at hatching. It is possible that this relates to a thinning of the chorion as a prelude to hatching (see [5]).

Figure 20 shows the estimated volumes and measured/estimated lengths over time in the second egg-quality experiment, with eggs from different sources. Increase in standard length stops again around $t = 11$ dpf. However, both structural and total volume continue to increase over time, much more clearly than in the first experiment. Figure 21 shows the corresponding dry weights, decreasing over time. The decrease in weight, coupled with the increase in total volume, leads to the steep decrease in dry weight density of Figure 12. It is thus likely that the water content of the larvae increases substantially after hatching.

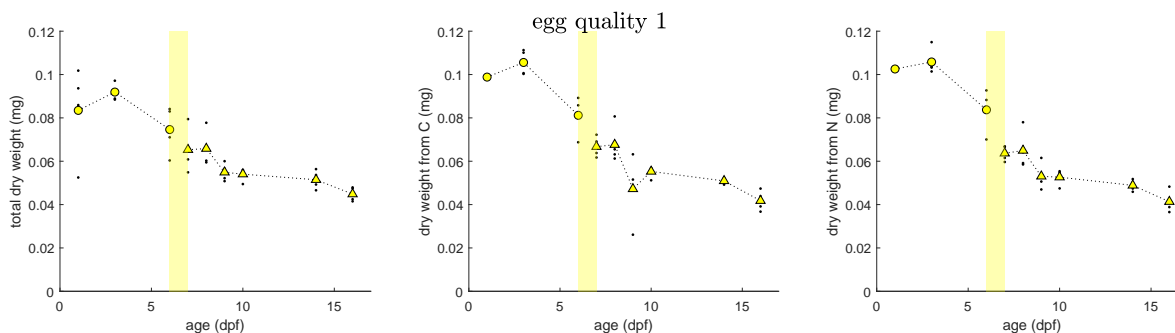


Figure 19: Dry weights over time in the egg-quality experiment. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. Left, dry weight directly measured, middle estimated from C, and right panel estimated from N content. Two outliers removed: an extremely high value for N content and an extremely high value for measured dry weight.

Conclusions: the variability in the egg-quality experiments is limited. Length growth stops before yolk is fully depleted. Yolk volume rapidly decreases post fertilisation, but slows down later. The second egg-quality experiments shows a clear increase in volume post hatch, while growth in standard length stops.

5.2 Feeding experiment

Estimated volumes and lengths are shown in Figure 22. Length growth in all treatments is close to linear, which is the expectation for initial growth (far away from the maximum body size) from DEB models (in the absence of metabolic acceleration, see [15, 17]), but seems to decrease by the end of the experiment. This was unexpected, given that temperature increases, but could relate to the switch to dry food (the weaning phase was from 32-36 dph). However, a complete analysis requires a temperature correction. For standard length, two sets of symbols are shown since this endpoint was determined in the respiration/weights measurements and for the biometry from the photographs (there is even a third set of measurements, which is not plotted here).

The only obvious difference between the treatments is that the cirriped-feeding group (blue points) shows less growth than the others. There are no obvious differences between the other groups.

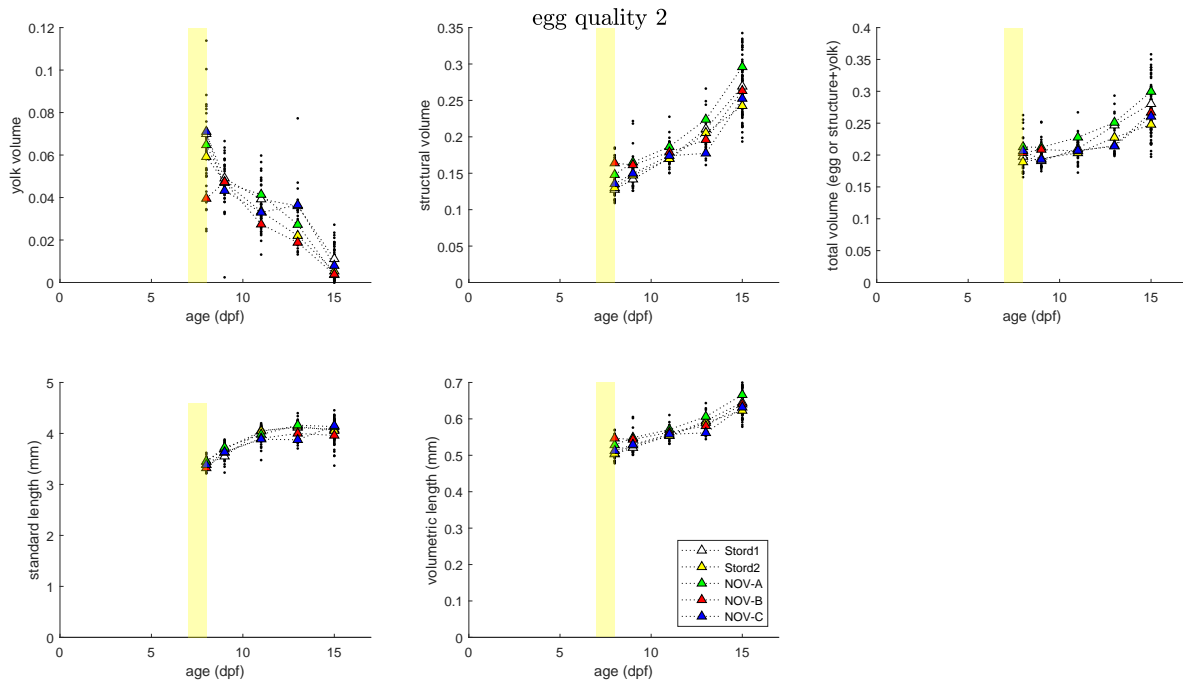


Figure 20: Volumes and lengths over time in the second egg-quality experiment (different egg sources). Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. Only measurements on hatched larvae.

The inter-individual (or inter-replicate) variability is very large, and increases over the experiment. This variability will be discussed in more detail in Section 7.4.

Conclusions: there is large variation in the data set for the feeding experiment. Initial length growth is close to linear. Growth seems to slow down by the end of the experiment. The cirriped treatment clearly performs worse than the other feeding regimes.

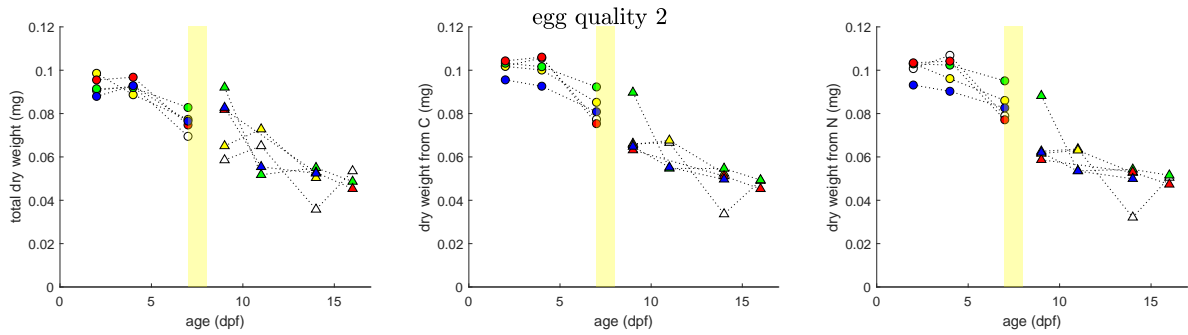


Figure 21: Dry weights over time in the second egg-quality experiment (different egg sources). Individual measurements are shown as filled symbols. Left, dry weight directly measured, middle estimated from C, and right panel estimated from N content.

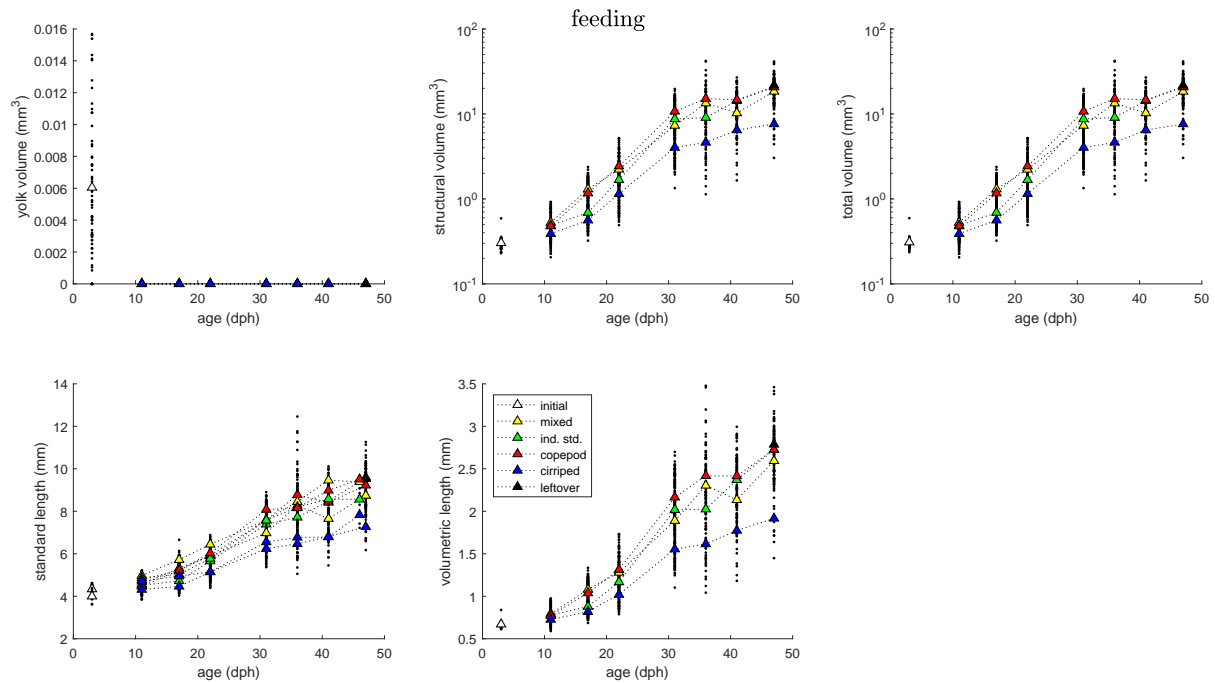


Figure 22: Volumes and lengths over time in the feeding experiment. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. Note that structural and total volume are plotted on log-scale.

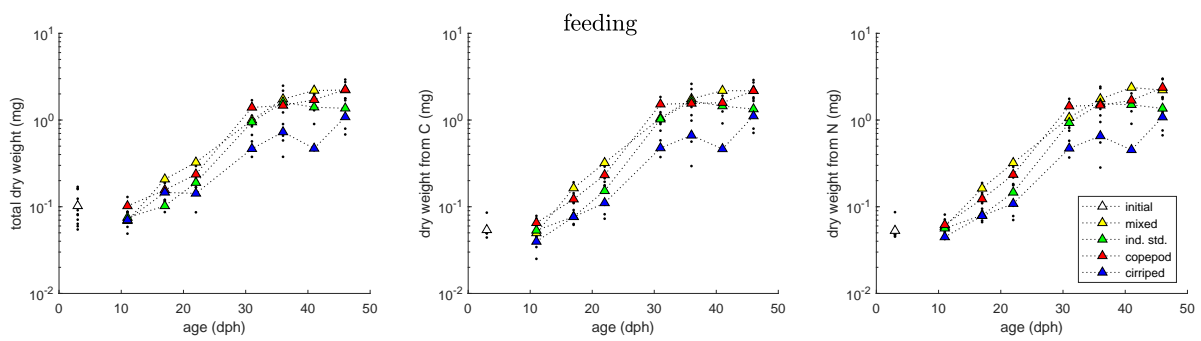


Figure 23: Dry weights over time in the feeding experiment. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. Left, dry weight directly measured, middle estimated from C, and right panel estimated from N content. Note the log-scale for all weights.

6 Respiration patterns

6.1 Egg-quality experiment

Respiration increases with age, but the weight-specific respiration decreases (Figure 24). This relates to the use of yolk, which contributes to the dry weight but does not require maintenance. There seems to be a pattern in the respiration rate with age, with an increase around hatching and a decrease after hatch. However, it is quite possible that this is just variation (a similar pattern was not observed in the second egg-quality experiment).

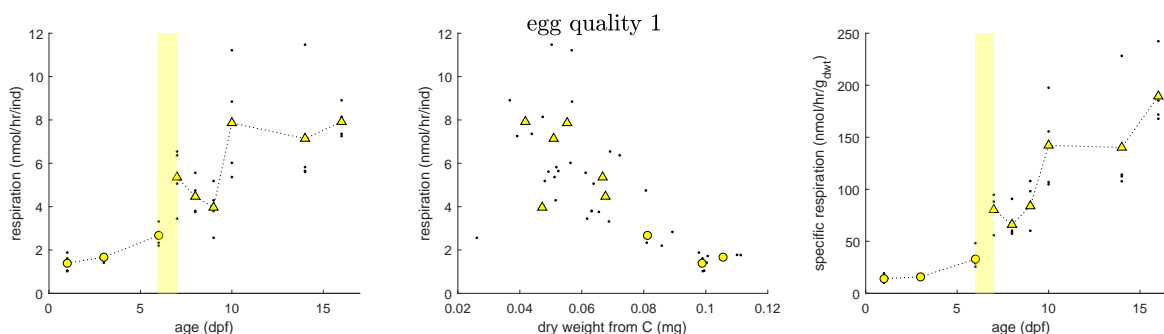


Figure 24: Respiration rates (oxygen use) over time (left, and per dwt right) and over dry weight (middle) in the egg-quality experiment. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots.

The second egg-quality experiments shows very similar patterns for respiration (Figure 25). Given the degree of variation in the BG-1 experiment, it is unlikely that observed differences between the egg sources are meaningful.

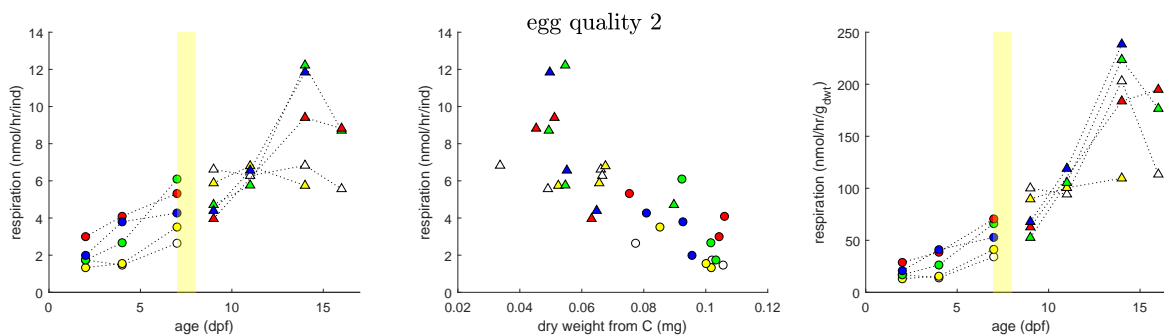


Figure 25: Respiration rates (oxygen use) over time (left, and per dwt right) and over dry weight (middle) in the second egg-quality experiment. Individual measurements are shown as filled symbols.

Conclusions: for the yolk-feeding stages, weight-specific respiration decreases over development as expected. Overall, there seems to be no discontinuity in the respiration curve at hatching.

6.2 Feeding experiment

Respiration obviously increases with age and body dry weight. The differences between treatments in the respiration-age plot disappear when respiration is plotted against dry weight. Therefore, there are no obvious treatment effects on respiration: the observed differences in the left panel are caused by a delayed growth in the cirriped treatment (blue points). Weight-specific respiration is low initially. This is unlikely to be due to the contribution of yolk to the dry weight, since these animals have only a tiny bit of yolk left. It is more likely the absence of feeding, and thereby growth, and thereby the overhead costs for these processes, that limit respiration. Over the feeding stages, specific respiration declines somewhat over time. This is unexpected, given that temperature increases, but may be linked to the slight decrease in length growth in Figure 22, by the end of the experiment, which indicates less effective feeding/assimilation. This could be related to the switch to dry food (the weaning phase was from 32-36 dph).

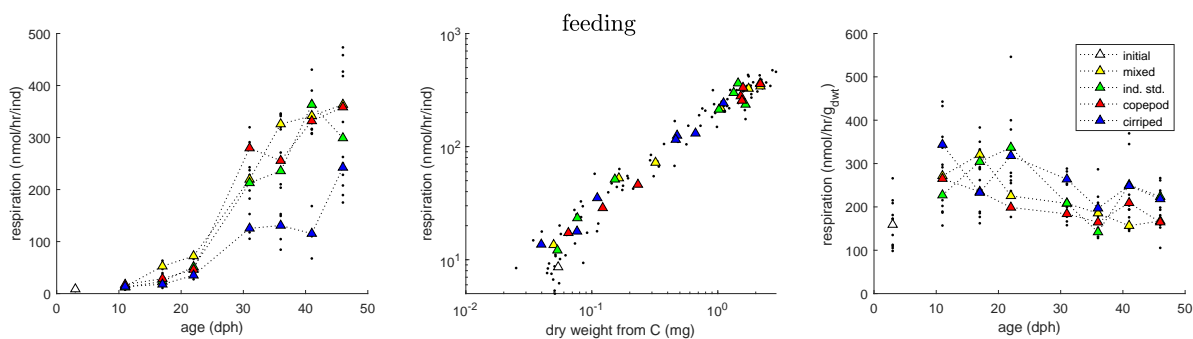


Figure 26: Respiration rates (oxygen use) over time (left, and per dwt right) and over dry weight (middle, note the log-scale) in the feeding experiment. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots.

Conclusions: in the feeding stages, weight-specific respiration is quite stable, although here is a slight decrease by the end of the experiment (likely related to a decrease in growth). There is no obvious differences in respiration rate between the treatments, when comparing animals of similar body weight.

7 Comparison to DEBkiss model

7.1 Expected patterns from cod paper

The DEBkiss embryo model provided an excellent fit to the data for cod early-life stages [11], as reproduced here in Figure 27. Yolk depletion accelerates over time because the embryo assimilates the yolk at a rate that is proportional to its structural body volume to the power $\frac{2}{3}$. When yolk completely runs out, structural growth stops and the respiration rate drops. Note the step-wise change in dry weight at hatch, which is caused by the shedding of the chorion.

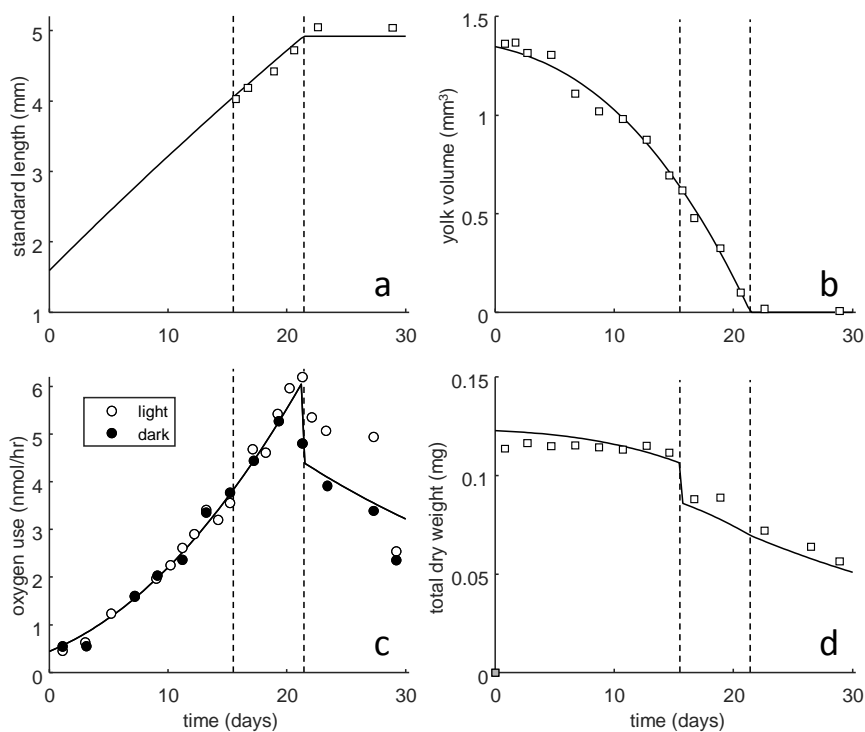


Figure 27: Fit of the DEBkiss model on yolk-feeding stages of cod, taken from Jager *et al* [11].

