

Testing av rekeskallmel i torskefôr

Faglig sluttrapport



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

Rapportnummer: 10/2024	ISBN: 978-82-8296-780-8	ISSN: 1890-579X
Dato: 14. mars 2024	Antall sider + sider vedlegg: 31 + 0	Prosjektnummer: 14042
Tittel: Testing av rekeskallmel i torskefôr – Faglig sluttrapport		
Title: Shrimp by-product meal in feeds for Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)		
Forfatter(e): André S. Bøgevik ¹ , Thor Magne Jonassen ² , Rene Alvestad ¹ , Elvis Chikwati ³ , Guro Løkka ³ og Trond M. Kortner ³		
Avdeling: ¹ Nofima, ² Akvaplan-niva, ³ NMBU Veterinærhøgskolen		
Oppdragsgiver: Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond		
Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.: FHF 901804		
Stikkord: Rekeskallmel, torskefôr, fordøyelse, tarmhelse		
Sammendrag/anbefalinger: Skallmel fra marine råstoff er en sidestrøm som kan brukes som ingredienser i fôr til fisk. Fordøyelse og tarmhelse ble derfor studert i 300-grams torsk tildelt kontrolldiett med planteproteinet solsikkemel som i to testfôr ble byttet ut med 15 % krabbeskallmel eller 10 % rekeskallmel. Forsøket ble gjennomført over 27 dager med daglig registrering av fôrintak. Ved forsøksslutt ble det observert lik vekst og fôrintak mellom diettgruppene, men en sterk tendens ($P=0.057$) til høyere fôrfaktor hos torsk tildelt dietten med rekeskallmel sammenlignet med de to andre diettgruppene. Videre ble det observert signifikant høyere fordøyelse av aminosyrer i krabbeskalldietten sammenlignet med de andre diettene, men ingen signifikante forskjeller mellom rekeskalldietten og kontroll. Vår studie viste ingen forrelaterte forskjeller i dødelighet, analyserte blodverdier, eller tarmhelse hos torsken ved avslutning av studien. Med utgangspunkt i denne studien og tidligere publiserte funn er rekeskallmel en ressurs som kan brukes med verdifulle næringsstoffer som kan balansere diettene. Ytterligere vekstforsøk til minst doblet vekt, gjerne på stor torsk, bør gjennomføres for å studere hvordan ulike innblandingsnivå av skallmel kan påvirke torskens fôrintak, vekst og helse.		
English summary/recommendation: By-products from marine shellfish production are a potential source as a feed ingredient in Atlantic cod feeds. Digestion and intestinal health were therefore studied in 300 g Atlantic cod given feeds with 15% crab meal and 10% shrimp meal, substituting sunflower meal in a control diet. Feed intake was monitored during the 27-days long trial. Similar growth and feed intake were observed between the dietary groups, but a strong tendency ($P=0.057$) to a higher feed conversion ratio in cod given shrimp meal compared to the other diets. Furthermore, there was a higher amino acid digestibility of the crab meal diet compared to the two other diets. No differences in mortality and fish robustness were observed between the dietary groups. Based on this study and other published work, shrimp meal is an ingredient with essential nutrients that can be utilized in feeds to Atlantic cod. Furthermore, a growth study in larger fish should be performed to study the impact of inclusion levels of shellfish meals on fish performance and health in Atlantic cod.		

Forord

På oppfordring og finansiering fra FHF ble prosjektet «Rekeskallmel i torskefôr» (prosjektnummer 901804) initiert for å teste potensialet til rekeskall i fôr til torsk. Innspillet til FHF på denne problemstillingen kom fra Stella Polaris AS som produserer ingrediensen. FHF ønsket å kople dette prosjektet (forsøket) til Innovasjonsprosjektet FORCOD (Forskningsrådet, prosjektnummer 337056), hvor Nofima, Akvaplan-niva og NMBU er FoU-partnere, for å oppnå både kostnadmessige og vitenskapelige synergier. En av oppgavene i FORCOD var å teste om aske og kitin fra skallmel kan påvirke tarmhelsen, og dermed gi mindre problemer med tarmslyng på stor torsk. De to alternative fôrråstoffene ble derfor testet samtidig under like forhold ved Havbruksstasjonen i Tromsø våren 2023.

Referansegruppen for FHF-prosjektet besto av prosjektpartnerne i FORCOD, prosjektleder for Nasjonalt Nettverk for Torskeoppdrett og representant for Stella Polaris:

- Kathrine Bakkemo, Fagsjef marine arter Skretting, kathrine.ryvold.bakkemo@skretting.com
- Julianne Jacobsen, Fagleder fiskehelse Norcod, jj@norcod.no
- Ingelise Egelund, HR-prosjektleder Ecomarin As (repr Arctic Cod), ingelise@ecomarin.com
- Jan Christian Ervik, Produksjonsleder Statt Torsk, jce@statt.no
- Fredrik Grahl-Jacobsen, Driftsleder hos Havlandet RAS-Pilot, fredrik.grahl-jacobsen@incgruppen.no
- Jaran Rauø, Utviklingsdirektør Stella Polaris, jaran@stellapolaris.no
- Keven Vottestad, Prosjektleder Nasjonalt Nettverk for Torskeoppdrett hos Cod Seafresh AS, keven@codseafresh.no

Innhold

1	Sammendrag (både på norsk og engelsk)	1
2	Innledning	2
3	Problemstilling og formål	3
4	Prosjektgjennomføring	4
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	7
5.1	Diettsammensetning og pelletkvalitet	7
5.2	Fiskens prestasjon i forsøket	9
5.3	Individbaserte vektregistreringer ved sluttuttaket	12
5.4	Mage-/tarminnhold i fôret fisk og etter faste i 24 og 48 timer	15
5.5	Mage-tarmfunksjoner	16
5.6	Fordøyelse	19
5.7	Tarmhelse	21
5.8	Blodkjemi	26
5.9	Oppsummerende diskusjon og implementering av resultatene	27
6	Hovedfunn	29
7	Leveranser	30
8	Referanser	31

1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Skallmel fra marine råstoff er en sidestrøm som kan brukes som ingredienser i fôr til fisk. Fordøyelse og tarmhelse ble derfor studert i 300-grams torsk tildelt kontrolldiett med planteproteinet solsikkemel som i to testfôr ble byttet ut med 15 % krabbeskallmel eller 10 % rekeskallmel for å oppnå lik kjemisk sammensetning av råprotein og totalfett i diettene. Dietten hadde dermed et utbytte av karbohydrater i kontrolldietten med mineraler i skallmelet fra krabbe og reke. Forsøket ble gjennomført over 27 dager med daglig registrering av fôrinntak. Ved forsøksslutt ble det observert lik vekst og fôrinntak mellom diettgruppene, men en sterk tendens ($P=0.057$) til høyere fôrfaktor hos torsk tildelt dietten med rekeskallmel sammenlignet med de to andre diettgruppene. Krabbeskallgruppen hadde en lavere fordøyelse av tørrstoff grunnet det høye innholdet av kalsium i dietten med lav fordøyelse. Samtidig ble det observert signifikant høyere fordøyelse av aminosyrer i krabbeskalldiettene, sammenlignet med kontroll og gruppen tildelt fôr med rekeskallmel som viste lik aminosyrefordøyelse. Ved avslutning av forsøket ble all fisken veid individuelt og mage-/tarmsystemet undersøkt makroskopisk og histologisk. Feilleie av tarm, såkalt strangulerende obstruksjon, tidligere kalt tarmslyng, ble kun observert i ett individ. Utover dette ble tarmhelsen hos fisken vurdert til å være hovedsakelig normal, frisk, og funksjonell. Det ble ikke observert noen klare effekter av diett på dødelighet, analyserte blodverdier, gallesaltnivåer i tarminnhold, eller tarmmorfologi. Det ble observert stor forskjell i fiskestørrelse (150-700 g), med en klar indikasjon at tarmlengde er korrelert til fiskens størrelse. En kan ikke konkludere ut fra dette forsøket bakenforliggende årsaker til strangulerende obstruksjon av tarm, men det er ikke utelukket at en relativt lengre tarm med mer komplisert tarmforløp kan forårsake plassmangel og komplikasjoner i bukhulen senere i livsstadiet. Med utgangspunkt i denne studien og tidligere publiserte funn er rekeskallmel en ressurs som kan brukes med verdifulle næringsstoffer som kan balansere diettene med et inklusjonsnivå opp til 10 % av dietten. Det er anbefalt at det gjennomføres vekstforsøk med ulike inklusjonsnivåer av skallmel for å studere effekter på fôrinntak, vekst og tarmhelse, og gjerne på stor fisk for å studere eventuelle effekter på forekomst av tarmproblemer.

By-products from marine shellfish production are a potential source as a feed ingredient in Atlantic cod feeds. Digestion and intestinal health were therefore studied in 300 g Atlantic cod given feeds with 15% crab meal and 10% shrimp meal, substituting sunflower meal in a control diet. Thus, substituting a higher carbohydrate content in the control with higher mineral content (particularly calcium) in the test diets with shell meals. Feed intake was monitored during the 27-days long trial. Similar growth and feed intake were observed between the dietary groups, but a strong tendency ($P=0.057$) to a higher feed conversion ratio in cod given shrimp meal compared to the other diets. There were however observed a lower dry matter digestibility in the crab meal group compared to the other diets that can be related to a lower digestibility of minerals in the diet compared to carbohydrates in the control diet. At the same time there was a higher amino acid digestibility of the crab meal diet compared to the other diets, which can promote growth (although not shown in the short trial performed in this study). There were no differences in nutrient digestibility between shrimp meal diet and the control. At termination of the experiment, all the fish were individually weighed, and their gastrointestinal tracts were examined both macroscopically and histologically. Only one individual exhibited signs of intestinal displacement, so-called strangulating obstruction, or previously referred to as intestinal volvulus. Otherwise, the intestinal health of the fish was assessed as predominantly normal, healthy, and functional. No clear effects of diet were observed on mortality, analysed blood parameters, bile salt levels in intestinal contents, or intestinal morphology. However, there was significant variation in fish size (ranging from 150 to 700 grams), with a clear indication that intestinal length correlates with fish size. While this experiment does not provide conclusive answers regarding the underlying causes of strangulating obstruction of the intestine, it is not ruled out that a relatively longer intestine with a more complex course could lead to space constraints and complications within the abdominal cavity at later life stages. Based on this study and other published work, shrimp meal is an ingredient with essential nutrients that can be utilized in feeds to Atlantic cod at inclusion levels up to 10% of the diet. We recommend that a dedicated growth trial with different inclusion levels of shell meal should be performed to study effect on feed intake, growth and health, preferable in large fish to potentially explore effects the diets could have on intestinal disorders.

2 Innledning

Reststoff av reker er en marin ressurs som i dag brukes for det meste til humant konsum, spesielt i buljong. Rekeindustrien ønsker flere bruksområder for å øke verdien av dette råstoffet. I Norge er det per i dag tilgjengelig 850 tonn, mens globalt er dette volumet angitt til 2.350 tonn. Med økende fokus på bærekraft vil mer av dette råstoffet være tilgjengelig globalt, samt at økende fangst og oppdrett av rekearter, kan forventes å gi økt mengder av rekeskallmel i tiden fremover.

Analyser viser at rekeskallmel produsert fra dette restråstoffet av reker inneholder ca. 37 % protein, 5 % fett, 17 % kitin, 36 % aske og 5 % vann. Dette er en ingrediens som kan inngå i fôr til fisk og bidra med essensielle næringsstoffer fra en marin ressurs som har et spesielt potensial som fôrstoff til oppdrettstorsk (Tibbetts m. fl., 2006). I produksjon av ingredienser er det flere faktorer som kan påvirke proteinkvaliteten og næringsprofilen inkludert egenskapene til råvaren (arter, friskhet, hele dyr eller skrap), behandling av råvaren som tørkeprosessen og temperatur, lipidperoksidasjon og lagringsforhold (Pike, 1991). Biproduktet fra krepsdyr er primært skall som inneholder 50–80 % kitin. Den naturlige dietten til torsk består av 37 % kitinrike krepsdyr og pigghuder, inkludert krabber, reker og sjøstjerner (se Lall og Nanton, 2002). Torsk produserer fordøyelsesenzymer kitinase, og fordøyeligheten av kitin kan være opptil 90 % for torsk (Danulat, 1987). Biprodukter fra krepsdyr er derfor identifisert som gode kandidater til å erstatte fiskemel i dietter for atlantisk torsk (Toppe m. fl., 2006). Samtidig har mel fra krepsdyr ofte høyt askeinnhold, noe som kan påvirke fordøyeligheten av fiskefôr negativt (NRC, 1993).

Fordøyelighetsstudier av flere marine restråstoff (Tibbetts m. fl., 2006) med innblanding på 30 % til et referansefôr viste god protein- og energi-fordøyelighet for krabbeskallmel (hhv. 89,4 % og 82,4 %), men noe lavere for rekeskallmel (hhv. 66,7 % og 41,4 %) hos torsk på i underkant av 100 g. En lignende studie ble også utført av Hansen m. fl. (2013), der 10 og 20 % av et kontrollfôr med høyt innhold av planteprotein ble byttet ut med enten skallmel fra krabbe eller reker. Tilsetning av krabbeskallmel opptil 20 % og rekeskallmel opptil 10 % ga samme vekst og fôropptak som kontrollfôret, mens en økning av rekeskallmel til 20 % resulterte i en reduksjon i fôropptak, fettfordøyelighet og vekst, og i endret tarmhistologi hos torsken. Alle dietter, bortsett fra dietten tilsatt 20 % rekeskallmel, resulterte i normale nivåer av næringsstoffer i blodplasma og hematologiske verdier, og viste god fiskehelse med eller uten tilsetning av marin aske. Toppe m. fl. (2006) viste at torsk med sluttvekt på ca. 500 g vokste raskere med en balansert diett tilsatt 17,6 % sammenlignet med 5,4 % krabbeskallmel. Inklusjonsnivået av fôringrediensen og balansering av diettene til likt innhold av næringsstoffer har derfor stor betydning for fôrets fordøyelighet, samt fiskens vekst og helse.

Ulike former for feilleie og innklemming av tarm, tidligere referert til som tarmslyng (Kaada, 2008) regnes som en av de største dødsårsakene på stor torsk (fra 100 g) i oppdrett. I forbindelse med andre forskningsaktiviteter i FORCOD-prosjektet (NFR nr. 337056) er det nylig gjennomført en detaljert karakterisering denne tarmlidelsen, som korrekt betegnes som strangulerende obstruksjon (Skedsmo m.fl., under review; Journal of Fish Diseases). Effekt av aske og kitin fra skallmel på tarmhelse og generell helse er lite studert, men en del artikler viser positiv effekt (oppsummert i artikkelen til Ringø m. fl. (2012)) og man trenger mer kunnskap på feltet.

3 Problemstilling og formål

Prosjektet har studert hvordan innblanding av rekeskallmel påvirker fôropptak, fordøyelse og tarmhelse hos torsk på 300 g i kommersielt relevante dietter som er balansert på hovednæringsstoffer. Dette vil gi relevant kunnskap til næringen om potensialet til ingrediensen som et fôrråstoff. I Forskningsrådprosjektet FORCOD har vi flere hypoteser om årsak til redusert tarmhelse hos torsk, deriblant sammenheng mellom fôringsfrekvens, fôrsammensetning og passasjehastighet i mage-/tarm. Skallmel kan bidra til endret motorikk i tarm som mulig kan ha en effekt på tarmens helse. Studien kan belyse disse temaene, og gi fôrfirma og oppdrettere nye verktøy i disse problemstillingene. Tilsetning av skallmel i fôr vil også bidra til å øke fôrets bærekraft gjennom utnyttelse av restråstoff, samt være en lokal ingrediens som vil kunne redusere fôrets CO₂-avtrykk.

Prosjektet hadde følgende leveranser:

- Referat referansegruppemøte 30. mai 2023
- Referat referansegruppemøte 20. oktober 2023
- Referat referansegruppemøte med gjennomgang av sluttrapport (januar 2024)
- Faglig sluttrapport (februar 2024)
- Administrative sluttrapport (februar 2024)
- Utkast til artikkel for publisering i peer-review journal 2024
- Presentasjon på Havbrukskonferansen til FHF/NFR 2024

4 Prosjektgjennomføring

Rekeskallmel fra Stella-Polaris AS ble inkludert i et fôr produsert hos Skretting ARC, i tillegg til et kontrollfôr og fôr med krabbeskallmel, som inngår i FORCOD. Kontrollfôr (Diett A) med solsikkemel ble brukt for å bruke en ingrediens med lavt innhold av protein til å bytte ut med skallmel for å kunne balansere diettene på protein og fordøyelig protein:energi ratio (DP:DE). I Diett B ble 15 % krabbeskallmel tilsatt i bytte med solsikkemel, mens 10 % rekeskallmel ble tilsatt i diett C basert på erfaringer fra tidligere studier (Hansen m. fl., 2013). Diettene var kalkulert til å ha et proteininnhold på ca. 50 %, 17 % fett og ratio på 2,5 mellom fordøyelig protein:energi (Tabell 1).

Tabell 1 Fôrformulert og kalkulert kjemisk sammensetning av forsøksfôr produsert av Skretting ARC

Fôrformulering	Diett A (Kontroll)	Diett B (Krabbe)	Diett C (Reke)
Fiskemel	42	42	42
Hvetegluten	17	19	15
Solsikkemel	15	0	8
Fiskeolje	11	11	10
Hvete	8	5	8
Hestebønner	5	5	5
Tilsetningsstoffer	2	3	2
Krabbeskallmel	0	15	0
Rekeskallmel	0	0	10
Kalkulert innhold			
Aske (%)	7	16	10
Total fett (%)	17	17	17
Råprotein (%)	52	49	50
Fordøyelig protein (DP; %)	45	43	44
Fordøyelig energi (DE; MJ/kg)	18	17	18
DP:DE ratio	2.5	2.5	2.5

Fôrene ble tildelt torsk i et forsøk ved Havbruksstasjonen i Tromsø (Kårvika). Mellom 29-36 stk. torsk à ca. 300 g ble fordelt i 9 kar (500L) den 2. mai 2023. Fisken hadde tidligere vært fordelt i 2 kar à 1000 L og ble derfor akklimatisert i de nye karene og tildelt et standard kommersielt fôr (Amber Neptun, Skretting) i en periode på 2 uker. Den 16. mai 2023 ble antall og bulkvekten av fisken per kar registrert for beregning av snittvekt til fisken ved oppstart av forsøket. De respektive forsøksfôrene ble tilfeldig tildelt triplikate kar i perioden 16. mai til 13. juni 2023 (Figur 1). I den perioden ble det gjennomført daglig registrering av fôrinntak (alle dager), dødfisk, samt miljødata i vann. Fisken fikk tildelt fôr kontinuerlig gjennom døgnet, med opphold kl. 12-14 på dagen under fôrspilloppsamling. Fôrspillet utgjorde 10-40 % av utfôret mengde, og justeringer ble gjort for appetittføring med minimum 10 % overføring. Siste dag for ordinær fôrspilloppsamling var søndag 11. juni 2023, slik at en deretter kunne fôre fisken kontinuerlig time for time frem til uttaket startet for hver enkelt kar i løpet av tirsdagen 13. juni 2023. Dette for å hindre aktivitet i forsøkshallen som kunne forstyrre fiskens appetitt, og sikre mage-/tarmfylling i fisken som ble prøvetatt.