The patterns in the data for the wrasse yolk-feeding stages are quite different. Figure 18 shows that yolk volume stays rather constant for the first few days, but then decreases almost exponentially until hatching, when the yolk is depleted further in a slower and more linear manner. This is completely different from the curve in Figure 27b. It is unlikely that the rapid decrease in yolk volume between day 1 and 3 is due to assimilation by the embryonic structure. That hypothesis is inconsistent with the low initial level of respiration in Figure 24, and the increase in respiration over day 1 to 6 (while the yolk depletion rate decreases along this part of the time vector). A plausible hypothesis is that the water content of yolk decreases over time, particularly between day 1 and 3. Figures 11 and 12 also suggest that the dry-weight density of larval structure decreases after hatch, and thus

that water content increases. Changes in water content were not used (and not needed) for the cod paper [11].

In itself, such changes in water content of yolk/structure are not unheard of. As explained by Jung *et al* [13] (and references therein), the embryo initially has low capability for osmoregulation, so the egg will lose water to its surroundings (the ambient sea water). Later in development, osmoregulation steps up and water content increases again. Unfortunately, we do not have weight measurements of yolk and structure individually, but only from their sum. Interestingly, Jung *et al* [13] uses Atlantic cod as model species, where we, in earlier work, had good fits assuming constant (but different) water content of yolk and structure. For rainbow trout, water content of larval structure was found to increase after hatching, from approximately 87 to 91% [4]. This is a freshwater species, so changes in water content are perhaps not entirely related to osmoregulation. These authors also observed an increase in yolk water content after hatching. Interestingly, a very similar exponential pattern in yolk depletion was observed for the freshwater medaka [8]. There, the start of the rapid decrease in yolk volume was linked to the initiation of blood circulation. However, water content of yolk was not determined in that experiment.

Figure 18 shows that yolk is not completely depleted by the end of the experiment (16 dpf) while length growth stops around $t = 11$ dpf already. This is not in line with the assumptions of the DEBkiss model: yolk is assumed to be assimilated at the maximum rate that the embryo is capable of, given its current size. The rate of yolk depletion will thus increase as the embryonic structure grows, and stop suddenly when the yolk is fully depleted. This prediction was consistent with the data for cod embryos ([11], Figure 27), but not for our wrasse data. Also for rainbow trout, structural size was observed to reach its maximum before yolk would completely run out, and final yolk resorption was relatively slow [4]. Several authors have speculated that the rate of yolk use depends on the size or surface area of the yolk sac (e.g., [1] for salmonids).

In summary, the observed patterns for yolk-feeding wrasse are not consistent with the DEB-based model developed for cod embryos/larvae. The patterns for wrasse are also internally inconsistent, at least when assuming constant water content of yolk and structure. Since we lack the information needed to properly quantify changes in water content of yolk and structure, there is little opportunity to parameterise a DEB-based model to these data (especially as some ad hoc modifications are likely needed to catch the stop of growth before the depletion of the yolk sac).

7.2 Tries with egg-quality data

Given the uncertainties about the interpretation of the measurements (especially the indications for substantial changes in water content of yolk and structure over ontogeny), there is little point in attempting to fit the DEBkiss embryo model to the data. There will be many free/unknown parameters, which will easily produce a good fit for the wrong reasons. Instead, I will try to make small modifications to the cod parameterisation [11] to see whether the wrasse embryos/larvae behave similarly, and explore which changes could improve the model correspondence to the wrasse data. These modifications are summarised

Symbol	Explanation	cod	BG-1	egg-2	feeding
First step settings					
d_B	Dry-weight density yolk (mg/mm ³)	0.0745	0.26	0.26	n.a.
d_C	Carbon content structure/yolk (mg/mg)	0.40	0.44	0.44	0.44
d_V	Dry-weight density structure (mg/mm ³)	0.15	0.12	0.12	0.12
f	Scaled feeding post-hatch (-)	0	0	0	1
f_{cirr}	Scaled feeding on cirripeds	n.a.	n.a.	n.a.	0.70
T_h	Hatching time (d)	16	6.5	7.5	n.a.
T	Temperature in the test (°C)	6	8.3	9.1	$g(t)$
T_A	Arrhenius temperature (K)	n.a.	9900	9900	9900
W_{V0}	Initial structural dry weight (mg)	0.00235	0.00235	0.00235	0.055
δ_M	Shape-correction coefficient (-)	0.157	0.144	0.144	$h(t)$
Second step settings					
d_V	Dry-weight density structure (mg/mm ³)	0.15	0.15	0.15	
f_{10}	Scaled yolk assimilation for $t > 10$ dpf (-)	1	0.2	0.2	
W_{B0}	Initial yolk dry weight (mg)	0.10	0.065	0.065	
W_c	Weight of chorion (mg)	0.020	0.030	0.030	

Table 1: Modified parameters, relative to the values established for cod [11]. Symbols $g(t)$ and $h(t)$ represent fitted/smoothed functions of time. N.a. is ‘not applicable’.

in Table 1.

The first series of modifications are the obvious ones that deal with specific traits of the species, or settings of the experiment. The dry-weight density of yolk needs to be much larger for wrasse to explain the observed density of the fresh egg. I assume that yolk density equals the density of the fresh egg, taking the mean of the first three data points in Figure 11. For the carbon content of structure/yolk I take the value established for the feeding stages (Figure 6), which also worked for the yolk-feeding stages (Figure 9). For the dry-weight density of structural tissues, I take the value as established for the feeding larvae (Figure 10). Hatching time was modified to the observed hatching time in each experiment. Similarly, temperature was set to the value in each experiment. For the Arrhenius temperature, the result from the fit on the hatching times from literature was used (Figure 17). For the shape-correction coefficient, the mean value in Figure 14 was used. For all other parameters, the cod parameters are used.

The results for the first egg-quality experiment (BG-1) are shown in Figure 28. The first thing to realise is that, even though the overall correspondence is rather poor, it is not totally off. This indicates that the yolk-feeding stages of wrasse or not extremely dissimilar from those of Atlantic cod. For oxygen use, the correspondence is, surprisingly, almost perfect. Figure 29 shows the results for the second experiment, with eggs from different sources; there is no replication for length, weight or respiration in that data set. Results are very similar to BG-1, and there are no obvious differences between the egg batches.

One of the most obvious differences between the cod curves and the wrasse data points is that the wrasse egg is somewhat smaller, and initially contains less yolk volume. Therefore,

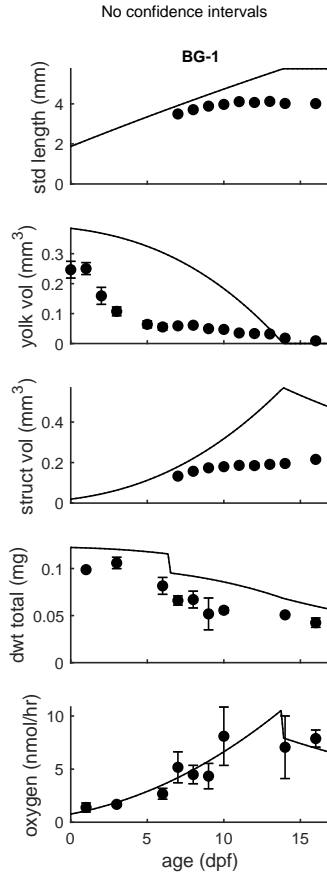


Figure 28: Simulation with the DEBkiss model for yolk-feeding stages against the egg-quality data for BG-1. Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Error bars are 95% confidence intervals on the data points.

an obvious second-step modification is to tune the initial yolk weight of the egg. A second obvious difference is that the wrasse stop growing in length and volume before yolk runs out, and that yolk depletion is very slow post hatching, compare to the model prediction (which predicts an ever increasing rate of yolk depletion as the larva grows). As a quick-and-dirty modification, I add a switch that lowers the scaled feeding rate f from 1 (*ad libitum* feeding) to an arbitrary 0.2 at $t = 10$ dpf. This yields a consistent response on all endpoints, which more closely resembles the patterns observed in the data. Additional tweaks were made to the dry-weight density of structure and the chorion weight. The chorion of demersal eggs is stated to make up 10-33% of the egg dry weight [18]. The tweaked value here (0.03 mg, on a total egg dry weight of approximately 0.1 mg) would be at the upper end of that range.

The results are plotted in Figures 30 and 31. With these modifications, the standard length, structural volume, and dry weight are well-captured by the model for BG-1. Initial

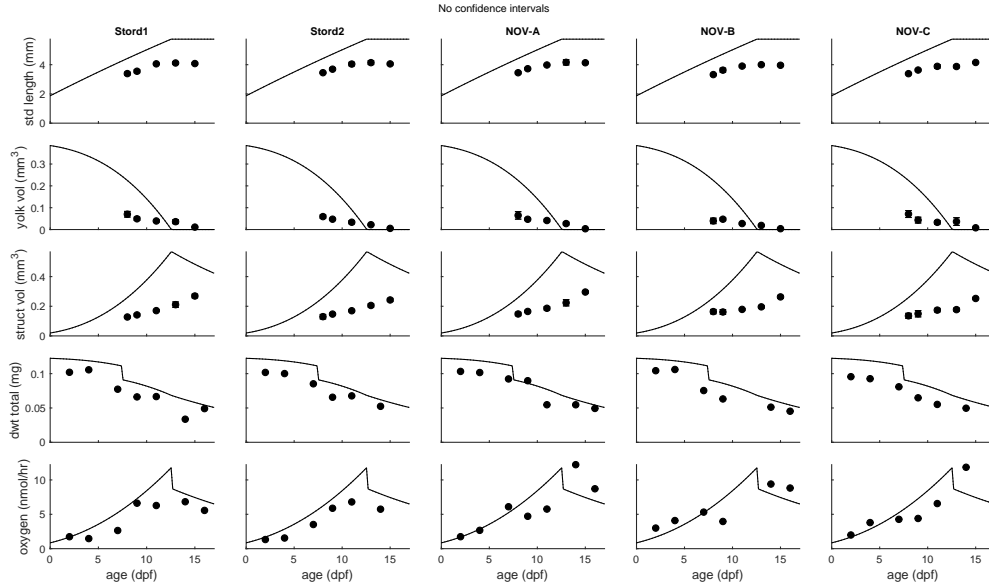


Figure 29: Simulation with the DEBkiss model for yolk-feeding stages against the egg-quality data for the second experiment (different egg sources). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Error bars on volumes are 95% confidence intervals on the data points.

yolk volume is matched by the tuning of the initial yolk dry weight. The pattern of yolk depletion is still not well captured by the model. This is not surprising as the initial fast yolk depletion cannot be caused by assimilation of the (still tiny) embryo. It is most likely that the water content of the yolk drastically decreases between day 1 and 4.

The initial part of the respiration curve, up to the switch in yolk-assimilation rate at $t = 10$ dpf, is only slightly underestimated. However, the model predicts a substantial decrease in respiration rate at $t = 10$ dpf as yolk absorption decreases and growth stops (and thereby the overhead costs of the growth process). This decrease is not shown in the data, which in fact show an increase at $t = 10$ dpf, after which it remains constant as expected. It is possible that the growth costs are lower than assumed in the model, or that the animals increase their activity at this point (attempting to catch prey). However, the latter explanation still begs the question where the resources are coming from to fuel this increased respiration: yolk is not depleted more rapidly, and weight and volume remain constant. It is also possible that the animals are stressed during the respiration measurements, and only temporarily increased their activity (and hence their respiration rate).

The model predicts a sudden decrease in dry weight at hatch, as the chorion is shed. The data, however, indicate a more smooth decrease, already before hatching. This may relate to degradation of the chorion during incubation, as a preparation to hatching. Thinning of the chorion before hatch was observed in halibut [5], caused by release of a hatching enzyme that degrades the chorion from inside. A similar process may be occurring in

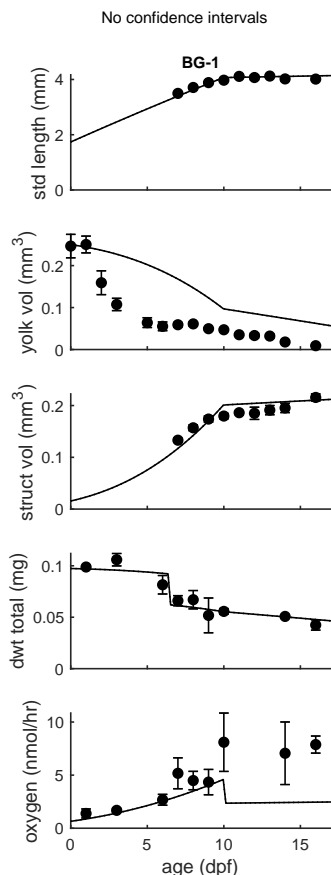


Figure 30: Simulation with the DEBkiss model for yolk-feeding stages against the egg-quality data for BG-1. Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ and ‘second stage’ settings of Table 1. Error bars are 95% confidence intervals on the data points.

wrasse in this study.

For the second egg-quality experiment (Figure 31), some differences with the first data set (BG-1) now become more apparent. Length and volume growth is somewhat delayed, relative to BG-1, and structural volume shows an increase after yolk is depleted where a plateau was expected. The yolk-sac larva from this experiment also showed a more prominent decrease in dry-weight density after hatch (Figure 12). The length and structural volume data for this second experiment are quite similar to those for BG-1. However, the second experiment was performed at a somewhat higher temperature (9.1 versus 8.3°C). This modifies the model curves, in this case increasing the distance to the data points. Interestingly, hatching time was a day later in the second experiment, which is also not according to the expectations of hatching time decreasing with increasing temperature. There are no obvious differences between the various egg sources in the second experiment. Although, for respiration, it seems that the NOV eggs increase respiration post hatch while

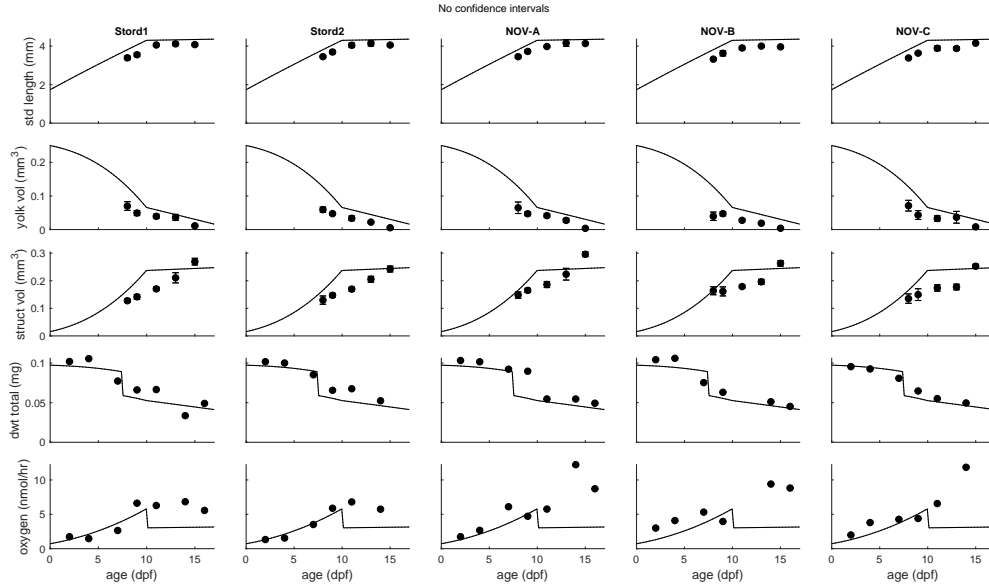


Figure 31: Simulation with the DEBkiss model for yolk-feeding stages against the egg-quality data for the second experiment (different egg sources). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ and ‘second stage’ settings of Table 1. Error bars on volumes are 95% confidence intervals on the data points.

the Stord eggs show a plateau. However, without replication, it is difficult to judge whether this is a real difference or just variation in the data.

7.3 Tries with feeding experiment

As for the egg experiments, dry-weight density and Arrhenius temperature were set to the values established in this study. The initial part of the experiment (first 10 days post hatch) was not included into the simulations as it is unclear how the transition from yolk-feeding to prey-catching should be modelled. Therefore, initial yolk weight was set to zero, and initial structural weight was tuned to provide an approximate match at $t = 10$ dph.

In the feeding experiment, the temperature was increased over the experiment. Since temperature has a considerable impact on life history, this needs to be accounted for. The measured temperatures were fitted with a 5-point moving mean (Figure 32), and this curve was subsequently used in the model (using the Arrhenius equation of Eq. 11).

In the feeding experiment, the shape-correction coefficient was found to change over time. This was included by using the fit of a maximised hyperbolic function in volumetric length (Figure 33). The function is given by:

$$\delta_M = \min \left(a, \frac{bL}{c + L} \right) \quad (12)$$

Fitted values were: $a = 0.2926$, $b = 0.4359$, $c = 1.2106$.

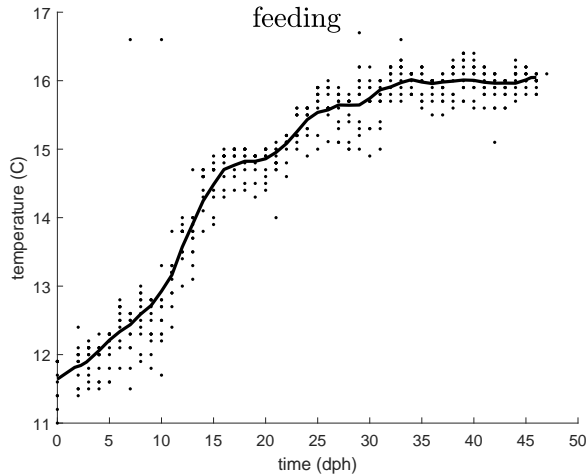


Figure 32: Moving mean (5 point) for the temperature in the feeding experiment. All treatments pooled.

The feeding scenarios require some consideration. For each treatment, there are several switches in food type, and a weaning period of several days in which two food types are offered together. At 32-36 dph, the animals in all treatments are weaned onto dry feed. For the initial simulation, I set the scaled feeding rate f to 1, indicating *ad libitum* feeding. The only treatment that clearly deviates in terms of growth/respiration is the cirripeds. To provide an approximate fit, the scaled feeding rate f was set to 0.70 for this treatment. However, when switching to dry food (set at 34 dph), f is set back to 1, similar to the other treatments.

In the simulations I show the three sets of experimental data separately:

1. Data set including respiration data, but also standard length and dry weight. The observations are averages for 2-8 individuals. Note that dry weight was estimated from carbon content as explained in Section 4.1.
2. Biometry data yielding standard length and structural volume. Observations on individual animals.
3. Extra data set with standard length and dry weight of individual animals.

The resulting simulation is shown in Figure 34-36. Given that the only parameter (roughly) tuned to the data set is the limited feeding rate on the cirriped regime, the correspondence to the data is remarkably good. This shows that DEBkiss parameters for cod can provide a very reasonable description for wrasse as well. Standard length and volume are closely matched by the model. Data set 1 shows a tendency for dry weight and respiration to level off by the end of the experiment (i.e., after the switch to dry feed). This levelling off of growth at the switch to dry feed is less obvious in data set 2 (biometry data).

The cirriped treatment does not respond to the switch to dry feed as predicted by the model. This indicates that dry feed may not be optimal at this age (so $f < 1$). Interestingly,

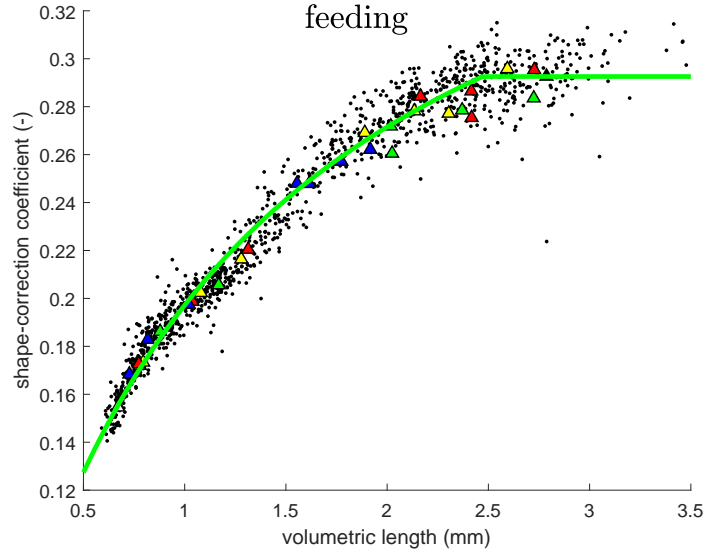


Figure 33: Shape-correction coefficient for feeding stages, as calculated from standard length and the cubic root of estimated volume. Treatments in different colours. Green line is a fitted hyperbolic function with a maximum cut-off (fitted by minimising Euclidean distance). This line can be used to modify the shape coefficient for use in DEB analyses.

in data set 3, the animals are consistently smaller (in terms of length and weight) than in the other data sets (which was already noted in relation to Figure 7). This is surprising since these animals were obtained from the same experiment as the other data sets. This could result from the large inter-individual variation in the experimental cohorts, though this cannot explain why there is such a consistent bias. Note that the measurements for the three data sets were performed on different samples from the same tanks.