Figur 1 Karfordeling per diett

Det ble gjennomført uttak av fôret fisk 13. juni av Nofima og NMBU i to separate uttakslinjer, og påfølgende uttak av fisk som hadde fastet 24 og 48 timer 14. og 15. juni 2023. Tirsdag 13. juni var det tilstede 2 personer fra Nofima, Katrine Bakkemo (Skretting AS) og 4 personer fra NMBU som jobbet i to separate uttakslinjer den dagen:

- Tirsdag: Resterende fôr fra fôrautomatene ble fjernet før uttaket startet for de respektive karene, for å faste fisk over de neste to dagene. Tidspunkt for oppstart av uttaket ble notert for hvert kar. 15 fôrede fisk per kar ble tatt ut. Maksimalt 3-5 fisk ble tatt ut til hver av de to uttakslinjene om gangen for å hindre at fisken ble liggende for lenge i bedøvelsen:
 - o Nofima (9 fisk per kar): Vekt og lengde registrert, samt vekter av lever, mage-/tarminnhold, kjønn og slaktevekt. Nofima tok samleprøve per kar av innholdet fra ulike segmenter av mage-/tarmsystemet, lever og muskel.
 - o NMBU (6 fisk per kar): Vekt og lengde registrert, samt vekter av lever, mage-/tarmsystem, kjønn og slaktevekt. NMBU tok individprøver av tarminnhold og vev til kjemiske analyser, enzymaktivitet, histologi og genuttrykk.
- Onsdag og torsdag: Nofima tok ut 10 fisk per kar 24 timer og resterende fisk 48 timer etter forrige uttak for de respektive karene. Hovedfokus var på mengde resterende mage-tarminnhold og samleprøver fra ulike segment til analyser. Vekt av lever og slaktevekt, samt volum av galle fra galleblæren etter 48 timer ble også registrert.

Fokuset for forsøket var å studere hvordan fôrene påvirker fiskens fordøyelse, mage-/tarmsfunksjoner og tarmhelse i følgende arbeidspakker:

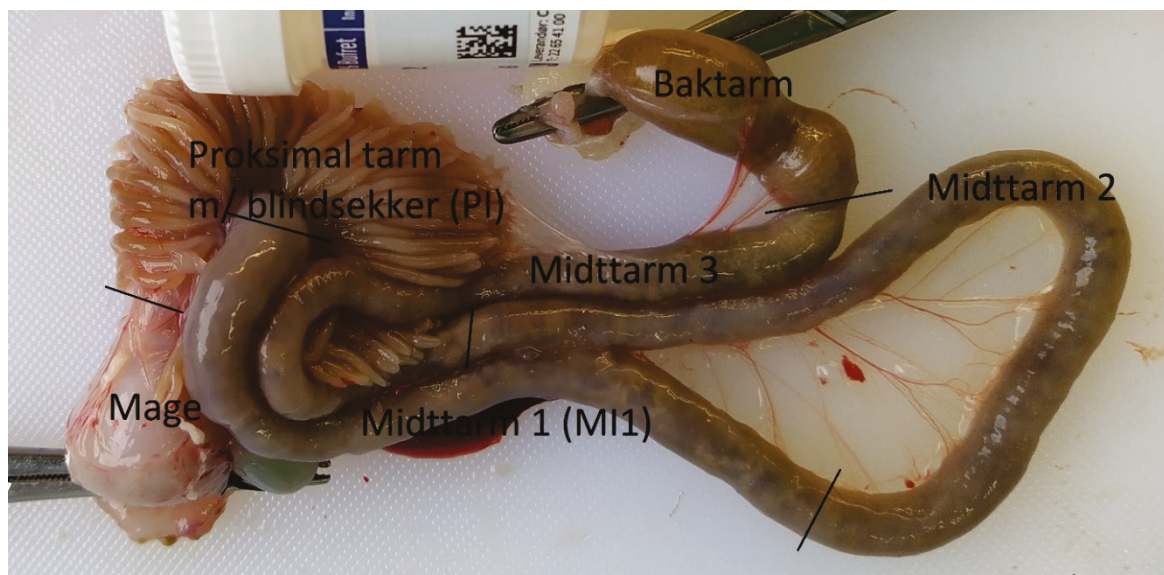
Arbeidspakke 1 (Nofima) Fordøyelse og mage-/tarmpassasje:

Fôrene ble tilsatt yttrium(III)oxide som en inert markør for å kunne beregne fordøyelse av tørrstoff, fett, protein og energi utfra gjenværende innhold av næringsstoffer i gjødsel fra fiskens baktarm. Fôrene ble analysert for tekniske parametere som bulk tetthet, hardhet og stabilitet i vann, samt bestemmelse av gjødselens viskositet for å studere fôrets påvirkning på tarmsfunksjoner. I tillegg ble mage-/tarmtømming studert ved å bestemme gjenværende tørrstoff i ulike mage-/tarmsegmenter 24 og 48 timer etter et måltid.

Arbeidspakke 2 (NMBU) Tarmfunksjoner og tarmhelse:

Vekt og lengde ble målt og blodprøve tatt fra kaudalvenen i blodprøverør med heparin. Bukhulen ble deretter forsiktig åpnet og makroskopiske bilder tatt av tarmenes plassering og tilstand i bukhalen. Tilstanden ble vurdert som normal eller med tarmproblematikk, hvor tarmregionen(e) berørt ble notert. Kun fisk med innhold i tarmen ble prøvetatt. Etter makroskopisk inspeksjon ble lever tatt ut og veid. Deretter ble hele fordøyelsesapparatet dissekert ut, tarmens lengde ble målt (posterior til blindsekkene), og delt i magesekk (ST), pylorusregion med blindsekker (PI), midttarm delt i tre like store deler (MI1, MI2 og MI3) og baktarm/kammer (DI). Se representativ Figur 2. Hver region ble åpnet på langs, tarminnhold samlet for gallsaltanalyse (flytende nitrogen), og hver region ble deretter veid for organindekser. Prøver ble tatt fra både lever og de beskrevne tarmregioner til histologi (formalin), genekspresjon (RNA later) og enzymanalyse (flytende nitrogen). Sløydvekten av fisken ble til slutt registrert.

Den histologiske evalueringen ble fokusert på midttarm (MI1, MI2, MI3) basert på tidligere makroskopiske funn av feileie av tarm hos torsk. Både langsgående og tverrgående snitt av MI-segmentene ble preparert og var tilgjengelige for evaluering. MI-vevet ble vurdert for strukturavvik i tarmepitel og villi, endringer i bredde og cellulær sammensetning av lamina propria og submucosa, samt endringer i morfologien til tarmkryptene. På grunn av fokuset på forekomst av strangulerende obstruksjon (tidligere kalt tarmslyng), ble det spesielt lagt vekt på patologiske endringer som kan føre til konsekvenser som overbelastning og vevsnekrose (dødt vev) på grunn av redusert blodtilførsel. Grad av endringer i tarmmorfologi ble gradert etter et skåringssystem med en skala fra 0-4 hvor 0 er normal; 1 er milde endringer; 2 er moderate endringer; 3 er markerte endringer og 4 er alvorlige endringer. Den histologiske vurderingen ble utført blindt, og diettgruppene ble tilordnet fiske-ID-er etter at vurderingen var fullført.



Figur 2 Standardisert seksjonering av mage-tarmkanal. Sorte linjer viser overganger mellom ulike tarmavsnitt

5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Diettsammensetning og pelletkvalitet

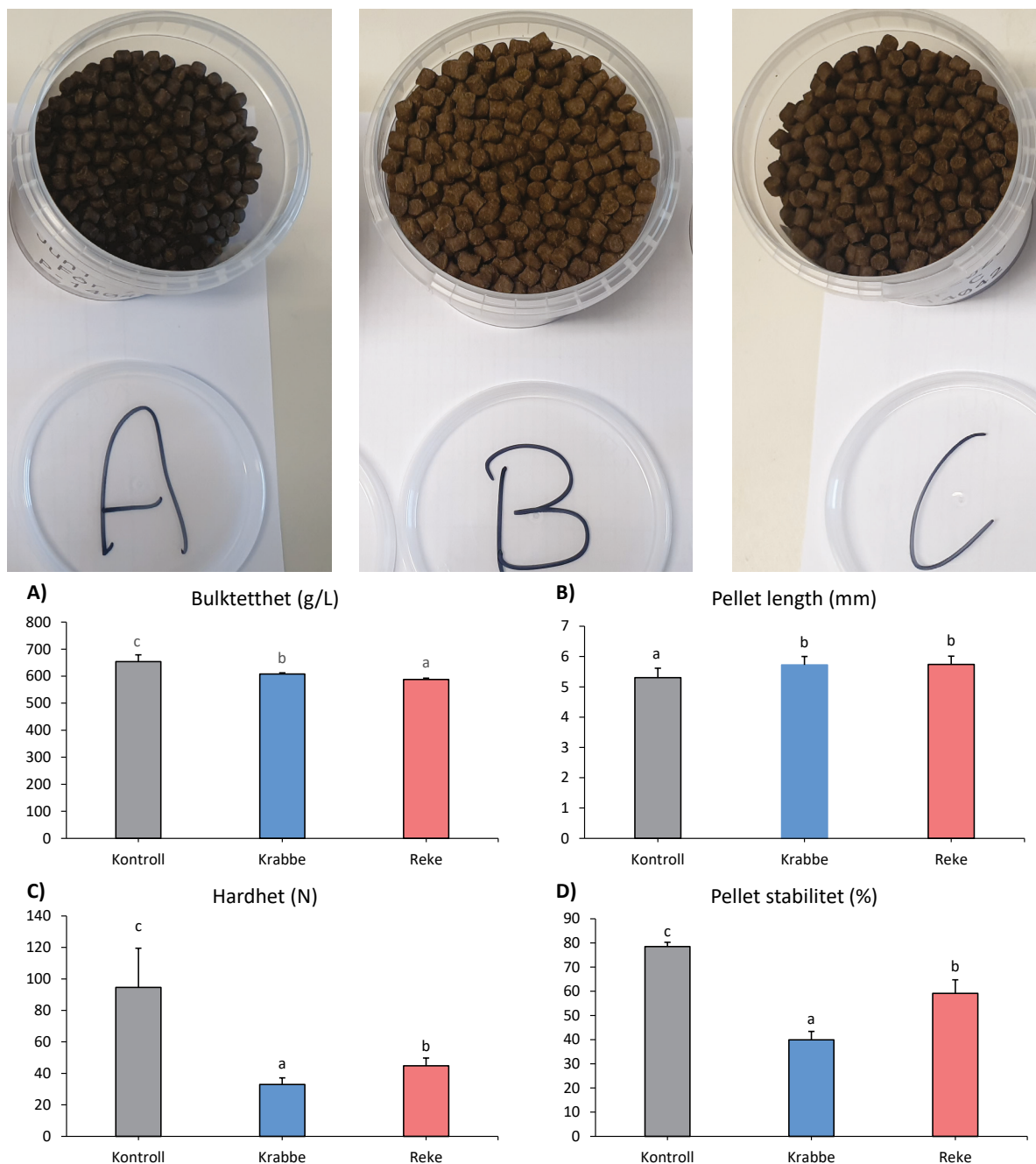
Fôrene hadde et proteininnhold på 50-51 %, 18-19 % fett og 20-21 kJ/g energi. Innholdet av aske og mineraler økte fra 6 % i kontrollfôret til 15 % aske i fôr med krabbeskallmel og 9 % aske i fôr med rekeskallmel. Det økte askeinnholdet var for det meste bidrag fra ingrediensene med økt innhold av hovedsakelig kalsium, og noe høyere innhold av magnesium og natrium i dietten med krabbe. Utbytte av solsikkemel i kontroldietten mot skallmelene førte til lavere innhold av spormineralene mangan, jern, sink og kobber i testdiettene sammenlignet med kontroll. Aminosyreprofilen var balansert i alle diettene (Tabell 2).

Tabell 2 Kjemiske analyser av forsøksfôrene

Hovednæringsstoffer	Diett A (Kontroll)	Diett B (Krabbe)	Diett C (Reke)
Tørrstoff (%)	91	92	91
Råprotein (%)	51	50	51
Total fett (%)	18	18	19
Aske (%)	6	15	9
Brutto energi (kJ/g)	21	20	21
Mineraler (mg/kg)			
Fosfor	11000	11000	14000
Kalium	9200	7100	8100
Kalsium	8000	45000	21000
Magnesium	2600	3300	2600
Natrium	6300	8200	6800
Mangan	44	33	36
Jern	190	130	160
Sink	160	140	150
Kobber	16	11	14
Jod	2	2	5
Selen	1	1	2
Essensielle aminosyrer (%)			
His	1.1	1.1	1.1
Ile	2.0	1.9	2.0
Leu	3.4	3.3	3.3
Lys	2.8	2.8	2.9
Met	1.1	1.2	1.2
Phe	2.1	2.0	2.0
Thr	1.8	1.8	1.9
Val	2.3	2.3	2.4
Arg	3.0	2.8	2.9
Ikke-essensielle aminosyrer (%)			
Ala	2.5	2.4	2.5
Asp	3.7	3.4	3.7
Glu	9.4	9.1	8.6
Gly	2.5	2.4	2.5

Hovednæringsstoffer	Diett A (Kontroll)	Diett B (Krabbe)	Diett C (Reke)
Hyp	0.3	0.3	0.2
Pro	3.1	3.1	2.9
Ser	2.1	2.1	2.1
Tyr	1.4	1.4	1.4
Sum AA (g/100g diett)	45	43	44
Sum AA (g/100g protein)	87	87	86

Kontrollfôret viste signifikant høyere bulkthet sammenlignet med krabbe-fôret, som også hadde signifikant høyere bulkthet sammenlignet med reke-fôret (Figur 3A). Noe av dette tilskrives signifikant kortere pellet hos kontroll sammenlignet med testfôr (Figur 3B), men antagelig også høyere ekspansjon ut av ekstruder av pellet med testingrediensene som førte til poredannelse særlig i fôr med reke som viste lavest bulkthet og flyt av noen pellet i vannoverflaten ved utfôring. Dette er nok noe av årsaken til lavere hardhet og fôrstabilitet etter 2 timer i vann for disse fôrene (Figur 3C og D). Når en nå er klar over dette kan en gjøre tiltak i fôrformuleringen og under fôrproduksjonen for å optimalisere fôrets fysiske kvalitet. En bør også se på hvordan tilsetning av skallmel påvirker sammensetningen av mineraler i fôrene, særlig spormineraler og andre mineraler som kan påvirke fiskens helse og spisekvalitet.



Figur 3 Bilder av førsøksfødene, og kvalitetsanalyser av fôrpellet. Statistikk ved ANOVA, etterfulgt av Tukey post hoc test. Forskjell i bokstavene over stolpene i figuren viser signifikante forskjeller mellom diettgruppene ($P < 0,05$).

5.2 Fiskens prestasjon i forsøket

Det døde totalt 7 fisk under forsøket, med ingen signifikante forskjeller i antall døde mellom diettgruppene (Tabell 3). Noen av fiskene funnet døde hadde oppblåst og væskefylt buk, men det er ingen grunn til å konkludere at fisken døde grunnet tarmrelaterte utfordringer (Figur 4).

Tabell 3 Rådata per kar i forsøket

Rom	Kar nr.	Diett	Antall start	Startvekt	Antall slutt	Sluttvekt (g)	Døde	Fôrinntak (g)
E103	1	A	36	334.4	36	362.5	0	1132
E103	2	B	32	354.1	32	400.8	0	1146
E103	3	C	34	379.0	33	422.8	1	1369
E103	4	A	34	340.0	31	411.0	3	1286
E103	5	B	34	332.4	32	386.5	2	1265
E103	6	C	33	338.3	33	356.4	0	1074
E104	1	C	34	331.1	33	372.9	1	1415
E104	2	B	33	359.0	33	396.2	0	1219
E104	3	A	29	317.8	29	345.0	0	904

Startvekt fra gjennomsnitt av bulkveid fisk, og sluttvekt fra gjennomsnitt av individveid fisk.

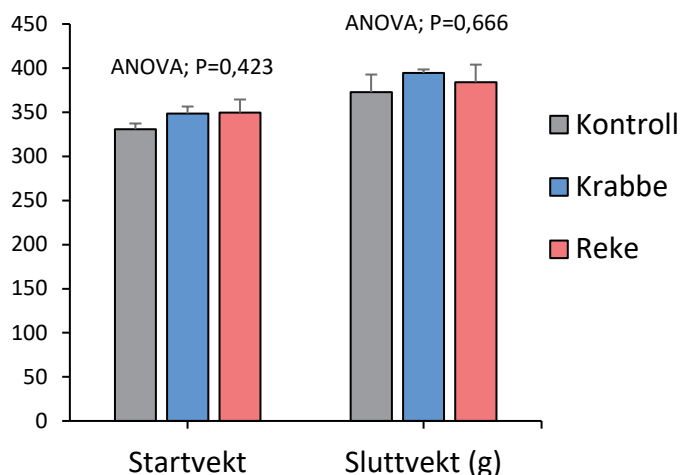


Figur 4 Bilder av dødfisk

Fisken i karene hadde en startvekt på ca. 340 g og sluttvekt på 380 g ved avslutning av forsøket. Ingen signifikante forskjeller i sluttvekt var registrert mellom kar tildelt de ulike fôrene (Figur 5A). Tilsvarende var vekstraten for hele populasjonen i karene ikke signifikant forskjellig mellom fôrgruppene, med en daglig vekstrate på 0,3-0,4 % grunnet den lave temperaturen i forsøket fra 4,7 °C ved oppstart til 6,4 °C ved avslutning av forsøket (Figur 5B).