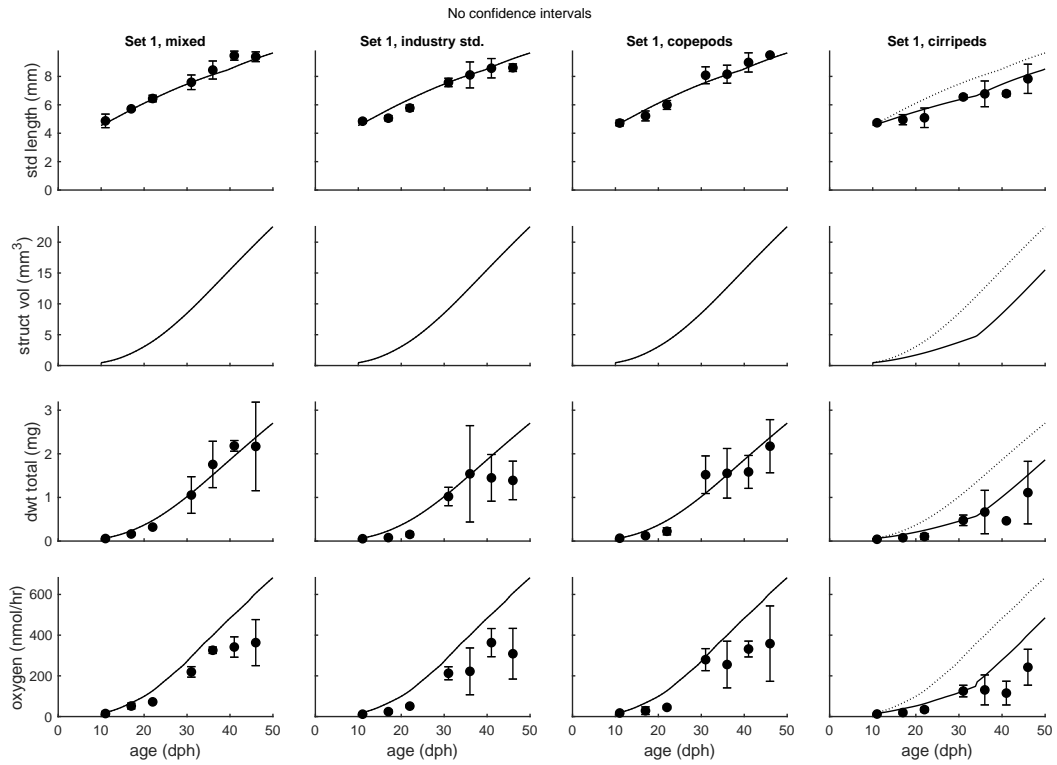


Figure 34: Simulation with the DEBkiss model for feeding stages against the data for the various feeding regimes (data set 1). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Error bars are 95% confidence intervals on the data points.

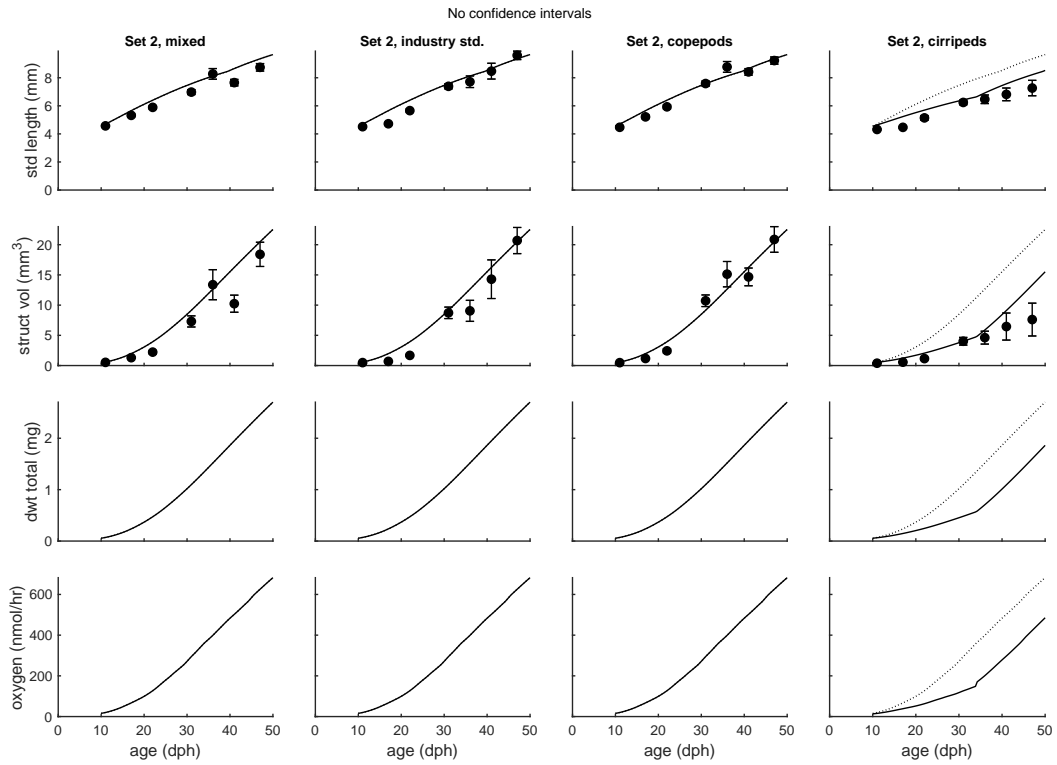


Figure 35: Simulation with the DEBkiss model for feeding stages against the data for the various feeding regimes (data set 2). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Error bars are 95% confidence intervals on the data points.

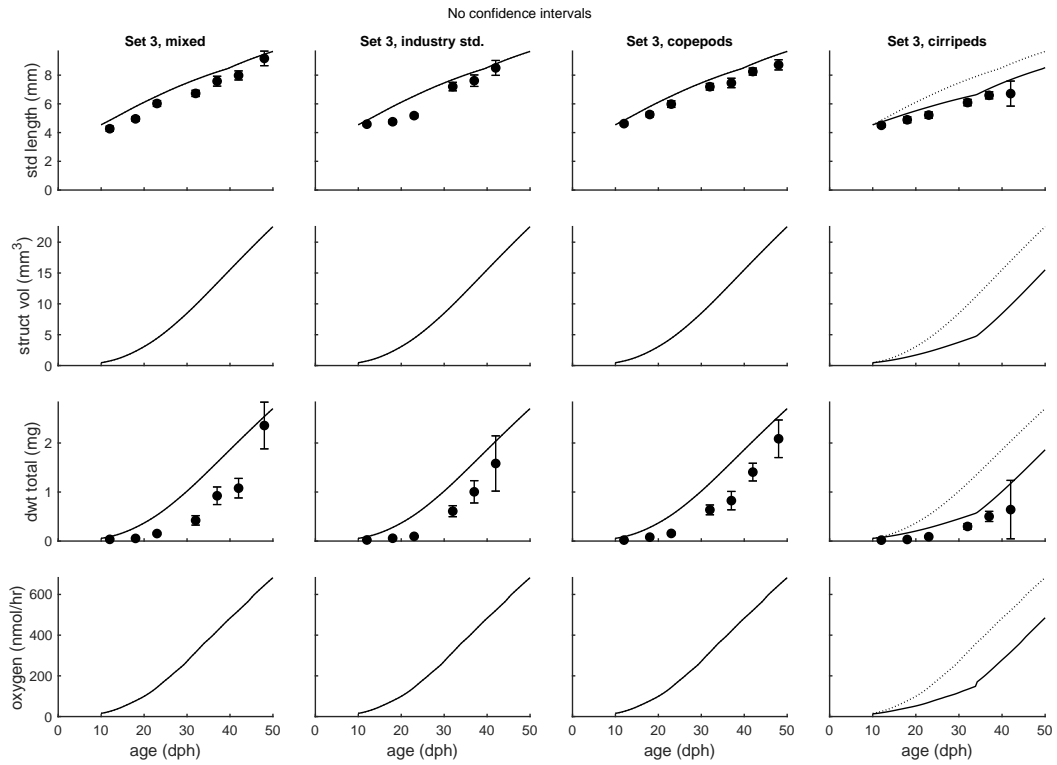


Figure 36: Simulation with the DEBkiss model for feeding stages against the data for the various feeding regimes (data set 3). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Error bars are 95% confidence intervals on the data points.

7.4 Closer look at inter-individual variation

Figure 37-39 shows the same plots as in the previous sections, but now plotting individual data points rather than means. For data set 1, the measurements were performed on 1-8 animals, but for data set 2 and 3, measurements were performed on individual animals.

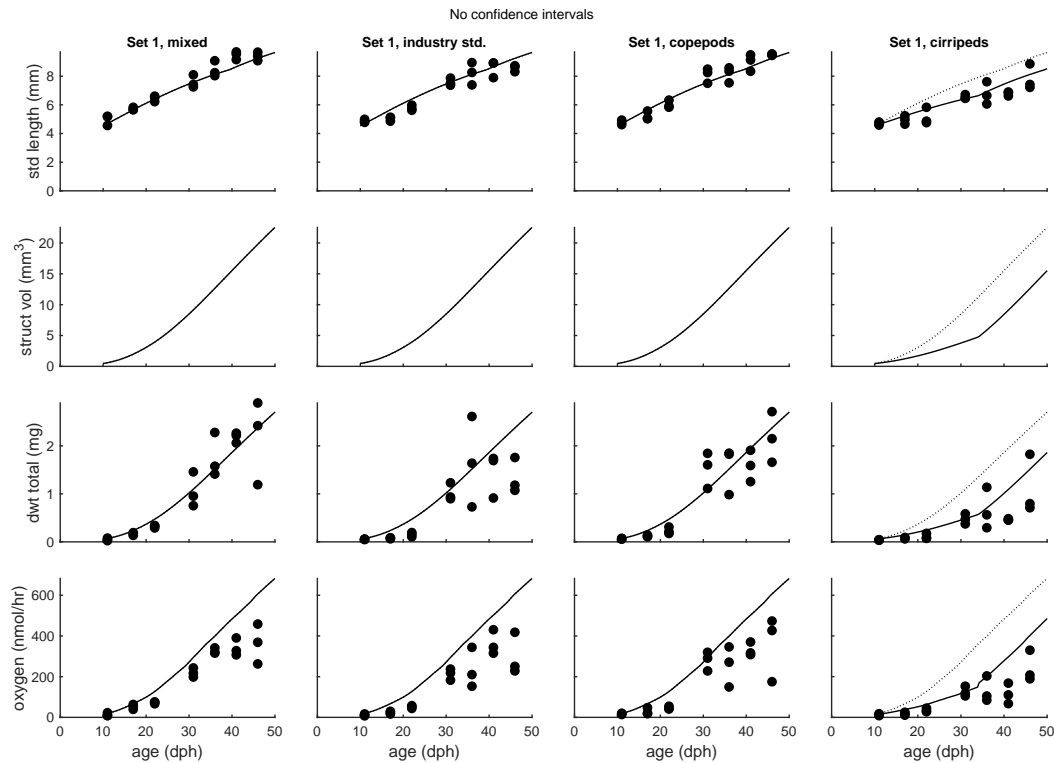


Figure 37: Simulation with the DEBkiss model for feeding stages against the data for the various feeding regimes (data set 1). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Data points are replicate measurements (based on 1-8 individuals).

Clearly, the variation between individuals is very large, and increases over time. This makes it very difficult to fit models: the mean growth and development of such a variable cohort is unlikely to represent the growth and development of an average individual (see also [9]). This variation may be caused by differences between the individuals at the start of the experiment. However, it is likely that competition for food has played a role, exaggerating initial intrinsic or random differences between individuals. Individuals that are somewhat larger early in the experiment may gain better access to the food than individuals that are somewhat smaller, and competition will increase this difference over time.¹

¹Figure 2.1 in the book by Bas Kooijman [14] provides a vivid example.

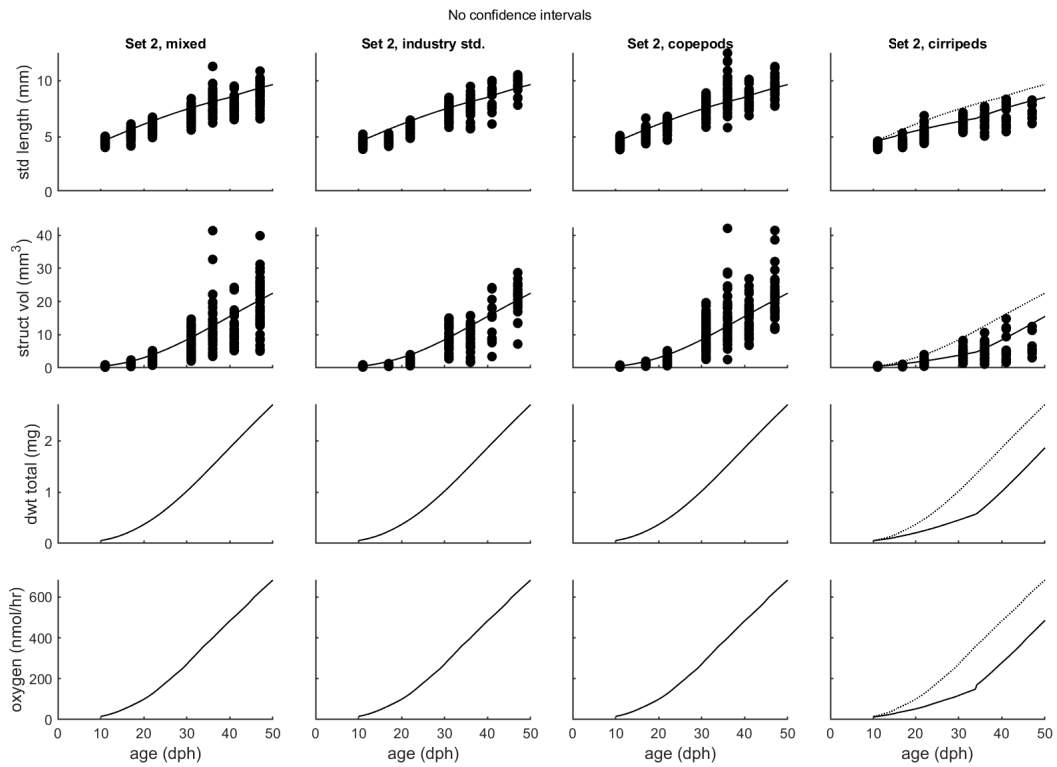


Figure 38: Simulation with the DEBkiss model for feeding stages against the data for the various feeding regimes (data set 2). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Data points are measurements on individual animals.

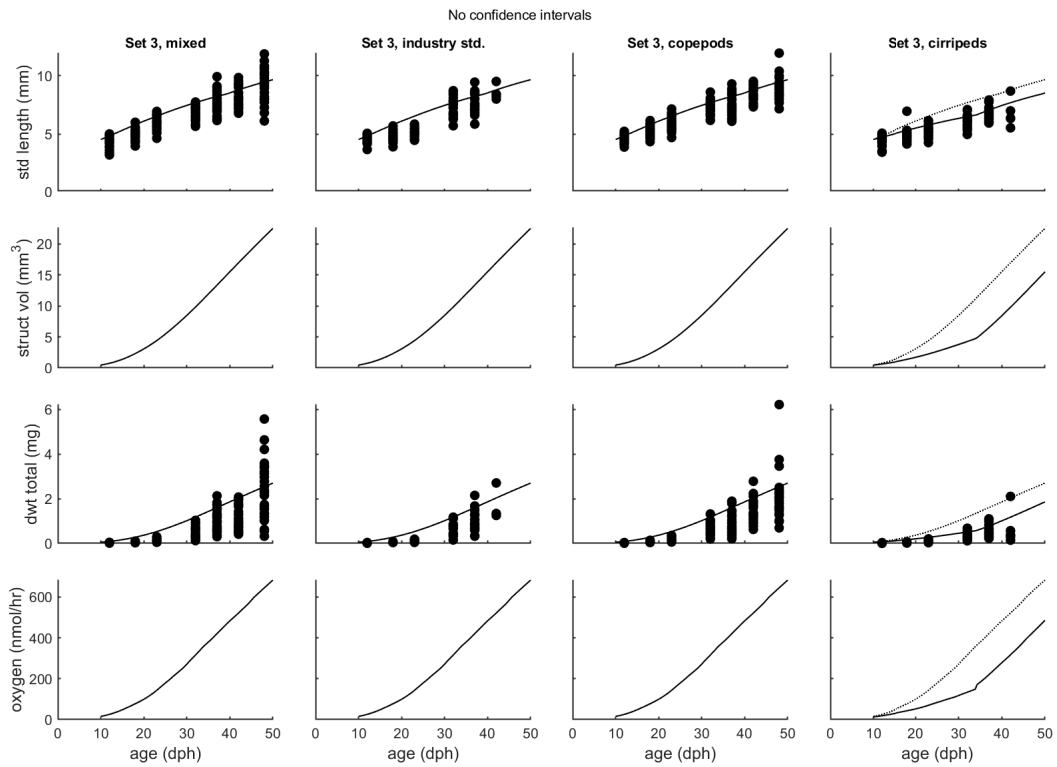


Figure 39: Simulation with the DEBkiss model for feeding stages against the data for the various feeding regimes (data set 3). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1. Data points are measurements on individual animals.

7.5 Fitting on the feeding experiment

As a final attempt extracting information from the data set, I will fit the DEBkiss model to the collected data from the feeding experiment. The fitted parameters are the initial structural dry weight (W_{V0}) and two basic species-specific DEBkiss parameters (J_{Am}^a , J_M^v). Since this data set does not contain information on reproduction, the allocation fraction to soma was fixed to the general default value ($\kappa = 0.8$, see [10]). Furthermore, a number of scaled feeding rates need to be fitted. Each of the four treatments will receive its own scaled feeding rate f_* . Additionally, the switch to dry feed (for all treatments set at 34 dph) will have its own f_{dry} . This allows the model fit to determine whether the switch to dry feed leads to a decrease in growth and development. Note that this f_{dry} is taken the same for all treatments, and comes into play at 34 dph. The f for the ‘mixed’ treatment is fixed as 1, as the reference treatment. Since f is scaled, we need to fix one of them.

Note: fits have been performed with data transformations. For body length, no transformation was used. For the other endpoints, square-root transformation was used. This is a milder transformation than log-transformation, as the latter may place too much weight on the small values that are more difficult to measure accurately. Note that the plotted means and error bars are calculated on the transformed data and subsequently back-transformed.

In light of the limitations of the data set, this analysis should be seen as highly preliminary. The resulting fits are not unreasonable (Figure 40-42). A good fit on all dry weight data is not possible as the data for set 1 and 3 are inconsistent. For the basic parameters (J_{Am}^a and J_M^v), the differences with the values established for cod remain small. Perhaps the most interesting finding lies in the comparison of the various scaled food levels f_* . This analysis suggests that the treatments ‘mixed’ and ‘industry standard’ yield very similar patterns of growth, development and respiration (the confidence intervals also overlap). The ‘copepods’ treatment performs best (confidence intervals do not overlap with the other treatments), though the effect is rather limited (some 5-10% more feeding than ‘mixed’ and ‘industry standard’). The ‘cirripeds’ treatment clearly performs worst: 30-40% less feeding than in the other treatments. It is also noteworthy that the ‘dry feed’ switch at 34 dph is associated with a rather low f value, some 20-30% lower than the three best treatments, and only some 10% better than the ‘cirripeds’ treatment. These results need to be considered with great care, but they do point at differences between the different feeding regimes.

Symbol	Explanation	cod	fitted feeding
f_{mix}	Scaled feeding on mixed	n.a.	1 (n.e.)
f_{ind}	Scaled feeding on ind. std.	n.a.	1.02 (1.00-1.05)
f_{cop}	Scaled feeding on copepods	n.a.	1.09 (1.07-1.11)
f_{cirr}	Scaled feeding on cirripeds	n.a.	0.67 (0.65-0.70)
f_{dry}	Scaled feeding on dry feed	n.a.	0.82 (0.78-0.87)
J_{Am}^a	Specific max. assim. rate ($\text{mg mm}^{-2} \text{d}^{-1}$)	$16.0 \cdot 10^{-3}$	14 (14-15) 10^{-3}
J_M^v	Specific maint. costs ($\text{mg mm}^{-3} \text{d}^{-1}$)	$4.37 \cdot 10^{-3}$	1.9 (1.7-2.1) 10^{-3}
W_{V0}	Initial structural dry weight (mg)	0.00235	0.024 (0.021-0.027)
κ	Allocation to soma (-)	1	0.8 (n.e.)

Table 2: Fitted parameters for the feeding experiment (with 95% confidence interval), compared to the values established for cod [11]. The first-step modification from Table 1 were also applied. Note that J_{Am}^a and J_M^v are referenced to 6°C (for wrasse, they are continuously recalculated in the model based on the actual temperature profile in Figure 32).

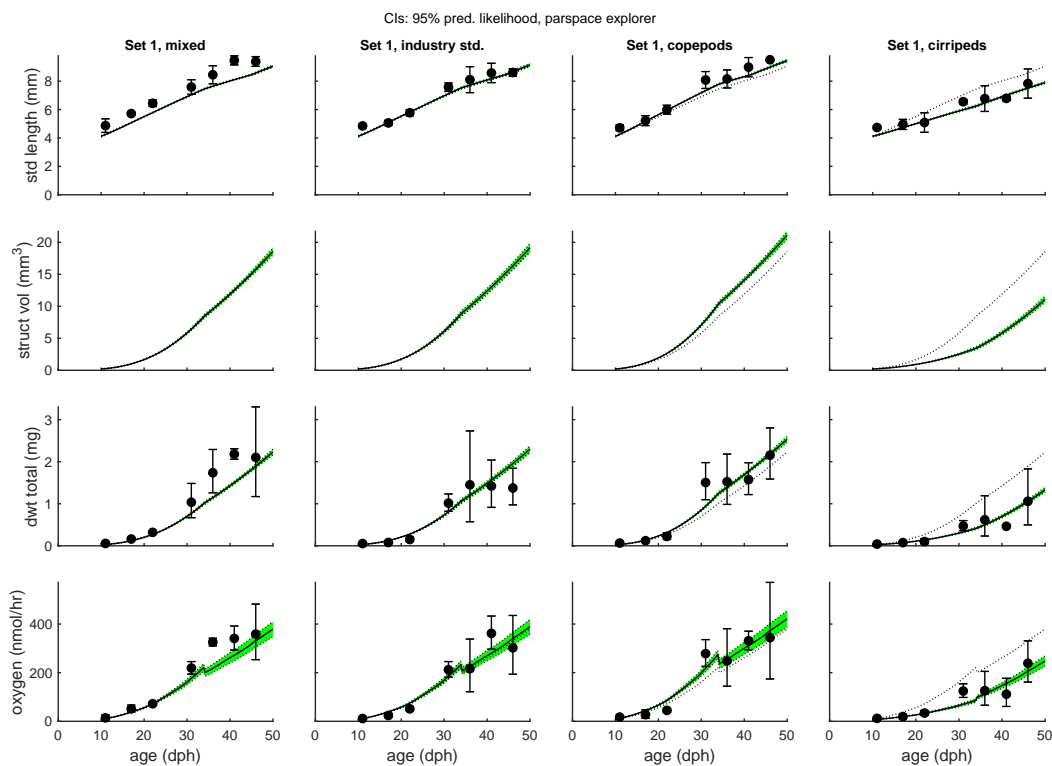


Figure 40: Fit of the DEBkiss model on the data for the various feeding regimes (data set 1). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1, and fitted parameters in Table 2. Error bars are 95% confidence intervals on the data points. Green area is the confidence interval on the model curve, based on parameter uncertainty in the fit. Dotted lines are the reference curve (the mixed treatment).

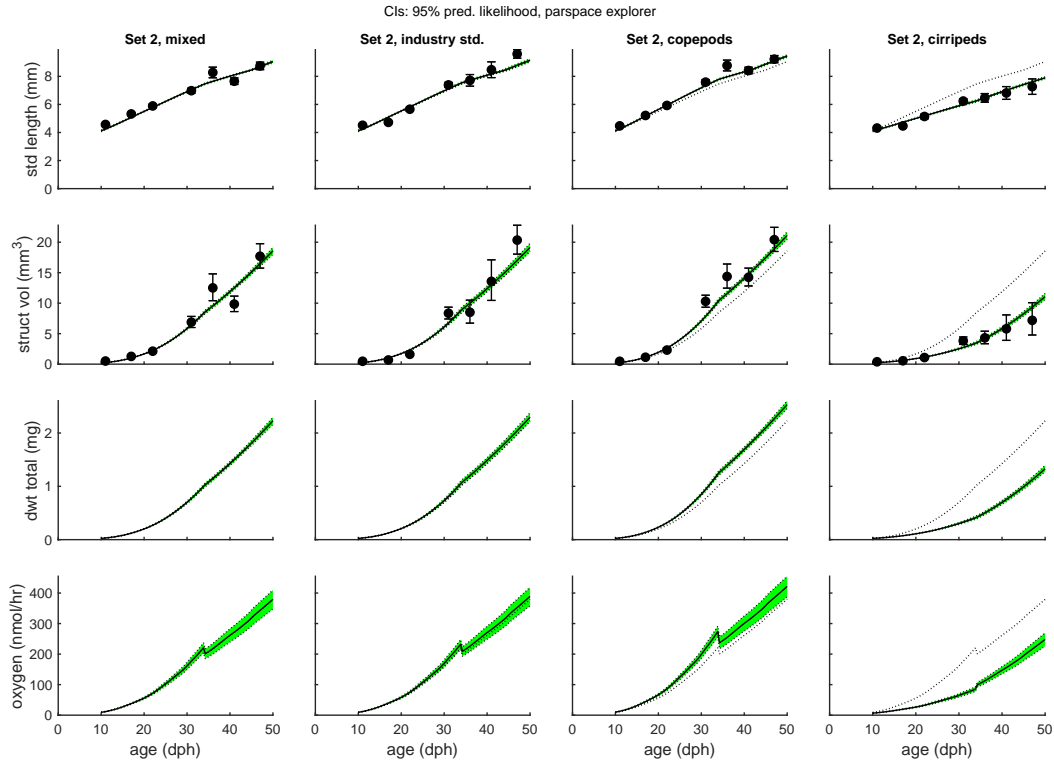


Figure 41: Fit of the DEBkiss model on the data for the various feeding regimes (data set 2). Parameters used are for cod [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1, and fitted parameters in Table 2. Error bars are 95% confidence intervals on the data points. Green area is the confidence interval on the model curve, based on parameter uncertainty in the fit. Dotted lines are the reference curve (the mixed treatment).

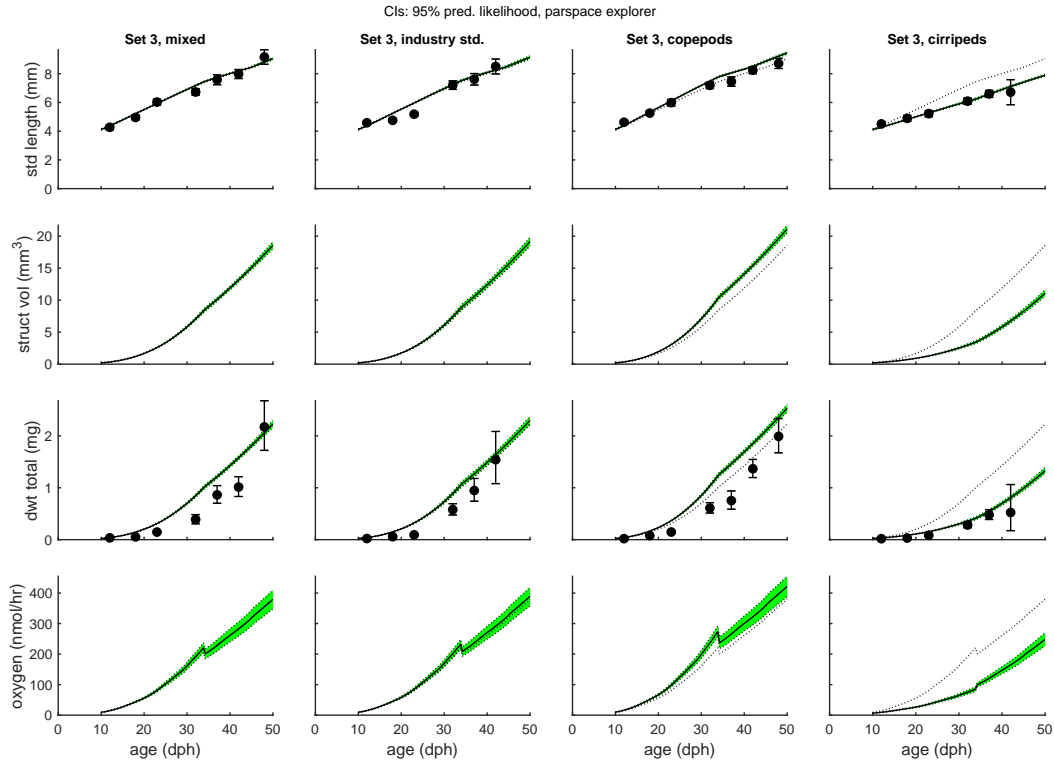


Figure 42: Fit of the DEBkiss model on the data for the various feeding regimes (data set 3). Parameters used are for cod yolk-feeding stages [11] with the ‘first stage’ settings of Table 1, and fitted parameters in Table 2. Error bars are 95% confidence intervals on the data points. Green area is the confidence interval on the model curve, based on parameter uncertainty in the fit. Dotted lines are the reference curve (the mixed treatment).

References

- [1] W. N. Beer and J. J. Anderson. Modelling the growth of salmonid embryos. *Journal of Theoretical Biology*, 189(3):297–306, 1997.
- [2] J. C. A. Craik and S. M. Harvey. Phosphorus metabolism and water uptake during final maturation of ovaries of teleosts with pelagic and demersal eggs. *Marine Biology*, 90(2):285–289, 1986.
- [3] J. D’Arcy, E. Dunaevskaya, J. W. Treasurer, O. Ottesen, J. Maguire, N. Zhuravleva, A. Karlsen, C. Rebours, and R. D. FitzGerald. Embryonic development in ballan wrasse *Labrus bergylta*. *Journal of Fish Biology*, 81(3):1101–1110, 2012.
- [4] A. M. Escaffre and P. Bergot. Utilization of the yolk in rainbow trout alevins (*Salmo gairdneri* Richardson) : effect of egg size. *Reproduction Nutrition Développement*, 24(4):449–460, 1984.
- [5] R. N. Finn, H. J. Fyhn, and M. S. Evjen. Respiration and nitrogen metabolism of Atlantic halibut eggs (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biology*, 108(1):11–19, 1991.
- [6] R. N. Finn, M. Wamboldt, and H. J. Fyhn. Differential processing of yolk proteins during oocyte hydration in marine fishes (Labridae) that spawn benthic and pelagic eggs. *Marine Ecology Progress Series*, 237:217–226, 2002.
- [7] M. R. Gagnat, P. A. Wold, T. Bardal, G. Øie, and E. Kjørsvik. Allometric growth and development of organs in ballan wrasse (*Labrus bergylta* Ascanius, 1767) larvae in relation to different live prey diets and growth rates. *Biology Open*, 5(9):1241–1251, 2016.
- [8] T. Iwamatsu, T. Muramatsu, and H. Kobayashi. Oil droplets and yolk spheres during development of medaka embryos. *Ichthyological Research*, 55(4):344–348, 2008.
- [9] T. Jager. All individuals are not created equal; accounting for interindividual variation in fitting life-history responses to toxicants. *Environmental Science & Technology*, 47:1664–1669, 2013.
- [10] T. Jager, B. T. Martin, and E. I. Zimmer. DEBkiss or the quest for the simplest generic model of animal life history. *Journal of Theoretical Biology*, 328:9–18, 2013.
- [11] T. Jager, R. Nepstad, B. H. Hansen, and J. Farkas. Simple energy-budget model for yolk-feeding stages of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Ecological Modelling*, 385:213–219, 2018.
- [12] T. Jager, I. Salaberria, D. Altin, T. Nordtug, and B. H. Hansen. Modelling the dynamics of growth, development and lipid storage in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Marine Biology*, 164:1, 2017.
- [13] K. M. Jung, A. Folkvord, O. S. Kjesbu, and S. Sundby. Experimental parameterisation of principal physics in buoyancy variations of marine teleost eggs. *Plos One*, 9(8), 2014.
- [14] S. A. L. M. Kooijman. *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, second edition, 2000.
- [15] S. A. L. M. Kooijman, L. Pecquerie, S. Augustine, and M. Jusup. Scenarios for acceleration in fish development and the role of metamorphosis. *Journal of Sea Research*, 66:419–423, 2011.
- [16] K. Lika, M. R. Kearney, V. Freitas, H. W. Van der Veer, J. Van der Meer, J. W. M. Wijsman, L. Pecquerie, and S. A. L. M. Kooijman. The “covariation method” for estimating the parameters of the standard Dynamic Energy Budget model I: philosophy and approach. *Journal of Sea Research*, 66:270–277, 2011.
- [17] K. Lika, S. A. L. M. Kooijman, and N. Papandroulakis. Metabolic acceleration in Mediterranean Perciformes. *Journal of Sea Research*, 94:37–46, 2014.
- [18] S. Lønning, E. Kjørsvik, and I. B. Falk-Petersen. A comparative study of pelagic and demersal eggs from common marine fishes in Northern Norway. *Sarsia*, 73(1):49–60, 1988.

- [19] C. B. Miller, C. A. Morgan, F. G. Prahl, and M. A. Sparrow. Storage lipids of the copepod *Calanus finmarchicus* from Georges Bank and the Gulf of Maine. *Limnology and Oceanography*, 43(3):488–497, 1998.
- [20] I. B. Øverjordet, R. Nepstad, B. H. Hansen, T. Jager, J. Farkas, D. Altin, U. Bronner, and T. Nordtug. Toxicokinetics of crude oil components in Arctic copepods. *Environmental Science & Technology*, 52(17):9899–9907, 2018.

*Appendix D – Data analysis for lumpsucker egg-quality and start-feeding experiments
(DEB)*

Data analysis for lumpsucker egg-quality and start-feeding experiments

Tjalling Jager*

April 14, 2021



*DEBtox Research, Stevensweert, The Netherlands (tjalling@debtox.nl, <http://www.debtox.nl/>)

Contents

1	Executive summary	3
2	Data used	6
2.1	General overview	6
2.2	File details	6
2.3	General data treatment	7
3	Relationships length, area and volume	8
3.1	Sphere	8
3.2	Cylinder	9
3.3	Prolate spheroid	9
3.4	General ellipsoid	10
3.5	Use on lumpsucker eggs and larvae	11
4	Egg-quality experiments	14
4.1	Weights and respiration	14
4.2	Dry-weight density of eggs	15
4.3	Larval biometry	16
5	Feeding experiment	18
6	Comparison to DEBkiss model	21
6.1	Egg-quality experiments	21
6.2	Feeding experiments: simulation	23
6.3	Feeding experiments: closer look at variation	25
6.4	Feeding experiments: fitting the data	27

1 Executive summary

Several experiments were performed with early-life stages of lump sucker, *Cyclopterus lumpus*. Separate experiments were performed on the yolk-feeding stages (egg-quality experiments, from fertilised egg till shortly after hatch at 30 dpf) and the first feeding stages (from 2-35 dph) with different feeding regimes. A range of measurements was conducted, including various weights (dry weight, C and N weight), biometry (length and area of body components), and respiration (oxygen use). In this report, the data are explored from the perspective of bioenergetics: to what extent can we use these data to parameterise a Dynamic Energy Budget (DEB) for lump sucker early-life stages, and can we explain differences in life history between the various feeding regimes.

Advantages of using a DEB-based framework:

1. Explain all life-history traits (length, weight, volume, respiration), over time, within a single consistent framework. This also allows to identify inconsistencies in data sets.
2. Account for changes in temperature and food (quality/quantity) over time.
3. A well-calibrated DEB model would allow predictions of growth and development over time under time-varying temperature and food conditions.

Issues with the data set:

1. The feeding experiment was initiated with larvae aged 2 dph. In most traits, these larvae match the animals of similar age in the egg quality experiment. However, the carbon fraction is substantially lower: around 0.33 mg/mg compared to some 0.50-0.55mg/mg in the egg-quality experiment. The nature of this discrepancy is unclear, but it raises doubt about the accuracy of the C measurements (the N measurements *are* consistent).
2. There are very little data over time from the egg-quality experiment: only respiration. Dry weight was also followed over time, but there is no way to partition the measured value in the contributions of the embryonic structure and the yolk (and the lipid droplet). This amount of data is insufficient for DEB-based analysis. Unfortunately, the lump sucker eggs do not allow for biometrical analysis of structure or yolk. Since there is basically only one time point with yolk quantification (shortly post hatch), there is no option to say anything about yolk usage rates.
3. Different biometrical measurements were taken in the egg-quality experiment compared to the feeding experiment. Therefore it was not possible to use the same volume estimations for yolk and structure. For the egg-quality measurements, only volume of the main body (excluding the tail) was estimated, since the tail likely comprises a small part of body volume. The volume of the tail could not be determined from these measurements.

4. In the feeding experiment, there seems to be a mismatch between the two sets of measurements. In both sets, standard length (SL) is measured, but the patterns are quite different. Even though the animals were sampled from the same tanks, there is a rather consistent difference.
5. In the feeding experiment, variation in the data sets is very large. Individuals differ up to a factor of 5 in estimated body volume and a factor of 3 on dry weight, at the same time point, in the same treatment. This makes it difficult to see growth and development patterns in the data, and hampers comparison of the treatments.

Specifically, there are several issues that prohibit meaningful DEB-based modelling:

1. In the feeding experiment, the animals are switched to different food types several times during the experiment. For the preliminary model analysis, the choice was made to exclude the switches; there were no obvious changes in the growth and respiration patterns to warrant such switches.
2. The large variation between individuals in the feeding experiment makes it impossible to perform meaningful model analysis: the average response from such a diverse cohort is unlikely to represent the response of an average individual (see also [1]).
3. The lack of measurements over time in the egg-quality experiment implies that these data cannot be used (although I will compare the limited results to predictions based on the cod-parameterisation of the DEB-based model).

General learnings:

1. Measurements of body length and projected body area appear to be suitable to estimate body volume. There is no possibility to validate these estimates by direct measurement, but the results are very reasonable.
2. Measurements of C and N content have little added benefit for lump sucker. Yolk and structure apparently have a very similar composition, so these measurements cannot be used to separate them.
3. C content is around 0.50-0.55 mg/mg in the egg quality experiment, but much lower in the feeding experiment: 0.30-0.35. It seems unlikely, however, that this is a real difference, also because the animals at the start of the feeding experiment should be of a similar state as the animals at the end of the egg-quality experiment. N content is rather constant around 0.10-0.12 mg/mg.
4. In feeding larvae, post-depletion of the yolk sac, the density is approximately 0.16 mg/mm³, although there is an indication of a decrease in density over the course of the experiment.
5. The yolk sac is not entirely depleted. The current DEB model predicts an increasing rate of yolk use as the structural biomass increases. The data from the feeding experiment suggest that the last part of the yolk sac persists up to 21 dph.

6. Lump sucker larvae change in shape after hatching. This shape-change is initially fast, and then continues more gradually. This implies that SL is a poor proxy for body size at these development stages.

Some preliminary conclusions that can be drawn from the limited DEB analyses:

1. During egg development, the DEB parameters for lump sucker do not seem to be very different from those of Atlantic cod, when corrected for temperature. The resulting early-life history is, however, quite different since the yolk provisioning in the egg is much more extensive for lump sucker than for cod.
2. In the feeding experiment, the growth rate was higher than expected, which could be explained by using a higher assimilation rate in the DEB model than for cod.
3. The results from the feeding experiment indicate that the Artemia-dry food treatment outperforms the other treatments by some 8-17%.

Potential for improvement:

1. Understanding the bioenergetics of the yolk-feeding stages of lump sucker would require much more detail on yolk and structure. However, this is hampered by the properties of the egg.
2. The shape of the lump sucker larvae is rather complex, and changes over early ontogeny. More work is needed to find proper estimations (and take the necessary measurements) to make proper volume estimations.
3. In the feeding experiments, inter-individual variation must be decreased or controlled. If variation is increased by inter-individual competition, different feeding/housing conditions may improve the situation. Different measurements should, as much as possible, be conducted on the same individuals (or at least on the same sample).
4. The experimental design was rather fragmented; in retrospect, the design attempted to answer too many questions at the same time. To parameterise a DEB model, a more focussed and simpler test design, driven by the model's requirements, would have been preferable.

2 Data used

2.1 General overview

Egg quality experiments were performed with eggs from 5 different sources. The experiments started shortly after fertilisation, and were terminated shortly after hatching. Therefore, there are no time trends for larvae. For each egg source, there were two separate samplings for different measurements:

1. Dry weight, carbon content, nitrogen content, respiration rate. Measurements on eggs and yolk-sac larvae. Measurements on groups of individuals: 1-6 per data point.
2. Biometry of larvae at one time point only (for one batch at 29 dpf, and for the others at 30 dpf), many measurements, including: yolk area (ventral and side), body area (ventral and side), body length (SL and myotome, width), lipid area. Measurements on individuals.

A feeding experiment was performed, starting with larvae 2 dph, and using 5 different feeding regimes. There were two separate samplings for different measurements:

1. Dry weight, carbon content, nitrogen content, respiration rate. Measurements on groups of individuals: 2 per data point. Additionally, standard length was measured.
2. Biometry, measurements on individuals: body and yolk area (side only), body height, SL. Less measurements were taken than in the egg-quality experiment.