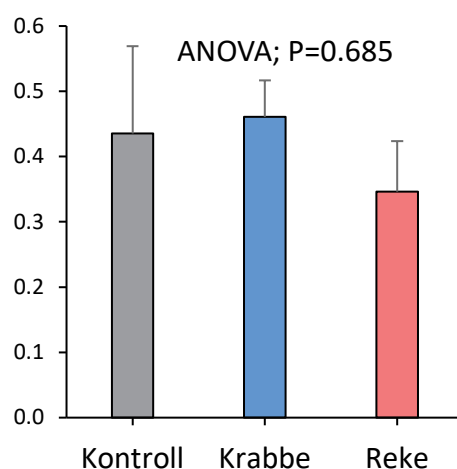
A)

Kroppsvekt (g)



B)

Daglig vekstrate (SGR)

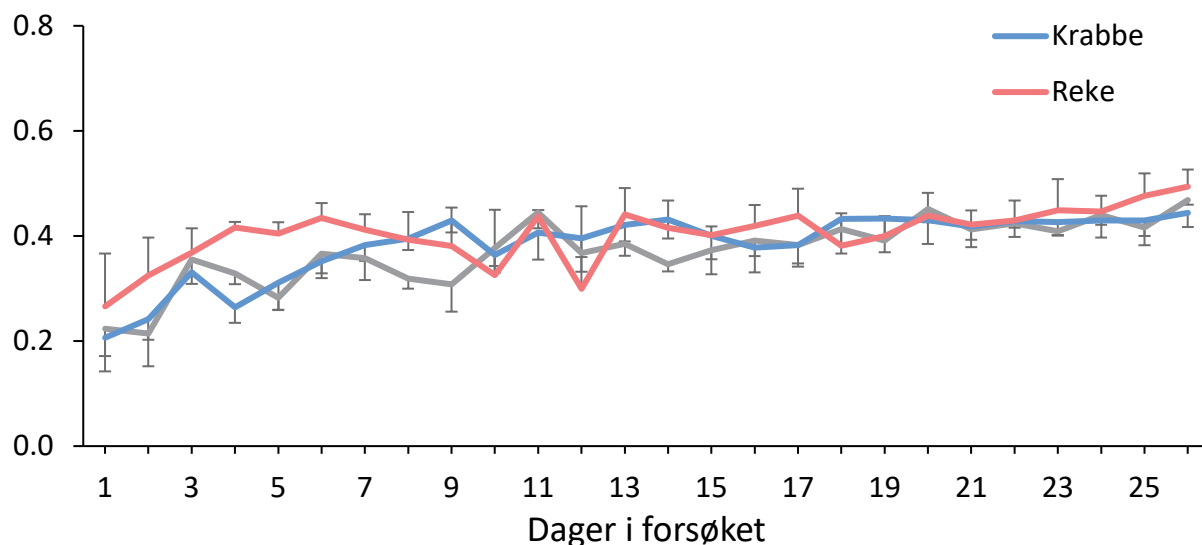


Figur 5 Vektregistreringer og vekst. A) Gjennomsnitt kroppsvekt (g) og B) daglig vekstrate (SGR) for hele populasjonen per kar. Gjennomsnitt±standardfeil; $n=3$ kar. Statistikk ved en-veis ANOVA for effekter av fôr. Ingen signifikante forskjeller vist ved $P>0,05$.

Fôrinntaket under forsøket ble beregnet basert på differansen i tørrstoff mellom utfôret mengde og oppsamlet uspist mengder (spillfôr) fra hvert kar. Daglig fôrinntak viste tendenser til perioder med høyere fôrinntak i gruppen tildelt rekeskallmel sammenlignet med kontroll og fôrgruppen gitt krabbeskallmel, særlig de først 10 dagene av forsøket (Figur 6A). Stor variasjon mellom karene og variasjon gjennom forsøksperioden resulterte i ingen signifikante forskjeller i totalt fôrinntak mellom fôrgruppene (ANOVA; $P>0,05$) (Figur 6B). Tendensen til lavest vekt og høyest fôrinntak i fôrgruppen tildelt reke resulterte i høyest fôrfaktor i denne gruppen (1,48) og lavest i fôrgruppen tildelt krabbe (0,98), men ingen signifikante forskjeller mellom de to fôrgruppene var observert (ANOVA; $P=0,057$) (Figur 6C).

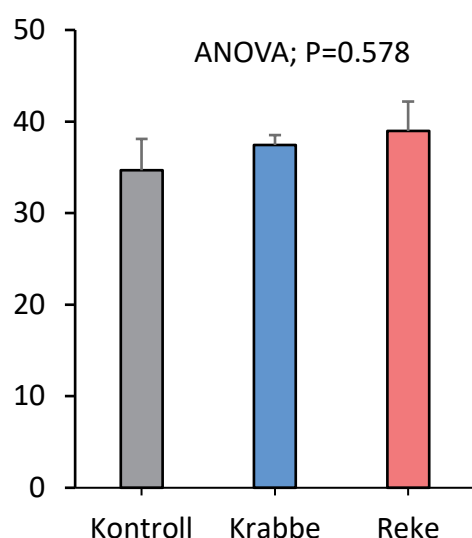
A)

Fôrinntak (vekt% av biomassen)



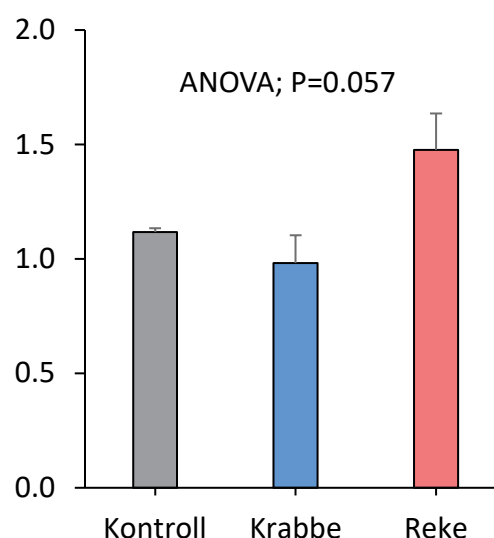
B)

Fôrinntak/fisk (g)



C)

Fôrfaktor

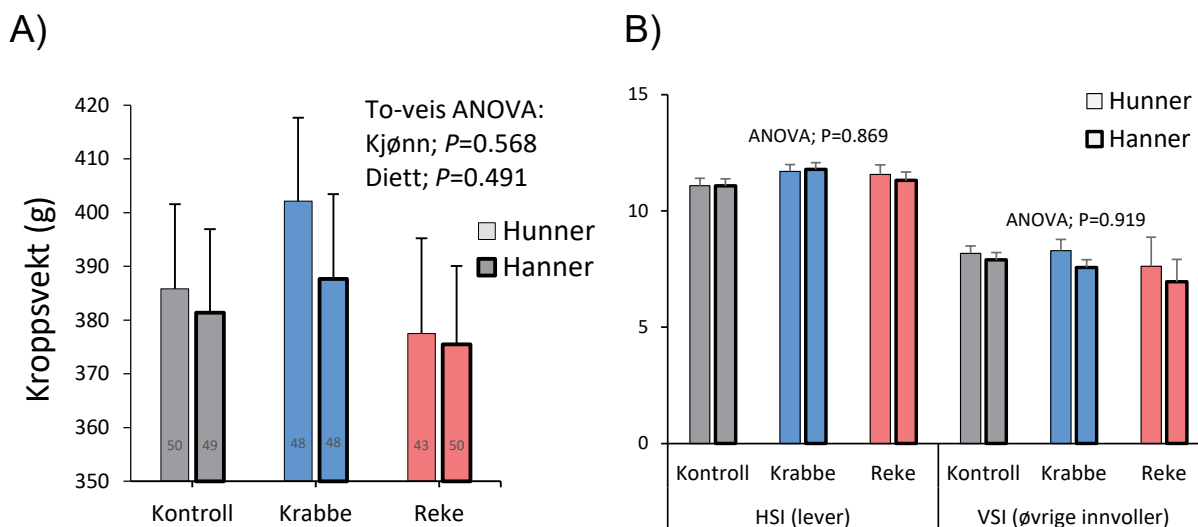


Figur 6 Daglig fôrinntak (A), Totalt fôrinntak per fisk i forsøksperioden (B) og beregnet fôrfaktor (C). Gjennomsnitt±standardfeil; n=3 kar. Statistikk ved en-veis ANOVA for effekter av diett på vekstraten. Ingen signifikante forskjeller vist ved $P>0,05$.

5.3 Individbaserte vektregistreringer ved sluttuttaket

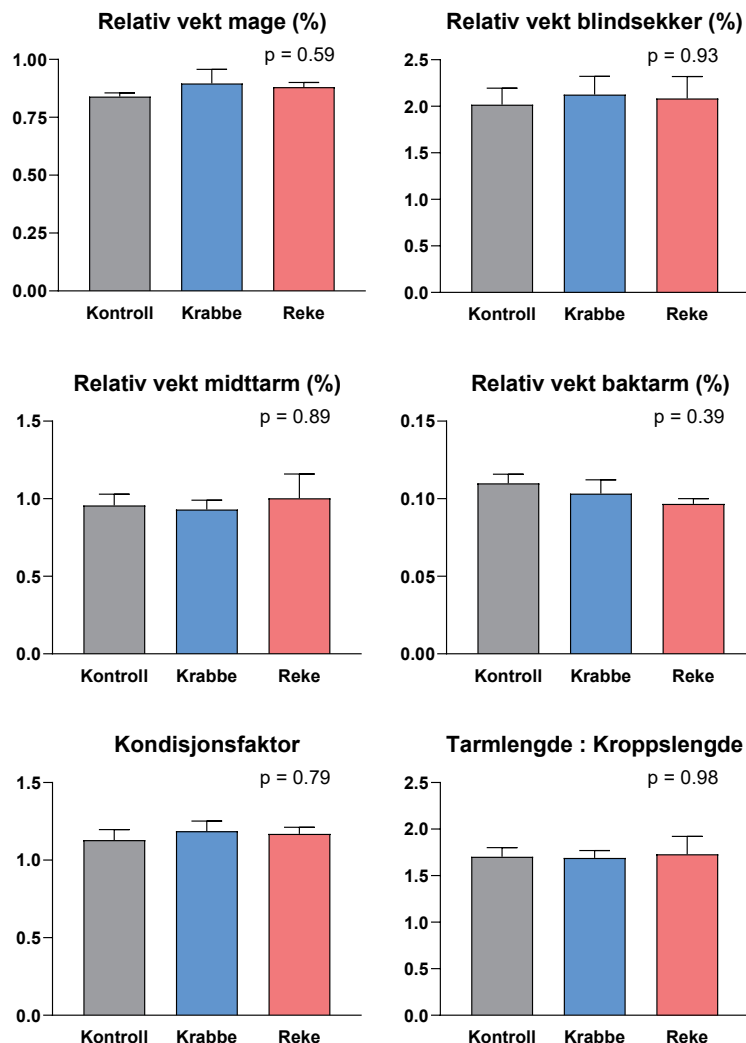
All fisk ble veid ved avslutning av forsøket, med til sammen ca. 100 individ per fôrgruppe og tilnærmet lik fordeling mellom kjønnene. Det var ingen signifikante forskjeller i kroppsvekt mellom kjønn eller gruppene tildelt ulike fôr (Figur 7A). Hunner fôret med krabbeskallmel viste høyest gjennomsnittsvekt, men ikke signifikant forskjellig fra de andre gruppene (ANOVA; $P>0,05$). Det ble tatt prøver av individ

med stor variasjon i kroppsvekt fra den minste på 145 g til den største på 698 g. Lever- og innvollsindekser viste ingen forskjeller mellom kjønn eller fôrgrupper (Figur 7B).

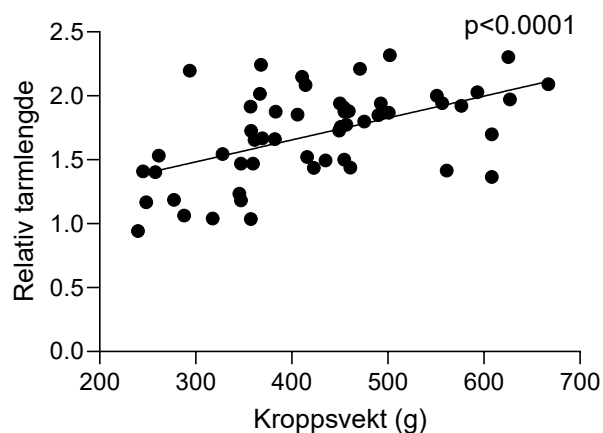


Figur 7 Vektregistreringer hos torsk tildelt 3 ulike forsøksfôr. A) Gjennomsnittlig kroppsvekt (g) hos hunner og hanner innenfor de ulike diettgruppene ved avslutning av forsøket (antall fisk registrert vist i bunnen av hver stolpe i figuren). B) leverindeks (HSI) og innvollsindeks (VSI). Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil. Statistikk ved to-veis ANOVA for effekter av kjønn og diett på kroppsvekt og en-veis ANOVA for effekter av diett på vekstraten. Ingen signifikante forskjeller vist ved $P>0,05$.

Relativ vekt (organindeks) av de ulike mage/tarmsegmentene, kondisjonsfaktor, og relativ tarmlengde er presentert i Figur 8. Det var igjen signifikante effekter av diett på disse måleparameterene. Det var heller ingen signifikante effekter av kjønn (data ikke vist). Figur 9 viser forholdet mellom kroppsvekt og relativ tarmlengde. Uavhengig av diett ble det observert en klar og statistisk signifikant sammenheng mellom fiskens størrelse (vekt) og lengde på tarmen sett i forhold til fiskens lengde. Større fisk hadde relativt lengre tarm, sett i forhold til fiskelengde.



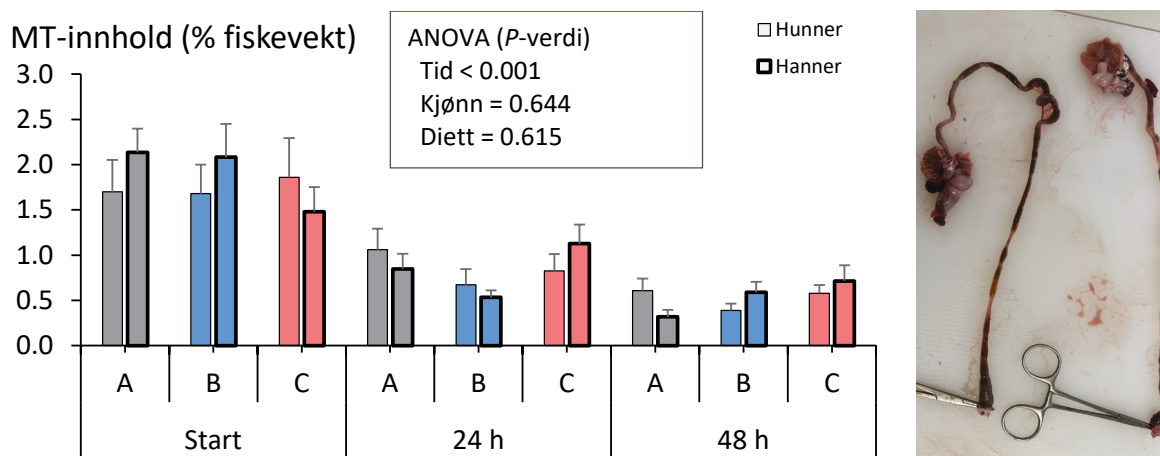
Figur 8 Relativ vekt av magesekk, blindsekker, midttarm (MI1-3, se Figur 2 for inndeling) og baktarm, samt kondisjonsfaktor og tarmlengde (målt fra siste blindsekk til anus) relativt uttrykt til kroppslengde hos torsk tildelt 3 ulike forsøksfôr. Data er gitt som gjennomsnitt $\pm$ standardfeil. P-verdier for en-veis ANOVA er vist.



Figur 9 Relativ tarmlengde (tarmlengde:fiskelengde) plottet i forhold til kroppsvekt ved forsøkslutt. $n=54$ individuelle fisker er illustrert som svarte punkter. P-verdi for lineær regresjonsanalyse er vist.

5.4 Mage-/tarminnhold i fôret fisk og etter faste i 24 og 48 timer

Total mage-/tarminnhold som prosent av kroppsvekt ble redusert ved faste, fra 1,8 % i fôret fisk, 0,8 % etter 24 timer til 0,5 % av kroppsvekten etter 48 timer faste (ANOVA; $P < 0,05$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom kjønn eller fôrgrupper i totalt innhold av mage-/tarminnhold av kroppsvekten (Figur 10).

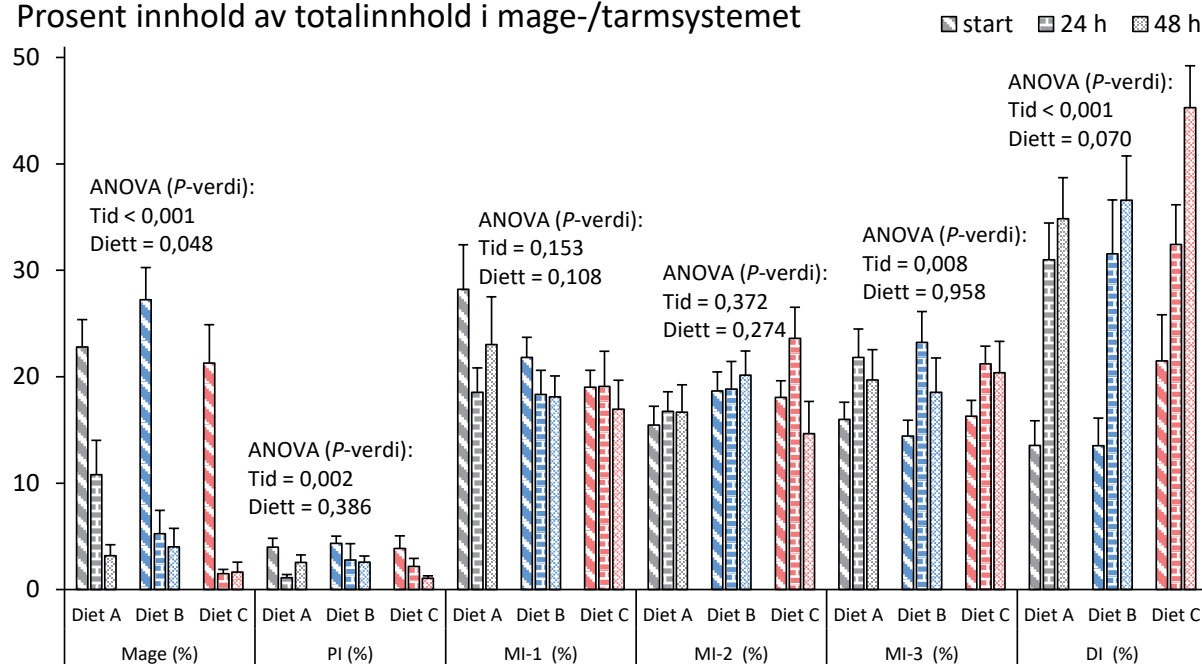


Figur 10 Totalt innhold fra mage-/tarmsystemet (MT) oppgitt i prosent av fiskevekt. Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil; $N=9-19$ individ per stolpe i figuren. Statistikk ved to-veis ANOVA for effekter av tid, kjønn og diett. Signifikante forskjeller mellom faktorer vist ved $P < 0,05$.