2.2 File details

Excel file `Rognkjeks data integration_ALL_corrected2.xlsx`. This was originally received from Björn Henrik (1 March 2021), but revised by Arne in view of errors in the C and N data and sent to me again (5 March 2021). This file contains the results from the egg-quality experiments. There is a data set with respiration, dry weight, C and N, as function of age (measurements on pooled 1-6 individuals). Also, extensive biometrical information on individual larvae, but at 2 time points only (both closely following hatch). Furthermore, information on egg sizes. According to Björn-Henrik (email 3 March 2021), the biometry for broodstock animals has problems, so should be treated with suspicion.

Excel file `Startfeeding_Rognkjeks_Respiration_ForTjalling.xlsx`, received from Arne (12 February 2021). This file contains information from the feeding experiment and includes weights (dry, C, N), SL, and respiration rates. These are data for 2 individuals combined.

Excel file `Rognkjeks startforing biometry output2.xlsx`, received from Björn Henrik (3 March 2021). This file contains information from the feeding experiment and includes various length and area measurements on individual animals.

2.3 General data treatment

Any method for bio-energetic analysis of growth and development requires proper estimation of the actual size of the yolk and larval structures. Length measures are only useful if the organism retains a constant shape, which is certainly not true for the early life stages of fish. Dry weights are useful, but for the yolk-feeding stages, we need to consider that dry weight has contributions from both yolk and structure (which are not easy to separate). Before we can relate the measurements to the DEBkiss-based fish embryo model [3], we thus need to establish relationships between various length measures, volumes and weights.

Measurements on weights, N/C content, and respiration were performed on pooled groups of animals. These results are recalculated per individual egg/larva. All experiments were performed at constant 10°C (email Arne 11/3/2020). Hatching occurred around 29-30 dpf (email Björn-Henrik, 3 March 2021). However, the data set for weights/respiration shows that hatched larvae are present at 27 dpf already (and some eggs still at 29 dpf).

3 Relationships length, area and volume

The pictures taken from the animals can be used to estimate lengths, areas and biovolumes for yolk and structural tissues. For estimating volumes, we need to assume a matching geometric shape for the various elements. The relationships between linear size measures and areas/volumes of various geometric shapes are taken from Wikipedia and recalculated into the desired form below.

3.1 Sphere

A sphere (<https://en.wikipedia.org/wiki/Sphere>) is a special case of an ellipsoid where all axes are of equal length. I will use the equations for a sphere to calculate egg volume from diameter.

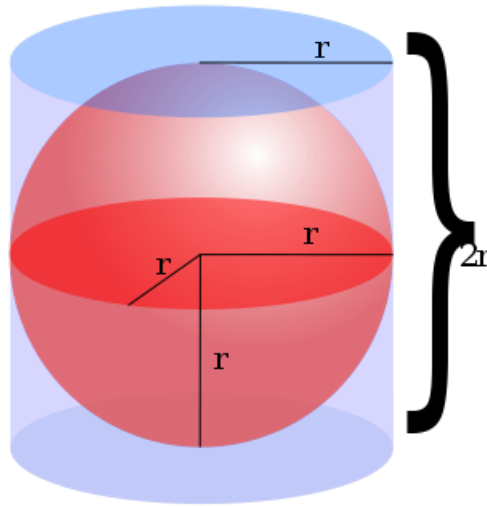


Figure 1: Sphere with radius r .

Volume is calculated from radius (r) or diameter (L):

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi(L/2)^3 \quad (1)$$

We could also use the projected area of the sphere, which is a circle with radius r (<https://en.wikipedia.org/wiki/Circle>):

$$A = \pi r^2 \rightarrow r = \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (2)$$

Volume is then related to projected area as follows:

$$V = \frac{4}{3\sqrt{\pi}}A^{3/2} \quad (3)$$

3.2 Cylinder

A cylinder (<https://en.wikipedia.org/wiki/Cylinder>) is probably a useful approximation for the structural biovolume of larvae post hatch. Especially when using the projected area and total length. This is the relationship used by [7] for the lipid sac of *Calanus finmarchicus*, and, in [8], we also used it as approximation of prosome volume for these copepods.

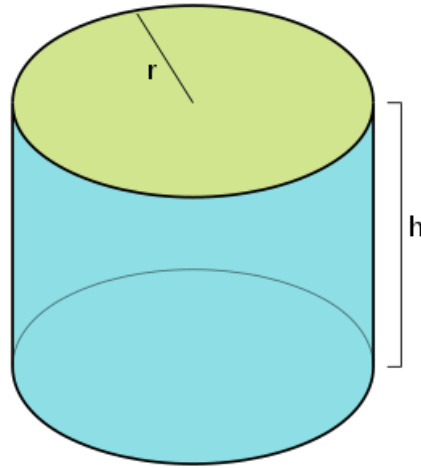


Figure 2: Cylinder.

Volume of a cylinder from radius (r) and height (h), or in length ($L = h$) and width ($W = 2r$) of the cylinder:

$$V = \pi r^2 h = \frac{\pi}{4} W^2 L \quad (4)$$

Projected area of the cylinder (A) is a rectangle with sides $2r$ and h , which can be used to derive r from area and height:

$$A = 2rh \rightarrow r = \frac{A}{2h} \quad (5)$$

Volume can then be calculated from area and length as follows:

$$V = \frac{\pi A^2}{4h} = \frac{\pi A^2}{4L} \approx 0.79 \frac{A^2}{L} \quad (6)$$

3.3 Prolate spheroid

The prolate spheroid (<https://en.wikipedia.org/wiki/Spheroid>) is often used as approximation for non-spherical eggs, lipid/yolk sacs, nauplii and prosome of copepodites. Here, I will use this shape to represent the yolk in eggs and in yolk-sac larvae.

Volume of a prolate ellipsoid can be calculated from the small and large semi-axes (a and c), or from length and width (L and W):

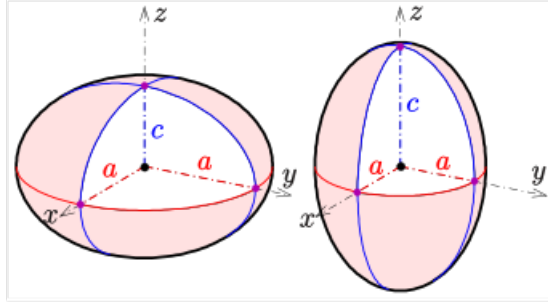


Figure 3: Ellipsoid oblate (left) or prolate (right).

$$V = \frac{4}{3}\pi a^2 c = \frac{4}{3}\pi (W/2)^2 (L/2) \quad (7)$$

Projected area of the spheroid is an ellipse (<https://en.wikipedia.org/wiki/Ellipse>). Area of an ellipse from small and large radius (a and c):

$$A = \pi a c \rightarrow a = \frac{A}{\pi c} \quad (8)$$

Filling in leads to:

$$V = \frac{4}{3} \frac{A^2}{\pi c} \quad (9)$$

Since $c = L/2$, volume can be calculated from project area and length as follows:

$$V = \frac{8}{3\pi} \frac{A^2}{L} \approx 0.85 \frac{A^2}{L} \quad (10)$$

The difference in assuming a cylinder or prolate spheroid for estimating volume from area and length is thus very small (less than 10%), so an inappropriate choice of shape here does not lead to strong bias. Note that a sphere is just a special case of a spheroid ($a = c$).

3.4 General ellipsoid

Relationships for ellipsoid are taken from <https://en.wikipedia.org/wiki/Ellipsoid>. The general equation for the volume of an ellipsoid is (using the principal semi-axes of the ellipsoid a , b and c):

$$V = \frac{4}{3}\pi abc \quad (11)$$

If this equation is used to approximate (part of) an organism, it is easier to express it in length of the three axes (length L , width W and height H):

$$V = \frac{\pi}{6} LWH \quad (12)$$

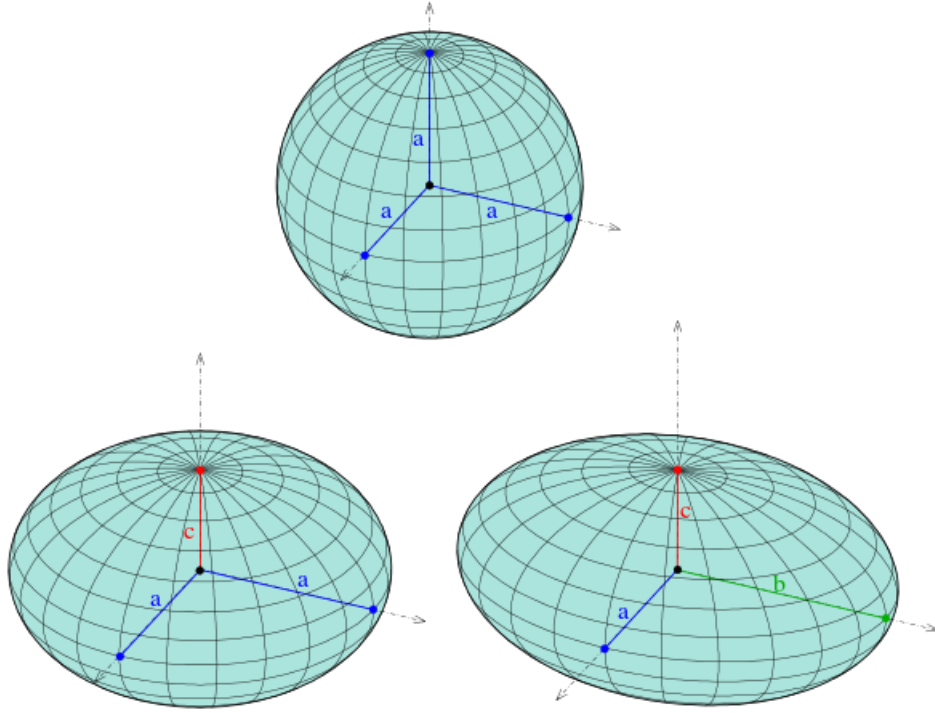


Figure 4: Three ellipsoids: sphere (top), spheroid (left) and tri-axial ellipsoid (right).

The projected area of the spheroid is an ellipse (<https://en.wikipedia.org/wiki/Ellipse>). Area of an ellipse from small and large radius (e.g., a and b) is given by:

$$A = \pi ab = \frac{\pi}{4} LW \quad (13)$$

3.5 Use on lumpsucker eggs and larvae

For the eggs, I assume a sphere for the total egg and a generalised spheroid for the yolk. For the egg stage, there are no biometrical measurements apart from the size of the egg just after fertilisation.

For the larvae, shortly post hatch, there is biometry with measurements of yolk. There are no length measures for the yolk sac, only area measurements from the side and ventrally. We can relate these to length measures as follows (assuming a general ellipsoid):

$$A_s = \frac{\pi}{4} LH \rightarrow H = \frac{4 A_s}{\pi L} \quad (14)$$

$$A_v = \frac{\pi}{4} LW \rightarrow W = \frac{4 A_v}{\pi L} \quad (15)$$

To estimate volume from these areas, we need one other piece of information (we have 2 equations with 3 unknowns). From the side image, we can see that the projected area of

the yolk sac is roughly circular. That means we can estimate yolk-sac length from side area:

$$A_s = \pi r^2 = \frac{\pi}{4} L^2 \quad (16)$$

$$L = \sqrt{\frac{4}{\pi} A_s} \quad (17)$$

With L determined, we can estimate yolk volume as follows as a general spheroid:

$$V = \frac{\pi}{6} \frac{1}{2} L \frac{4}{\pi} \frac{2A_v}{L} \frac{4}{\pi} \frac{2A_s}{L} \quad (18)$$

$$= \frac{16}{3\pi} \frac{A_v A_s}{L} \quad (19)$$

This will be a rather crude estimate of yolk volume. However, yolk volume will not be a crucial element in this analysis, since there is basically only one time point in the egg-quality experiment. In the feeding experiment, there is only a single yolk area measured anyway (side), and there is hardly any yolk left in the animals.

It looks like the lipid droplet is part of the yolk sac. We can estimate lipid volume by assuming a sphere (although in some case there are multiple lipid droplets). For now, I subtract lipid volume from the estimated yolk volume.

For the total body, volume estimation is somewhat complex. The larvae are rather tadpole-like, with a large body and a narrow tail. For the egg-quality experiment, I estimate volume excluding the tail, approximated by a cylinder. Volume is then calculated from ventral length (which excludes the tail) and ventral area (also excluding tail). Structural volume is calculated as total body volume minus lipid and yolk volumes. This will be an underestimate as the tail section is ignored. I also tried to estimate volume as for wrasse: using total body area and standard length (for wrasse, myotome length was used). This led to very low estimates of body volume, and even some negative values after yolk and lipid volumes were extracted.

For the feeding experiment, we have no ventral measurements. Volume was calculated by assuming a cylinder, using side body area and standard length. Yolk volume was estimated from side area using the relationships for a sphere. Structural volume was calculated as total volume minus yolk volume.

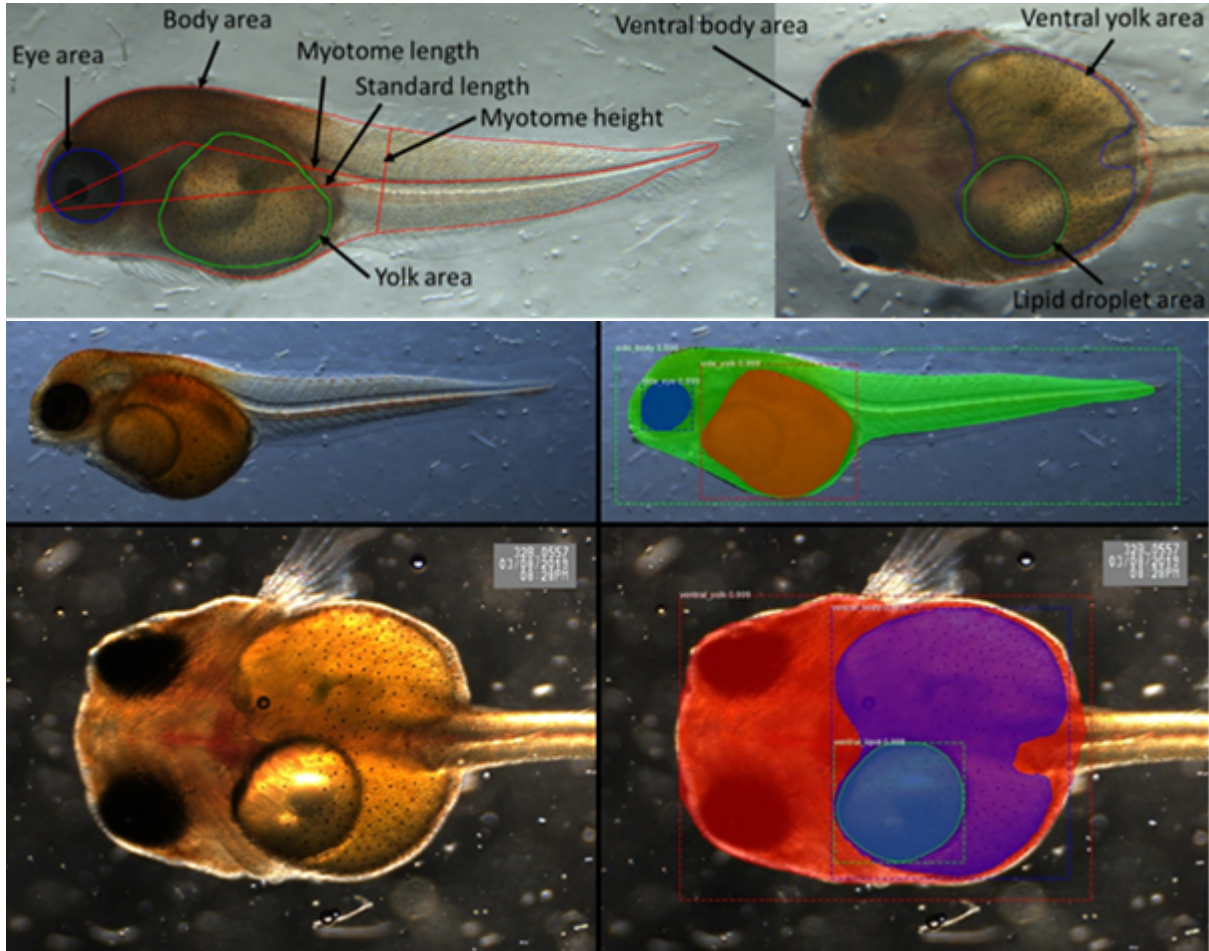


Figure 5: Pictures, showing the length and area measurements.

4 Egg-quality experiments

4.1 Weights and respiration

Dry weight differs between the egg batches, but is relatively constant over development (Fig. 6). We can expect a decrease in dry weight over egg development, since some mass is burnt (as evidenced from the respiration measurements). However, this is apparently only a small fraction of the available biomass in the egg. Around hatching, there is a decrease in dry weight as the larvae emerges from the egg, and the chorion etc. is shed. Not all animals hatch at the same day, so the step-down is a bit smoothed. I can estimate chorion weight by subtracting the average larval dry weight post hatch by the egg dry weight (egg for $t > 20$ dpf). Over the 5 egg batches this yields: 0.31, 0.44, -0.064, 0.53 and 0.54. The negative value is surprising, but in this batch (BS1), there are several suspect weight values (an egg weight of less than half of the other eggs, and a larval weight of twice the largest egg weight).

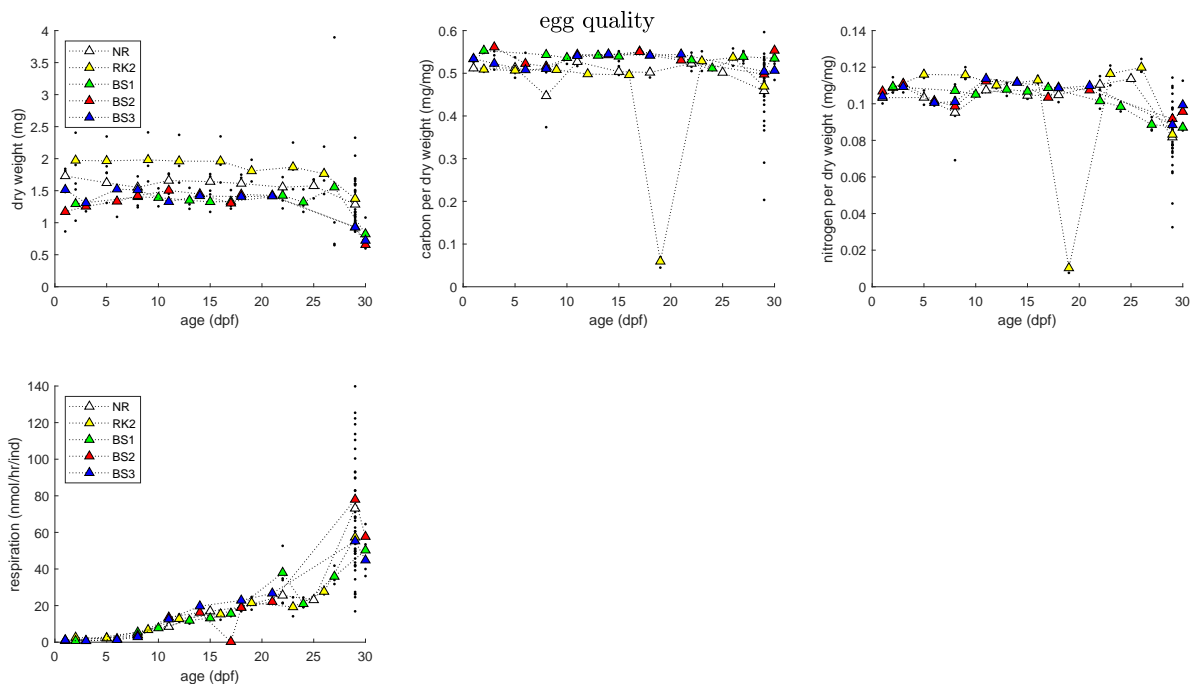


Figure 6: Weights, carbon and nitrogen fraction, and respiration as function of age post-fertilisation. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots.

Carbon and nitrogen content (as fraction of the dry weight) remains constant over development, with C around 0.50-0.55 mg/mg and N 0.10-0.12 mg/mg. There are several unrealistic observations at $t = 19$, which must relate to experimental problems. There are no obvious differences between the egg sources. Around hatching, the variability in the data increases, with several measurements being unrealistically low. This again points at experiment problems.

The mean egg weight ($t < 20$ dpf) is 1.56 mg. The mean carbon fraction, excluding

measurements that are below 0.30, is 0.51 mg/mg.