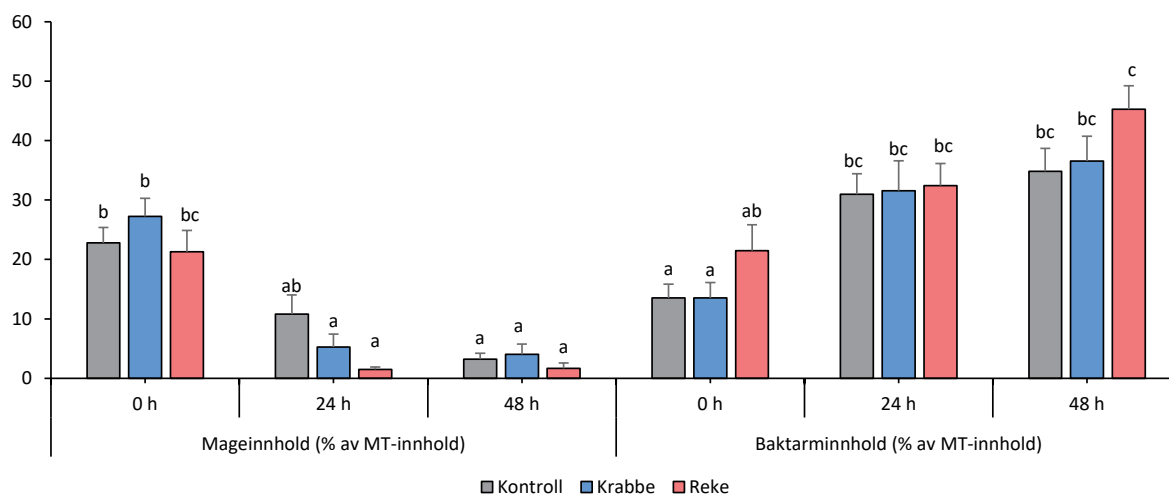
For de enkelte segmentene i mage-/tarmsystemet ble det observert forskjeller i segmentinnhold relatert til totalt innhold i mage-/tarmsystemet over tid og mellom fôrgrupper. I mage og fortarm (proximal intestine; PI) ble det observert signifikant reduksjon i innhold etter 48 timer faste, mens det i midttarmdel 3 (MI-3) og baktarm (DI) var en signifikant økning i innhold etter 48 timer faste (ANOVA effekt tid; $P < 0,05$). Forskjeller i mengde innhold mellom fôrgruppene ble kun observert i magen til fisken, med signifikant mer mageinnhold i fisk tildelt kontrollfôr og fôr med krabbemel sammenlignet med fôr med rekemel (ANOVA effekt diett; $P < 0,05$) (Figur 11A). Videre statistiske analyser med post hoc test viste ingen signifikante forskjeller mellom fôrgrupper hos fôret eller torsk fastet i 24 og 48 timer. Størst numerisk forskjell mellom fôrgruppene ble observert 24 timer etter fasting med mindre mageinnhold i torsk tildelt rekemel (1,5 %) < krabbemel (5,3 %) < kontroll (10,8 %) (Figur 11B).

A)

Prosent innhold av totalinnhold i mage-/tarmsystemet



B)

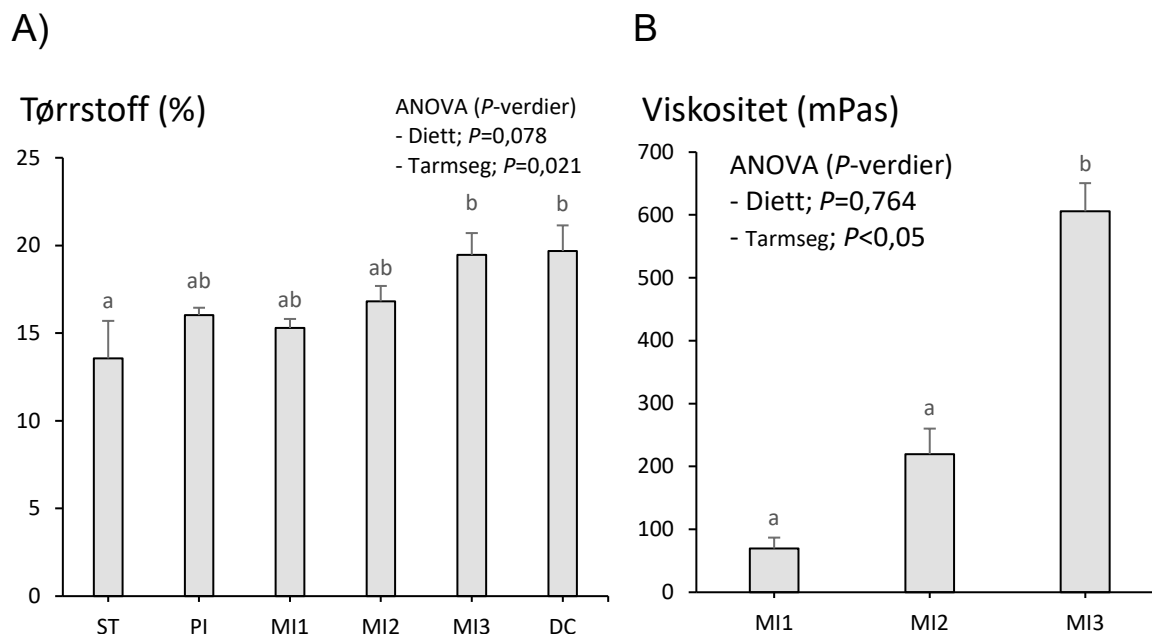


Figur 11 Mage-/tarminnhold i ulike segmenter gjennom fordøyelsessystemet til torsk tildelt forsøksdiettene etter fôring, og etter faste i 24 og 48 timer. Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil; $N=9-19$ individ per stolpe i figuren. A) Innhold i hele mage-/tarmsystemet. Statistikk ved to-veis ANOVA for effekter av tid og diett på kroppsvekt. Signifikante forskjeller vist ved $P<0,05$. B) Innhold i mage og baktarm. Statistikk ved Tukey post hoc test. Forskjell i bokstavene over stolpene i figuren viser signifikante forskjeller mellom diettgruppene ($P<0,05$).

5.5 Mage-tarmfunksjoner

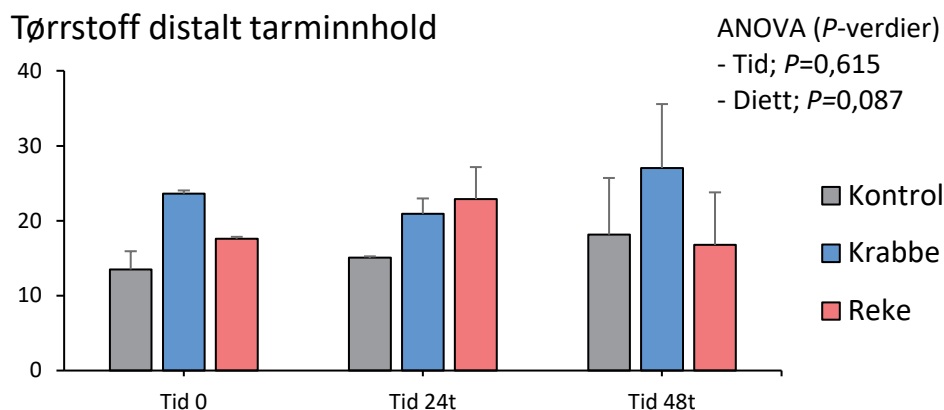
Gjennomsnittlig tørrstoffinnhold var noe lavere i mage (13 %), og økte noe bakover i tarmen (15-20 %). Tørrstoff var dermed signifikant lavere i mage sammenlignet med baktarm, men ellers var det ingen signifikante forskjeller mellom segment eller fôrgrupper grunnet stor individvariasjon (Figur 12A). Det

var bla. observert individer med svært væskefylt innhold med kun 0,4 % tørrstoff i mage, 4 % tørrstoff i fortarm og 10-15 % tørrstoff ellers bakover i tarmen. Det ble generelt observert økt tørrstoff og viskositet av innhold gjennom midttarm-segmentene 1 til 3, med tørrstoff fra 15 til 19 % og med en signifikant økning i viskositet fra 69 mPAS i MI-1 til 606 mPAS i MI-3 (Figur 12B). Det var ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene i tørrstoffinnhold eller viskositet for de ulike tarmsegmentene, og figurene viser dermed gjennomsnitt per segment uavhengig av diett.



Figur 12 Tørrstoffprosent av innhold gjennom mage-/tarmsystemet (A) og viskositet i midttarmsegmenter. Mage (ST), fortarm (PI), midttarmsegment (MI) og baktarm (DC). Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil; *N*= 7-10. Statistikk ved to-veis ANOVA for forskjeller mellom segment og diett, etterfulgt av Tukey post hoc test ved signifikante forskjeller (*P*<0,05). Forskjell i bokstavene over stolpene i figuren viser signifikante forskjeller mellom tarmsegmenter.

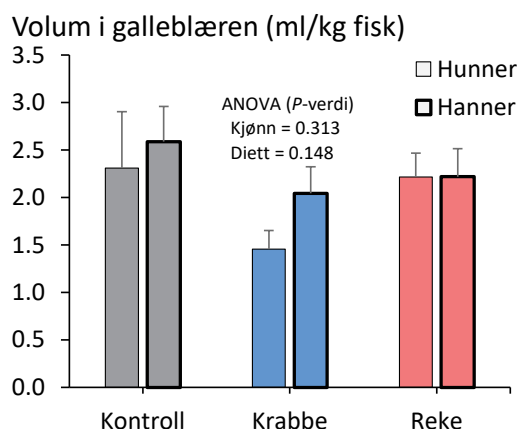
Det var et særlig fokus på prøvene fra baktarm da disse benyttes til å beregne fordøyelse av næringsstoffer, samt kan indikere hvordan gjødselen fra fisken spres etter utslipp i vann og mulighet for å samle den i filtersystemer. Det ble ikke observert signifikante forskjeller i tørrstoff av dette innholdet i fôret eller fastet fisk, eller mellom fôrgruppene (Figur 13). Det er en liten indikasjon på at krabbemel kan gi noe høyere tørrstoff (ikke signifikant).