Respiration increases over time, which is to be expected. After hatch, variability increases. This could relate to differences in behaviour as observed in the test chambers: some individuals swim during the measurement while others attach themselves to the walls of the respiration chamber. Interestingly, there is little difference in respiration between the egg batches, despite the considerable difference in dry weight. This is consistent with the DEBkiss model, along with the assumption that differences in egg weight only reflect differences in yolk (and/or lipid) provisioning. Respiration reflects usage of yolk by the developing structural part of the embryo, and the rate at which this happens only depends on the size of that structural part. If the eggs all start with the same amount of initial embryo structure, differences in yolk provisioning do not lead to different developmental rates in the model, until the yolk is exhausted.

4.2 Dry-weight density of eggs

The data set contains measurements of egg diameter of freshly-fertilised eggs. Additionally, there are dry-weight measurements over time. These measurements were not made on the same eggs. However, using the means, we can estimate total egg density. For the dry-weight measurements, means were taken, separately for each egg batch, over the initial part of the experiment (up to 10 dpf). Since egg dry weight does not vary much over this period, that seems acceptable.

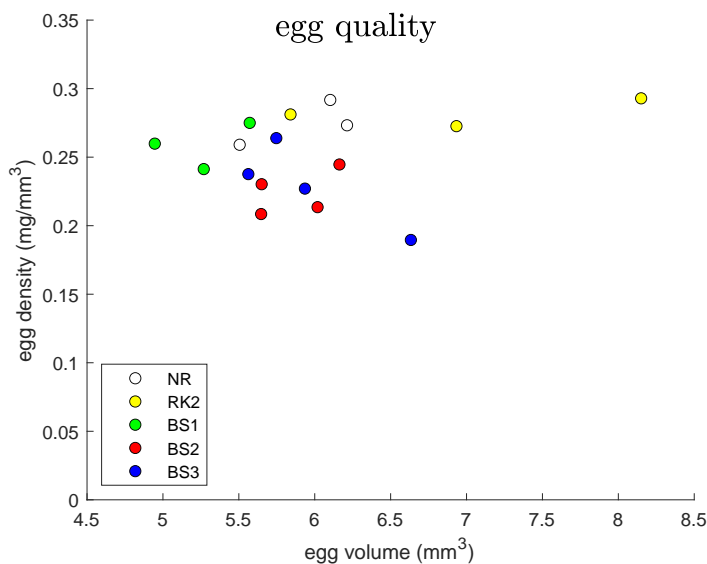


Figure 7: Dry-weight density of eggs, as function of egg volume.

There is a considerable variation in egg volume between the various sources, and the various batches within each source. The dry-weight density is quite constant with a mean of 0.25 mg/mm³. For the BS batches, there seems to be a trend that larger eggs have lower density (i.e., more water). However, that trend is mainly caused by one egg batch in BS3.

4.3 Larval biometry

In the egg-quality experiment, there is only biometry at a single time point, shortly after hatch. Furthermore, the biometry of the broodstock larvae is questionable due to experimental problems. These data should be evaluated with care, and best in a relative sense. The biometrical data are summarised in Figure 8. Overall, the differences between the egg batches are rather small. The eggs from the wild-caught lead to hatchlings with somewhat more yolk and lipid stores, but a similar standard length.

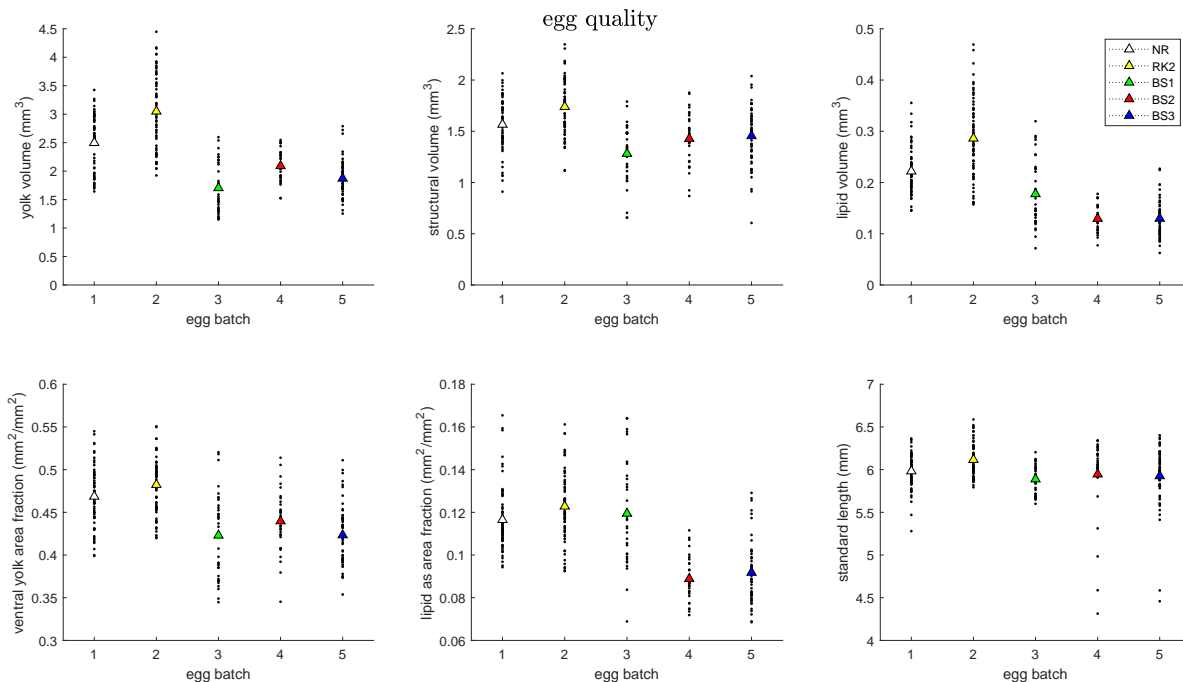


Figure 8: Biometry of larvae, shortly post hatch. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots.

Figure 9 relates some of these biometrical properties to the size of the egg (volume or dry weight). Top-left panel of Figure 9 shows the relationship between the egg volume and the yolk fraction (ventral area of yolk sac, relative to ventral body area excluding tail), shortly post hatch. There is a tendency for larger eggs to yield larvae with a larger proportion of yolk, relative to their total body size. The relationship is, however, not very strong. The lower-left panel plots yolk fraction versus egg weight (means up till 10 dpf), which shows a clearer relationship: heavier eggs lead to hatchlings with a larger proportion of yolk.

Top-right panel of Figure 9 shows the relationship between the egg volume and the standard length of the larvae, shortly post hatch. There is a very slight tendency for larger eggs to yield larvae with a slightly larger length. However, apart from several weird points, the standard length at hatch is quite constant across the various egg batches at some 6 mm. The lower-right panel plots standard length versus egg weight, which leads to a somewhat clearer pattern. There are two egg batches that lead to very small hatchlings.

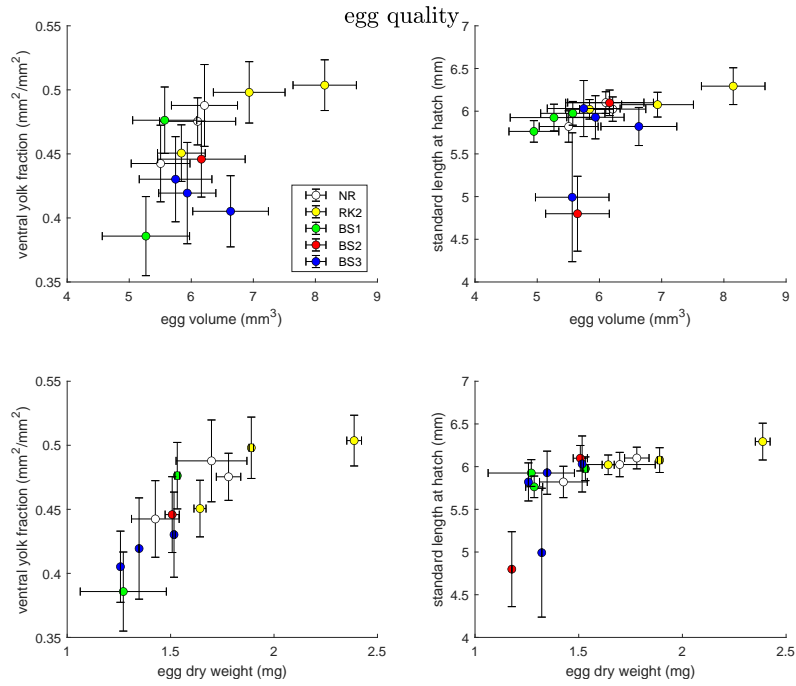


Figure 9: Biometry of larvae, shortly post hatch, versus egg volume and egg dry weight. Symbols are means, error bars are standard deviations.

The mean shape-correction coefficient for newly-hatched larvae is 0.191. The shape-correction coefficient is the volumetric length (cubic root of volume) divided by the standard length.

5 Feeding experiment

Figure 10 (top-right and bottom-left panels, latter is on log-scale) shows that dry weight increases in time, as expected. However, the pattern is rather unrealistic. For all egg sources, there seem to be periods where the animals decrease in weight. This likely reflects high inter-individual differences or errors in the dry-weight measurements.

The cubic root of dry weight is proportional to standard length. Only the ‘initial’ data point deviates, which is not surprising as those animals likely contain a substantial yolk sac (and therefore have more weight for the same amount of body length).

Nitrogen as fraction dry weight is rather constant around 0.10 mg/mg. This is very similar to the value found for eggs/larvae, as well as for ballan wrasse. For the carbon fraction, there seems to be a decrease between 10-20 dph. This may be related to depletion of the lipid droplet, though there was no quantification of those droplets. The carbon content is on average 0.32 (excluding the initial data point), which is considerably lower than found for wrasse (where 0.44 was established). It is also much lower than for the eggs/larvae of lumpsucker in the egg-quality experiment (where 0.50-0.55 was found). This is odd as the larvae in the end of that experiment should not be too different from the ones at the start of the feeding experiment.

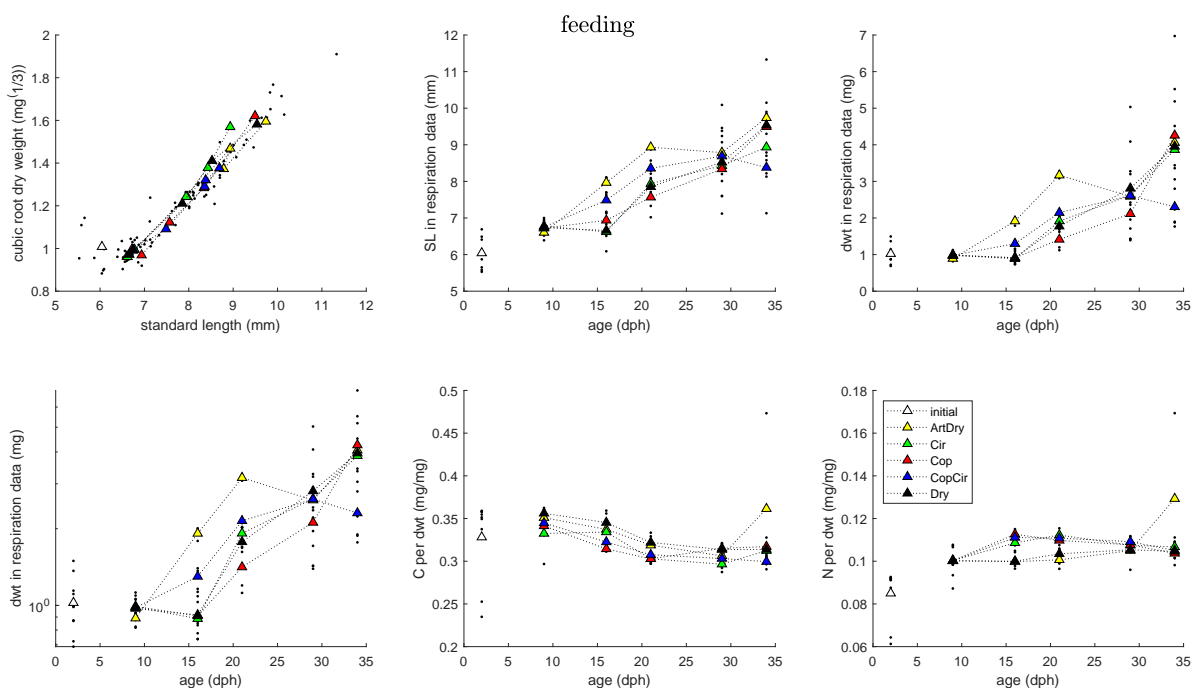


Figure 10: Feeding experiment, dry weight, C and N weight, over time. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. Note that the top-right and bottom-left panels show the same data, but the latter is on log-scale.

Figure 11 shows that respiration rate increases over time. In the middle panel, it is clear that the respiration rate closely follows the dry weight. The right panel confirms that the weight-specific respiration rate remains rather constant. Exception is the ‘initial’

data point. This likely reflects the substantial yolk sac that the individuals possess: the yolk contributes to body weight but does not require maintenance, and hence does not contribute to oxygen use.

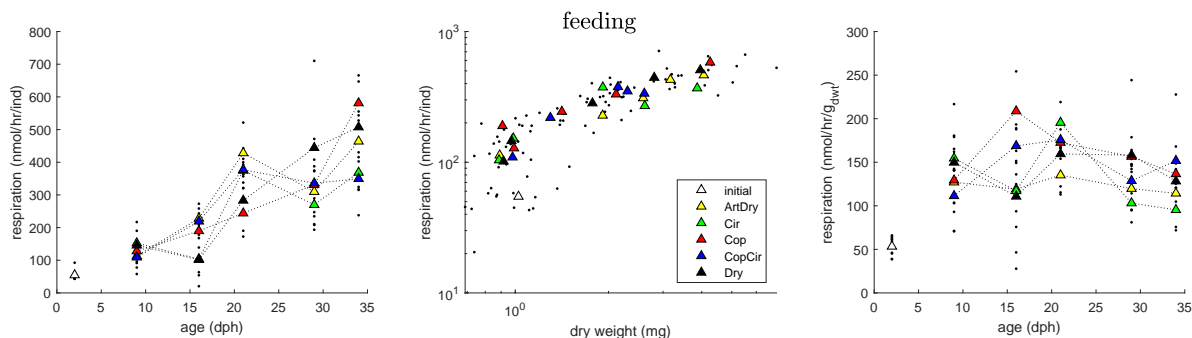


Figure 11: Feeding experiment, respiration over time. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots.

Figure 12 shows the various biometrical measurements and derived properties. The dry-weight density (dry mass divided by estimated body volume) is rather variable, and shows a tendency to decrease with age. The mean density is 0.16 mg/mm^3 . A similar decrease was observed for wrasse, but there that was explained from errors in the dry-weight measurements; using the C-derived dry weight led to a rather constant density at a somewhat lower value of 0.12 mg/mm^3 . Note that the measurements for dry weight and biometry (from which volume is estimated) results from different samples from the same tanks.

Volumetric length shows a steady increase with age, and thereby a much more consistent growth curve than the dry-weight measurements in Figure 10. Growth is almost linear, which is expected from the initial part of a von Bertalanffy growth curve. There are no signs of ‘metabolic acceleration’ [4, 6]. Metabolic acceleration is quite common among fish species, and would lead to an upcurving of the volumetric length versus age curve. There seem to be some differences in growth rate between the treatments, but the final sizes are rather similar.

The shape correction coefficient (based on SL) increases with age. This is even clearer when the shape coefficient is plotted against volumetric length. Larger organisms have a less-elongated shape (more volume per unit of SL). This is quite similar to the pattern observed for ballan wrasse. Correcting for differences in growth rate (see lower-left panel), there are no differences in shape between the various food types. The hyperbolic-with-maximum function, as used for wrasse, does not work very nicely for the lumpsuckers. Instead, I used a data smoothing, and linear interpolation based on 20 smoothed data points. This is shown as the green curve in Figure 12 and provides a good description over the course of the experiment (this curve will be used for the preliminary DEB work described in later sections). The start value for the feeding experiment is considerably larger than the value established after hatching in the egg-quality experiments (0.191). However, the method for volume estimation also differs between the two sets of experiments (in the egg-quality experiment, the volume was estimated without the tail section, see Section

3.5).

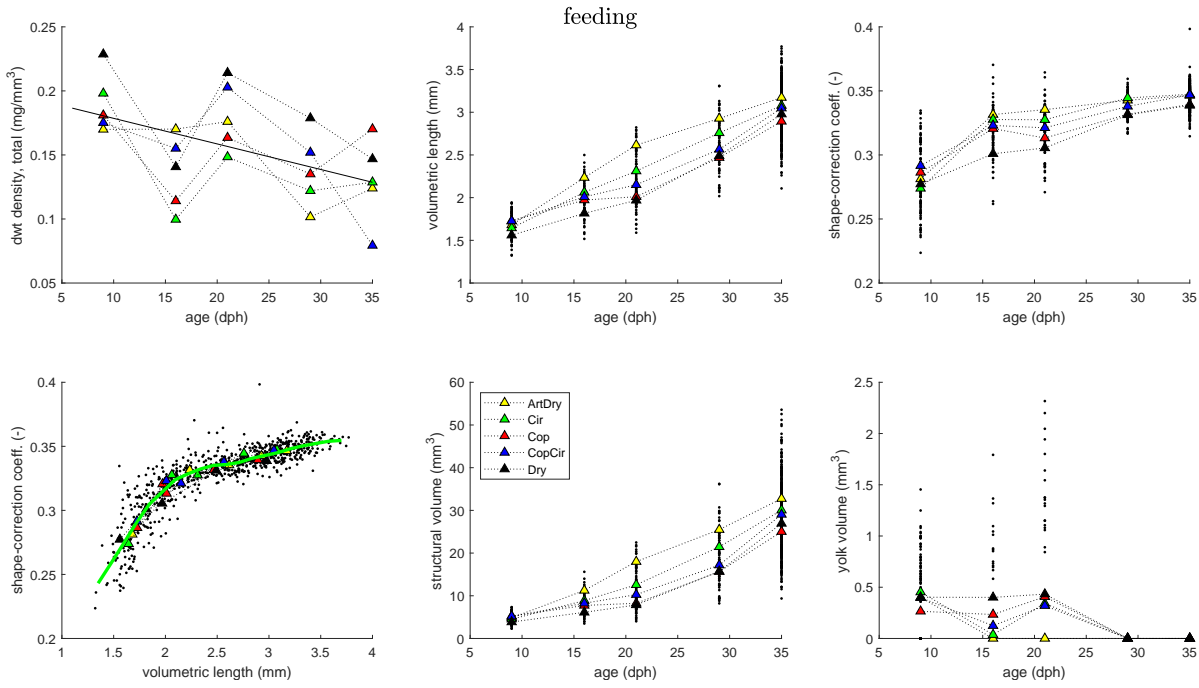


Figure 12: Feeding experiment, biometry over time. Means are shown as filled symbols and individual measurements as dots. The green line in the shape-correction plot (bottom-left) is the simplified smoothed average.

6 Comparison to DEBkiss model

6.1 Egg-quality experiments

These data are not particularly suitable for DEB-based analysis, especially because there is no information on body size and yolk volume over time. The only time-resolved information is on respiration. Note that the total dry weight of the egg is of limited help since this is the sum of structure, yolk and chorion (and hardly changes over time). Nevertheless, it is interesting to see how the DEBkiss parameters established for cod would perform for the lumpsucker. The early development of these species is quite different: the egg of the lumpsucker is much larger (more than a factor of 10 in dry weight), egg development is longer, and the larvae at hatch is much more developed than for cod.

Dry-weight density for yolk is taken as the value derived for a fresh egg. Dry-weight density for structure is set to the mean of the animals in the feeding experiment (which are very low in yolk content). For the carbon content, the egg-quality and feeding experiments give very different results. For now, we simply use these values as is (separate C fraction for the two data sets). This fraction is used in the model to calculate respiration rates, so it should represent the properties of the biomass that is metabolised to fuel growth, development and maintenance. The Arrhenius temperature is set to a general default value (see e.g., [5]). Dry weight of the chorion is taken as 0.40 mg, which is nicely within the range of the drop in dry weight derived in Section 4.1.

Initial yolk dry weight is tweaked to get an approximate fit to the data. The initial structural weight is taken the same as established for cod.

Figure 13 shows the simulations, using the parameter settings for cod, with adaptations for the properties of lumpsucker. The only parameter that was adapted to provide an approximate fit where the initial dry mass of yolk. The overall correspondence is remarkable: despite the very different early life history of the lumpsucker, we can approximate development using a DEBkiss cod in an egg with a substantially larger yolk provisioning. The difference between these species thus seems mainly related to the amount of yolk per egg, and not to differences in metabolism. However, given the sparsity of biometry data, this conclusion is highly preliminary. Especially the lack of time-resolved data for yolk and body size is problematic, in particular since the data analysis for ballan wrasse showed unexpected patterns that did not correspond to the DEBkiss predictions.

Symbol	Explanation	cod	egg-quality	feeding
First step settings				
d_B	Dry-weight density yolk (mg/mm ³)	0.0745	0.25	n.a.
d_C	Carbon content structure/yolk (mg/mg)	0.40	0.51	0.32
d_V	Dry-weight density structure (mg/mm ³)	0.15	0.16	0.16
f	Scaled feeding post-hatch (-)	0	0	1
T_h	Hatching time (d)	16	28	28
T	Temperature in the test (°C)	6	10	10
T_A	Arrhenius temperature (K)	n.a.	8000	8000
W_{B0}	Initial yolk dry weight (mg)	0.10	1.2	0
W_c	Weight of chorion (mg)	0.020	0.40	n.a.
W_{V0}	Initial structural dry weight (mg)	0.00235	0.00235	0.80
δ_M	Shape-correction coefficient (-)	0.157	0.191	$h(t)$
Basic DEBkiss parameters for cod				
F_{RQ}	Respiration quotient (-)	0.8		
J_{Am}^a	Max. area-specific assimilation (mg/mm ² /d)	0.0160		
J_M^v	Volume-specific maintenance (mg/mm ³ /d)	0.00437		
y_{VA}	Yield structure on assimilates (-)	0.8		
κ	Allocation to soma (-)	1		

Table 1: Modified parameters, compared to the values established for cod [3]. Symbol $h(t)$ represent smoothed function of time. N.a. is ‘not applicable’.

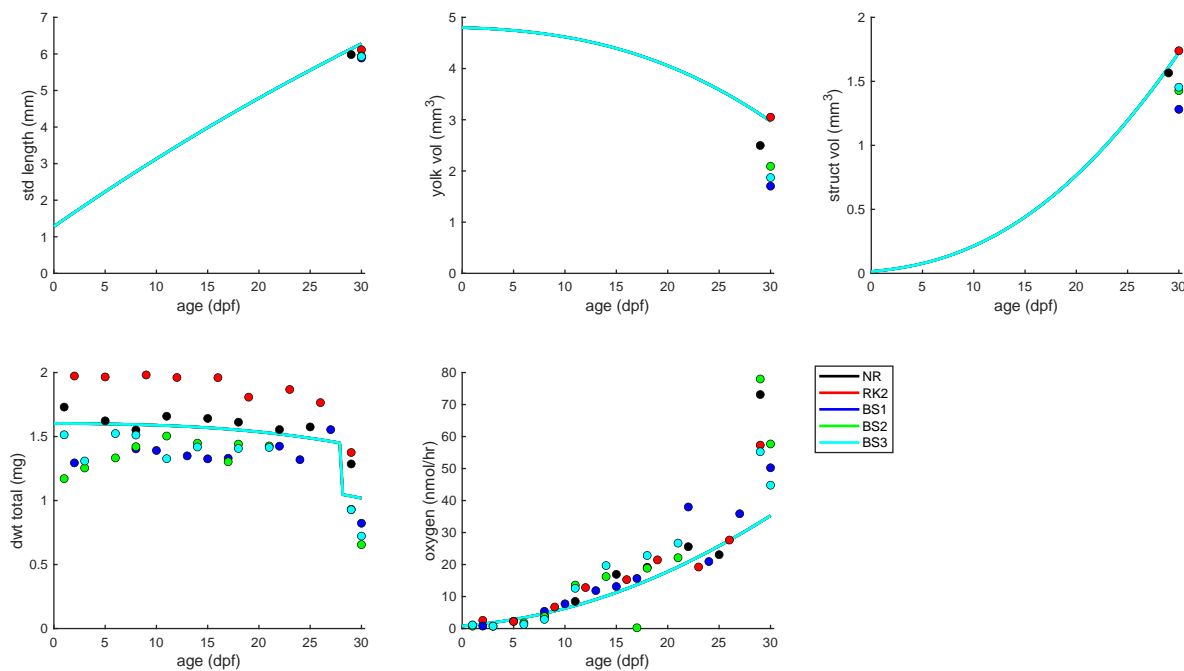


Figure 13: Simulation of early development in the egg-quality experiment, based on the parameter settings in Table 1.

6.2 Feeding experiments: simulation

The simulations for the feeding experiments are shown in Figure 14 and 15. The only parameter tweaked is the initial structural body weight, to obtain a rough correspondence to the start of the data set. Note that the model simulation starts at $t = 8$ dph. This was done as the animals still have a considerable yolk sac at that start of the experiment, and I do not want to model the switch from yolk to external feed. For these simulations, feeding was assumed to be *ad libitum* in all treatments.

The most striking observation is that growth is much faster than predicted by the model. Also note that structural volume shows a much more pronounced increase than standard length. This not only relates to the fact that volume relates to length cubed, but also to the fact that the animal's shape changes over ontogeny: they become more 'rounded', and thus grow more in volume than in length.

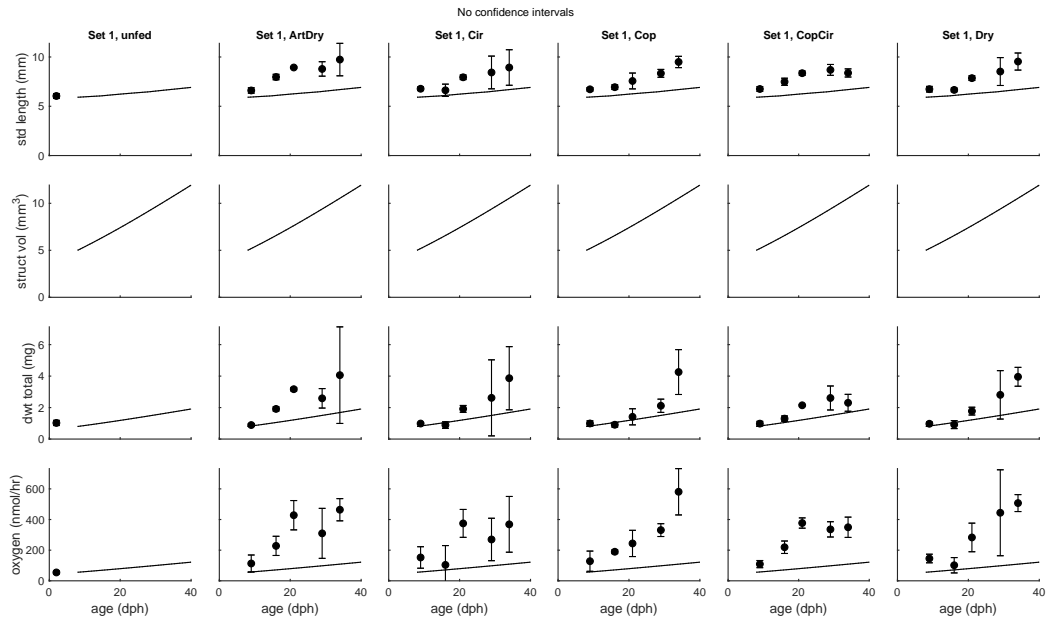


Figure 14: Simulation of development in the feeding experiment, based on the parameter settings in Table 1. Means with CI. Data set 1: weights and respiration.

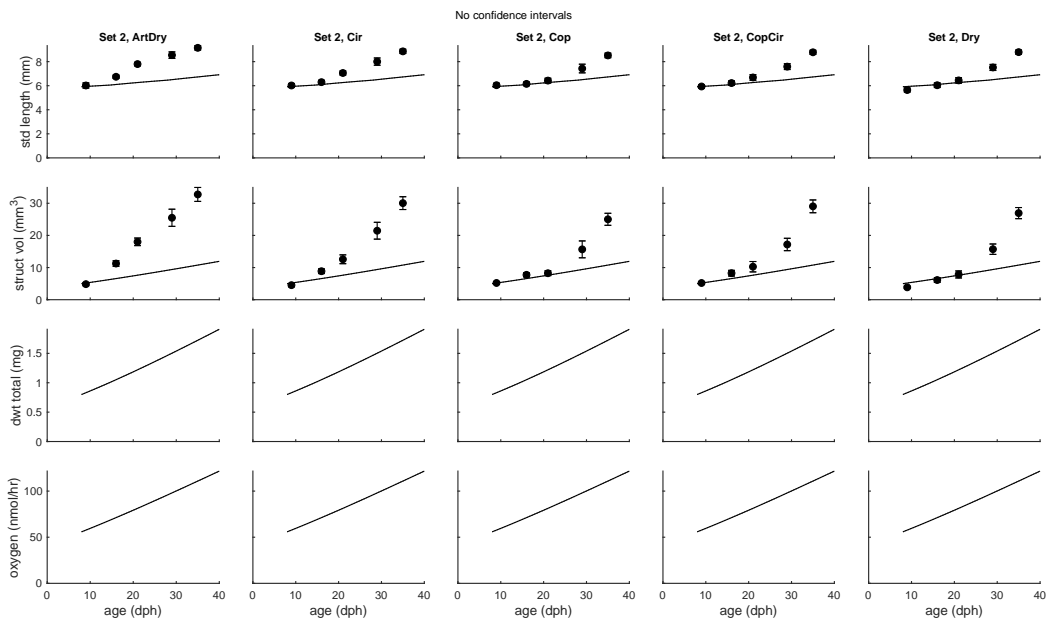


Figure 15: Simulation of development in the feeding experiment, based on the parameter settings in Table 1. Means with CI. Data set 2: biometry.

6.3 Feeding experiments: closer look at variation

Figure 16 and 17 show the individual data points. These plots provide a clear demonstration of the large amount of inter-individual variation in this experiment. This level of variation makes it difficult to observe patterns and hampers comparison between treatments.

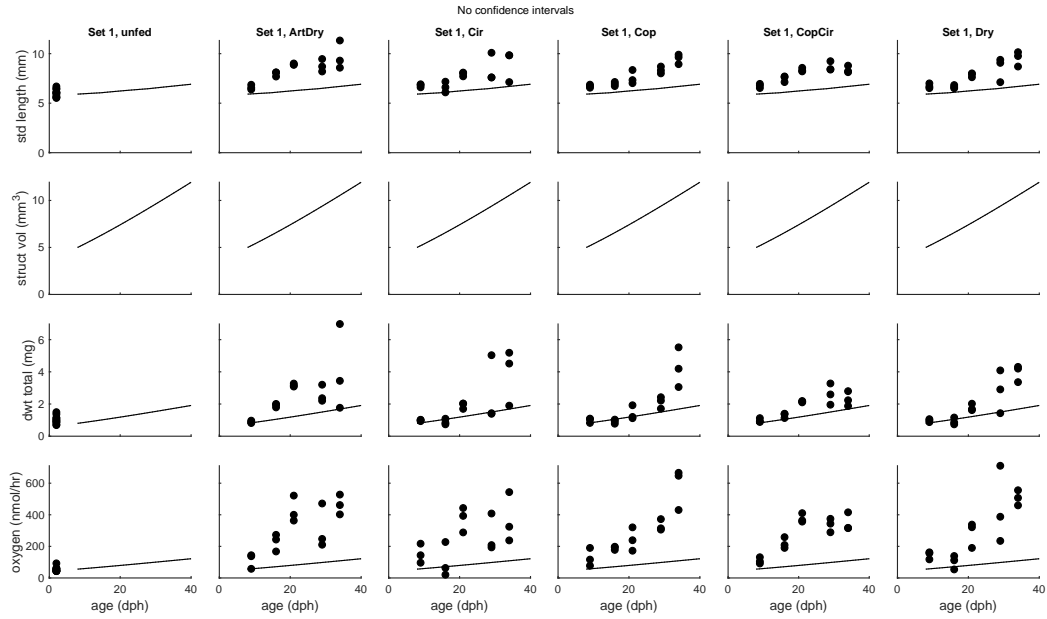


Figure 16: Simulation of development in the feeding experiment, based on the parameter settings in Table 1. Individual replicates shown (means of 2 individuals). Data set 1: weights and respiration.

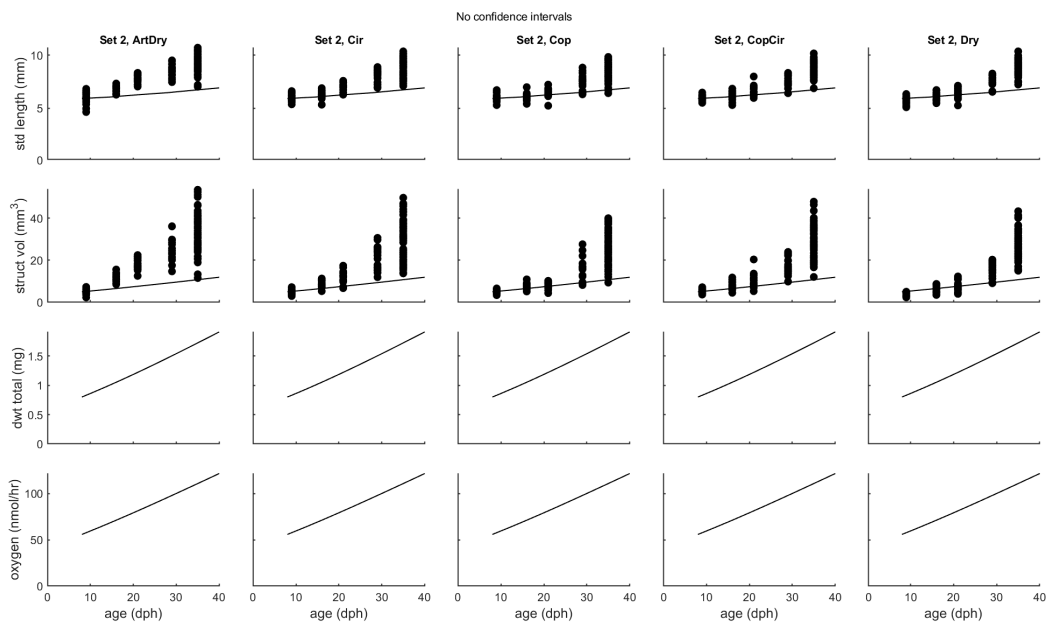


Figure 17: Simulation of development in the feeding experiment, based on the parameter settings in Table 1. Measurements on individuals shown. Data set 2: biometry.

6.4 Feeding experiments: fitting the data

Even though the animals were switched several times to a different food source, I will take a single value for the scaled feeding rate f for each treatment group. The reason is that there are no obvious switches in growth or respiration patterns within each group. Since this data set does not contain information on reproduction, the allocation fraction to soma was fixed to the general default value ($\kappa = 0.8$, see [2]). Note that this differs from the value assumed for the egg-quality fit, where $\kappa = 1$ was used (as derived for Atlantic cod).

Resulting fits are shown in Figure 18 and 19, and parameter estimates in Table 2. The biometry data (Figure 19) are well-described by the model fit. However, the weight and respiration data (Figure 18) show a less convincing correspondence. Interestingly, the fit to the SL data is rather poor in the latter, which implies that the SL measurements in both data sets are not consistent: the respiration data set shows rather consistent higher values for SL than the biometry data. This may simply be a consequence of the large inter-individual variation, though it does hamper model analysis.

For the biometry, the fit is quite good, and there are no signs of metabolic acceleration [4, 6]. Nevertheless, the resulting parameter values show that the specific assimilation rate is considerably larger than the value that worked so well for the egg development (almost a factor 3 higher). Apparently, some form of acceleration has occurred, possibly between 0 and 8 dph. It may, however, also be possible that there is acceleration over the experiment, but that this is hidden in the inter-individual variation (the mean response from a variable cohort is not necessarily representative for an average individual). The maintenance rate is hardly affected by fitting.

For the respiration data set, the fit is overall poorer. As explained, the SL measurements point at inconsistencies with the biometry data, and the data also show a different pattern. In several treatments, there seems to be faster initial growth, and a reduction in growth by the end of the experiment. This is most obvious in the ‘CopCir’ treatment, where all three traits follow a similar pattern of a reduced performance for the last two observation times (which are after the switch to dry food at $t = 23$ dpf). However, such a pattern is completely absent in the biometry data set for the same treatment.

The model fits point at the treatment ‘ArtDry’ as the one with the best performance. The other treatments perform largely similar; some 8-17% less resource assimilation compared to the best treatment. However, given the large variation in the data set, and the inconsistencies between the two sets of measurements, this conclusion can only be very preliminary.

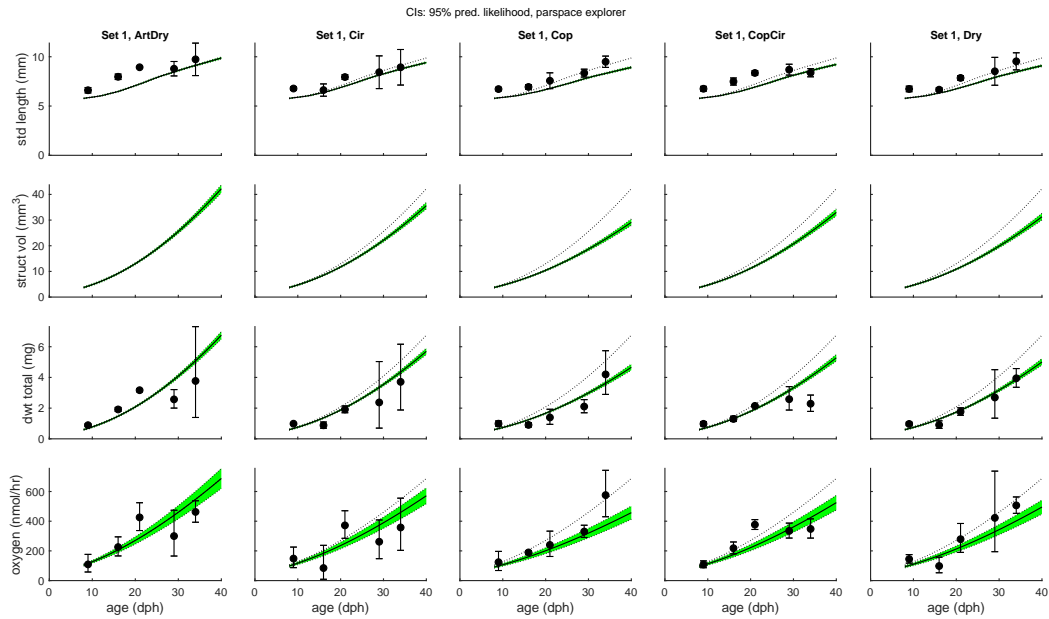


Figure 18: Fit of development in the feeding experiment, based on the parameter settings in Table 1. Means with CI. Green areas are 95% CIs on the model curve due to parameter uncertainty. Data set 1: weights and respiration.

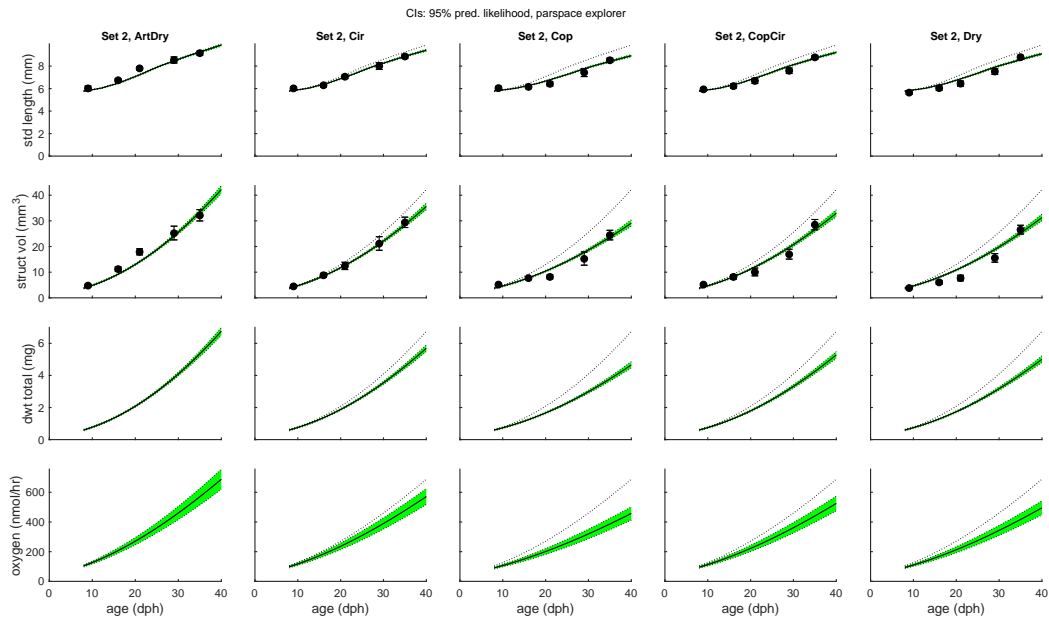


Figure 19: Fit of development in the feeding experiment, based on the parameter settings in Table 1. Means with CI. Green areas are 95% CIs on the model curve due to parameter uncertainty. Data set 2: biometry.

Symbol	Explanation	cod	feeding
J_{Am}^a	Max. area-specific assimilation (mg/mm ² /d)	0.0160	0.044 (0.041-0.046)
J_M^v	Volume-specific maintenance (mg/mm ³ /d)	0.00437	0.0042 (0.0035-0.0048)
W_{V0}	Initial structural dry weight (mg)	0.00235	0.60 (0.55-0.64)
κ	Allocation to soma (-)	1.0	0.8 (n.e.)
f_1	Scaled feeding ‘ArtDry’ (-)		1 (n.e.)
f_2	Scaled feeding ‘Cir’ (-)		0.92 (0.90-0.94)
f_3	Scaled feeding ‘Cop’ (-)		0.83 (0.81-0.85)
f_4	Scaled feeding ‘CopCir’ (-)		0.88 (0.96-0.90)
f_5	Scaled feeding ‘Dry’ (-)		0.86 (0.84-0.89)

Table 2: Fitted parameters, relative to the values established for cod [3]. N.e. is ‘not estimated’. For the other parameters, the values in Table 1 are used. Rate constants are all referenced to 6°C.

References

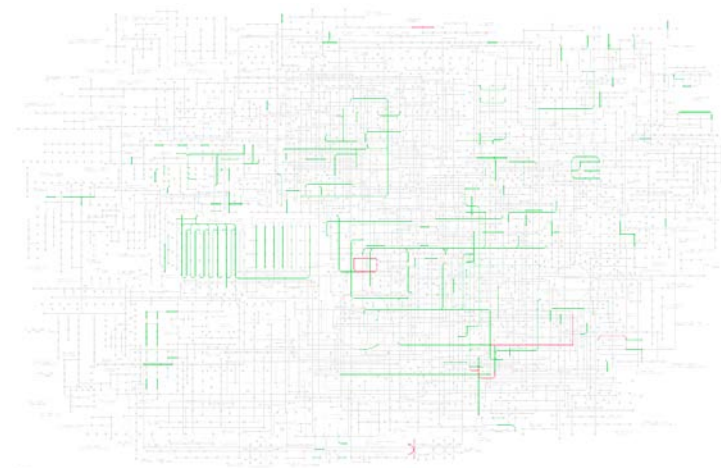
- [1] T. Jager. All individuals are not created equal; accounting for interindividual variation in fitting life-history responses to toxicants. *Environmental Science & Technology*, 47:1664–1669, 2013.
- [2] T. Jager, B. T. Martin, and E. I. Zimmer. DEBKiss or the quest for the simplest generic model of animal life history. *Journal of Theoretical Biology*, 328:9–18, 2013.
- [3] T. Jager, R. Nepstad, B. H. Hansen, and J. Farkas. Simple energy-budget model for yolk-feeding stages of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Ecological Modelling*, 385:213–219, 2018.
- [4] S. A. L. M. Kooijman, L. Pecquerie, S. Augustine, and M. Jusup. Scenarios for acceleration in fish development and the role of metamorphosis. *Journal of Sea Research*, 66:419–423, 2011.
- [5] K. Lika, M. R. Kearney, V. Freitas, H. W. Van der Veer, J. Van der Meer, J. W. M. Wijsman, L. Pecquerie, and S. A. L. M. Kooijman. The “covariation method” for estimating the parameters of the standard Dynamic Energy Budget model I: philosophy and approach. *Journal of Sea Research*, 66:270–277, 2011.
- [6] K. Lika, S. A. L. M. Kooijman, and N. Papandroulakis. Metabolic acceleration in Mediterranean Perciformes. *Journal of Sea Research*, 94:37–46, 2014.
- [7] C. B. Miller, C. A. Morgan, F. G. Prah, and M. A. Sparrow. Storage lipids of the copepod *Calanus finmarchicus* from Georges Bank and the Gulf of Maine. *Limnology and Oceanography*, 43(3):488–497, 1998.
- [8] I. B. Øverjordet, R. Nepstad, B. H. Hansen, T. Jager, J. Farkas, D. Altin, U. Bronner, and T. Nordtug. Toxicokinetics of crude oil components in Arctic copepods. *Environmental Science & Technology*, 52(17):9899–9907, 2018.

Appendix E – KEGG Pathway map for lumpfish larvae

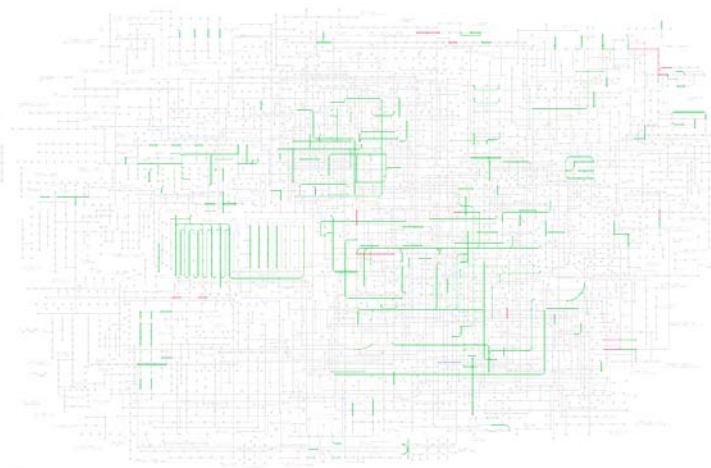
Enriched KEGG metabolic pathways mapped:

Cir vs Art treatment

DPH 10



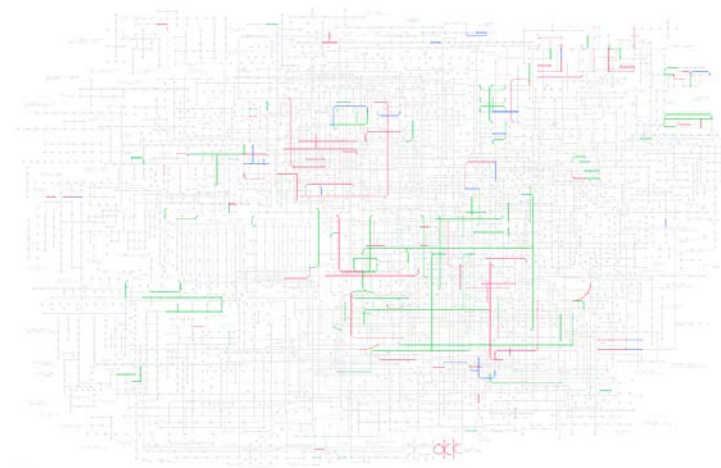
DPH 17



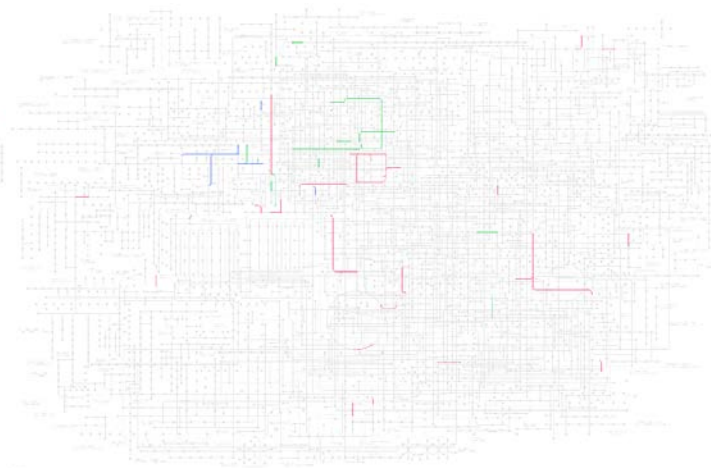
DPH 21



DPH 26



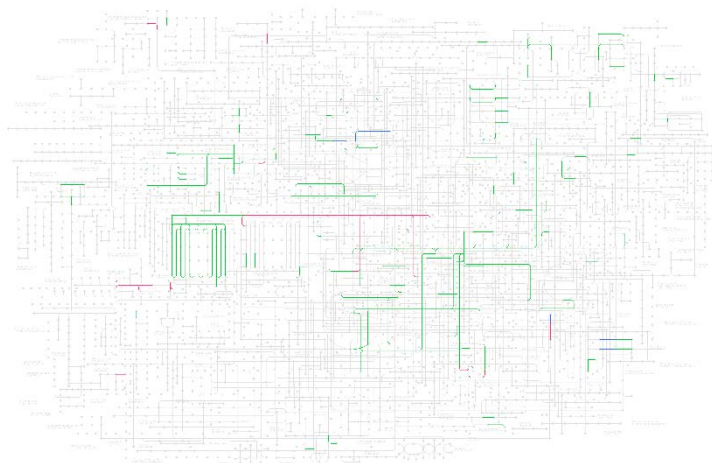
DPH 33



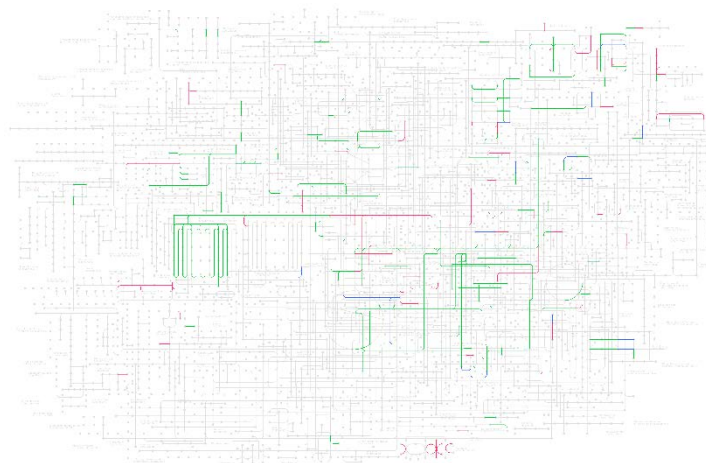
Enriched KEGG metabolic pathways mapped:

Cop/FD vs Art treatment

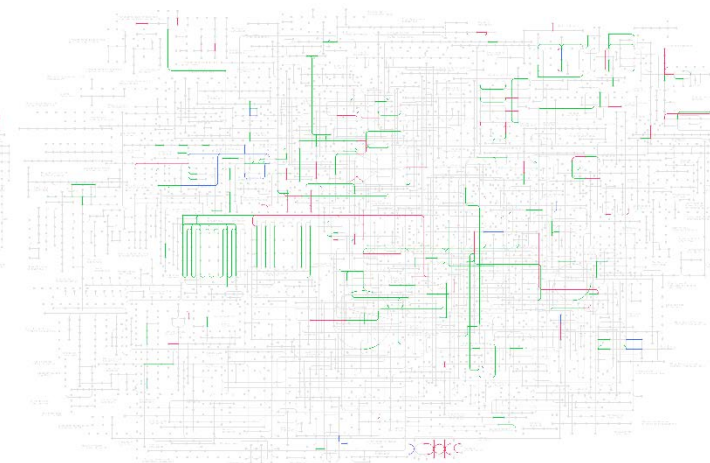
DPH 10



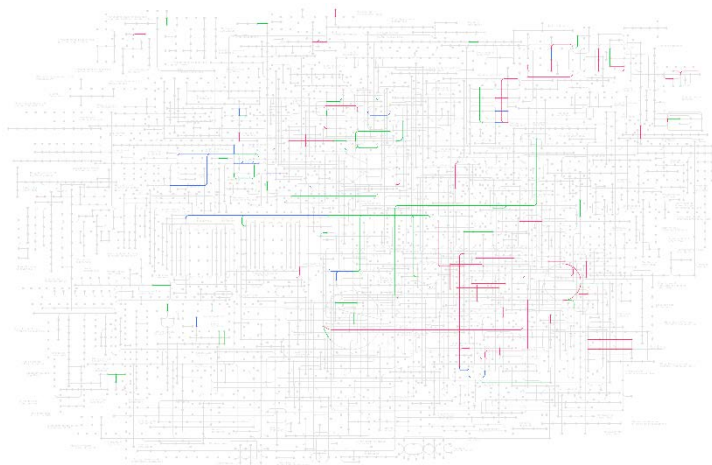
DPH 17



DPH 21



DPH 26



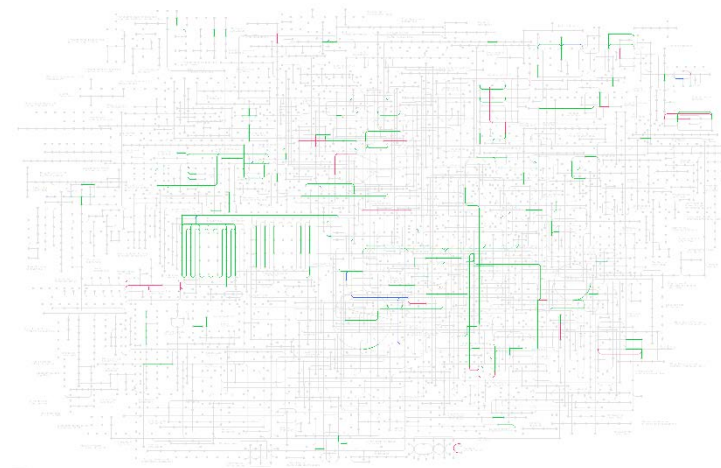
DPH 33



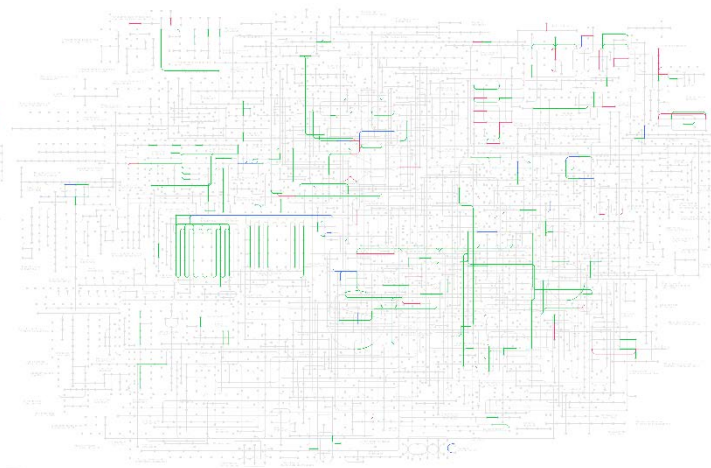
Enriched KEGG metabolic pathways mapped:

FD vs Art treatment

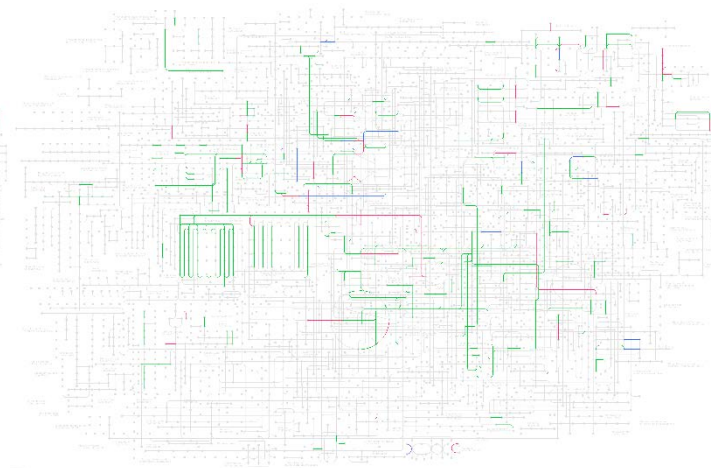
DPH 10



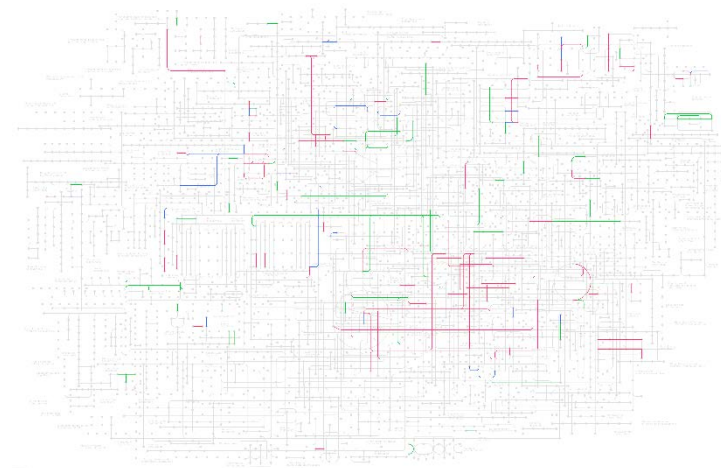
DPH 17



DPH 21



DPH 26



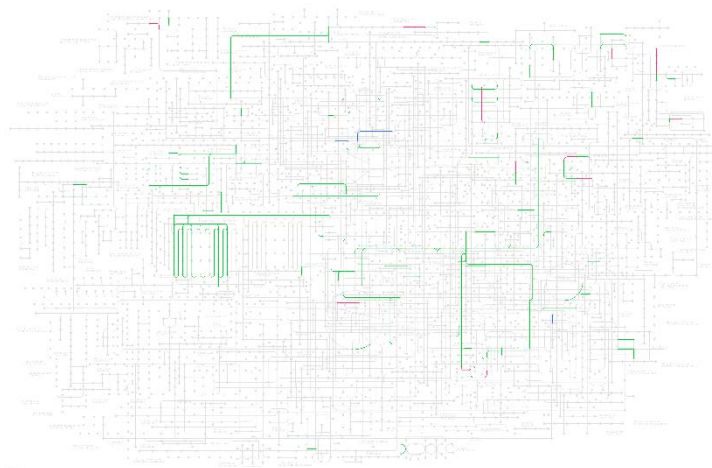
DPH 33



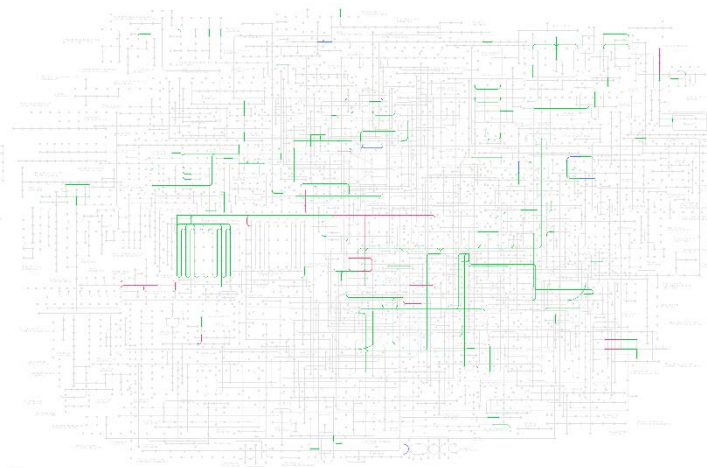
Enriched KEGG metabolic pathways mapped:

Cop/Cir vs Art treatment

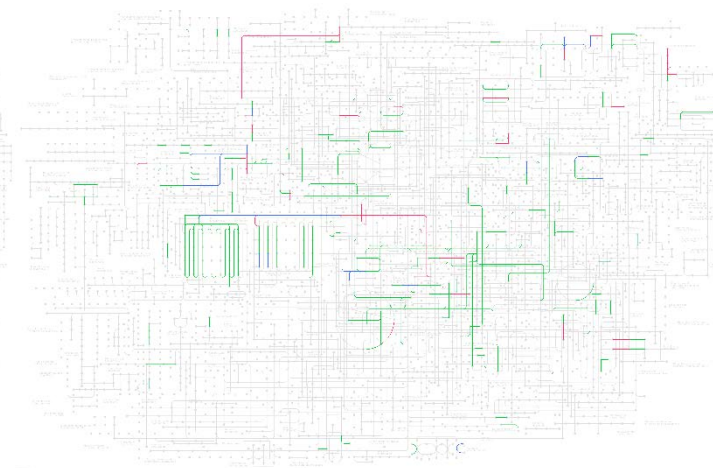
DPH 10



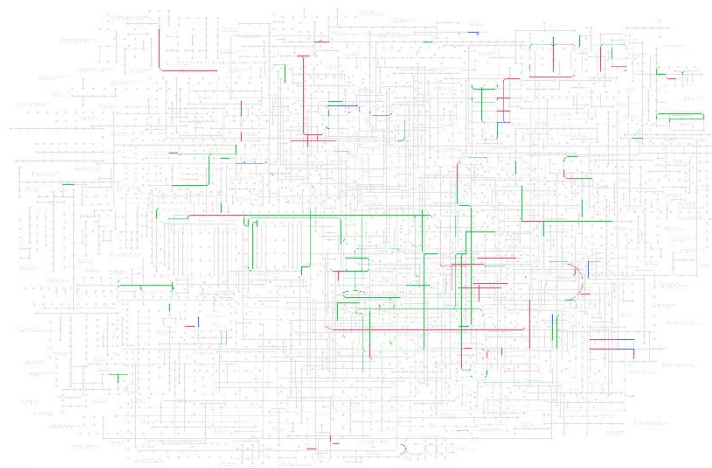
DPH 17



DPH 21



DPH 26



DPH 33