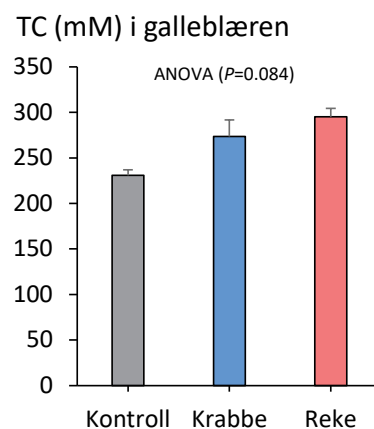
Figur 13 Tørrstoffinnhold (%) i baktarm hos torsk føret ulike forsøksfôr, og etter faste i 24 og 48 timer. Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil; $N=7-10$. Statistikk ved to-veis ANOVA for effekter av tid og diett. Ingen signifikante forskjeller observert ($P>0,05$).

Volum av galle i galleblæren til torsk fastet i 48 timer ble målt ved å tømme galleblæren med en sprøyte. Det var ingen signifikante forskjeller i gallevolum mellom kjønn eller fôrgruppene, med et volum på 1,5-2,5 ml/kg fisk (Figur 14A). Gallesaltene i gallen ble analysert med standardene taurocholate (TC) og taurochenodeoxycholate (TCDC), men kun TC var til stede av disse standardene hos torsk i motsetning til laks som har begge. Det var ingen signifikante forskjeller i konsentrasjon av TC mellom de ulike fôrgruppene med en konsentrasjon på 235-295 mM i galle hos torsk (Figur 14B).

A)

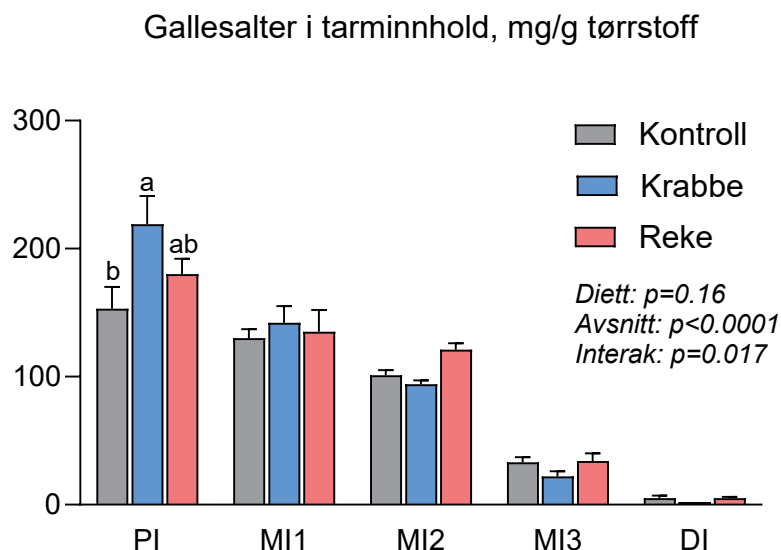


B)



Figur 14 Uttak av galle fra galleblæren til torsk etter 48 timer faste; A) gallevolum (ml/kg fisk) per individ ($N=10-18$ per stolpe i figur) og B) analysert konsentrasjon av taurocholate (mM) i galle. Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil. Statistikk ved to-veis ANOVA for effekter av kjønn og diett for galle volum, og en-veis ANOVA effekt av diett for konsentrasjon av taurocholate. Ingen signifikante forskjeller observert ($P>0,05$).

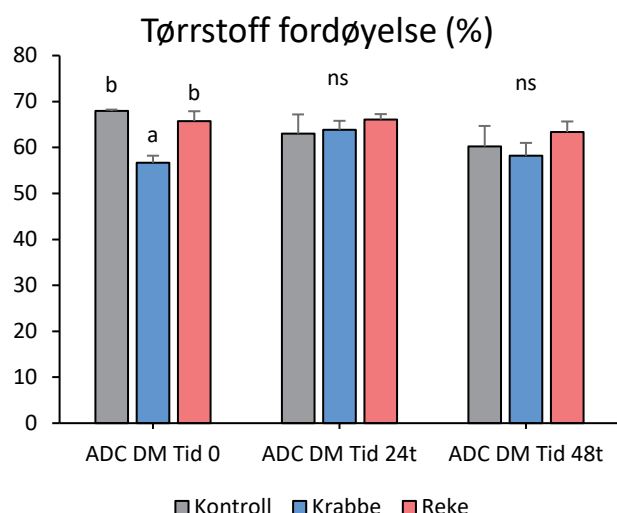
Gallesaltnivå i tarminnhold er presentert i Figur 15. Det ble målt svært høyt innhold av gallsalter i tarminnholdet i proksimalt tarmavsnitt med blindsekker (PI), 15-20 % av tørrstoffet. Gallsaltnivåene var videre redusert gradvis gjennom midtarmen (MI1-3), og kun svært lave nivåer ble registrert i baktarm (DI). Dette tyder på en effektiv reabsorpsjon av galle over tarmepitelet langs hele tarmkanalen, som kjent fra laksefisk (Kortner m.fl., 2013). Det var ingen klare effekter av diett på gallsaltnivå i tarminnhold, men fisk fôret på krabbeskallmel hadde de høyeste gallsaltnivåene i PI, signifikant høyere enn kontrollfôret fisk.



Figur 15 Gallsaltnivå i tarminnhold fra blindsekker (PI), midttarm (MI1-3) og baktarm (DI) hos torsk tildelt 3 ulike forsøksfôr. Data er gitt som gjennomsnitt av samleprøver pr kar $\pm$ standardfeil. P-verdier for to-veis ANOVA er vist.

5.6 Fordøyelse

Gjenværende tørrstoff i baktarmen og konsentrasjonsforskjeller i fordøyelse-markøren yttrium(III)oxide mellom fôr og baktarmsinnhold ble brukt til å beregne fordøyelse av tørrstoff. Hos fôret torsk var det en signifikant lavere fordøyelse av tørrstoff i gruppen tildelt fôr med krabbeskallmel sammenlignet med kontroll og fôr med rekeskallmel. I torsk fastet i 24 og 48 timer var det ingen signifikant forskjell i fordøyelse av tørrstoff (Figur 16). Mye av tørrstoffet i baktarmen til torsken fôret skallmel, særlig krabbe, var mineraler med antatt lav fordøyelse. I all hovedsak kalsium som utgjorde 13 % av baktarmsinnholdet hos torsk fôret med krabbe, 7 % hos torsk fôret reke og 3 % av baktarmsinnholdet til kontrollgruppen. Solsikkemel bidro med tilsynelatende mer jern og kobber som var gjenspeilt i signifikant høyere baktarminnhold av disse mineralene i kontrollgruppen sammenlignet med de andre diettgruppene (Tabell 4). Lavere tørrstoff fordøyelse vil nødvendigvis ikke påvirke appetitt eller vekst så lenge det ikke har innvirkning på tilgjengelighet av protein og fett som ellers var balansert likt i forsøksfôrene.



Figur 16 Tørrstoff-fordøyelse hos torsk tildelt et kontrollfôr og tilsetninger av skallmel fra krabbe og reke. Gjennomsnitt $\pm$ standardfeil. N=3 kar. Statistikk ved to-veis ANOVA for effekter av tid ($P=0,040$) og diett ($P=0,221$), etterfulgt av Tukey post hoc test per tidsuttak. Forskjell i bokstavene over stolpene i figuren viser signifikante forskjeller mellom diettgruppene ($P<0,05$), ns = ikke signifikant forskjellig.

Tabell 4 Mineralsammensetning i fôr og baktarmsinnhold

	Fôr-innhold			Gjødsel-innhold			P-verdi
	Kontroll	Krabbe	Reke	Kontroll	Krabbe	Reke	
Makromineraler (g/100g)							
Fosfor (P)	1.1	1.1	1.4	1.3±0.2 ^a	1.3±0.1 ^a	2.4±0.6 ^b	0.013
Kalium (K)	0.9	0.7	0.8	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.1±0.0 ^a	0.314
Natrium (Na)	0.6	0.8	0.7	1.4±0.2 ^a	0.9±0.2 ^a	1.1±0.3 ^a	0.059
Kalsium (Ca)	0.8	4.5	2.1	3.0±0.3 ^a	13.2±1.6 ^c	7.1±0.9 ^b	<0.001
Magnesium (Mg)	0.3	0.3	0.3	1.1±0.1 ^a	1.2±0.2 ^a	1.2±0.1 ^a	0.677
Spormineraler (mg/kg)							
Jern (Fe)	190.0	130.0	160.0	659.2±9.9 ^c	380.6±30.3 ^a	533.9±79.9 ^b	0.001
Mangan (Mn)	44.0	33.0	36.0	66.6±18.3 ^a	77.8±13.5 ^a	67.2±24.7 ^a	0.740
Kobber (Cu)	16.0	11.0	14.0	54.2±1.0 ^b	30.3±2.4 ^a	48.7±4.1 ^b	<0.001
Sink (Zn)	160.0	140.0	150.0	581.1±82.9 ^a	421.7±38.7 ^a	533.2±89.6 ^a	0.091

Gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, N=3 kar. Statistikk ved ANOVA for effekter av diett, etterfulgt av Tukey post hoc test. Forskjell i bokstavene viser signifikante forskjeller mellom diettgruppene ($P<0,05$).

Grunnet lite prøvemateriell fra baktarm var det ikke nok til kjemiske analyser av protein, fett og energi som en normalt analyserer i slike forsøk. Aminosyreanalysen krever lite prøvemateriell og er en god indikator for den spesifikke protein-fordøyelsen i fisken. Summen av aminosyrer (Total AA) utgjorde 86-87 g/100 g av proteinet i forsøksfôrene. Torsk tildelt fôr med krabbeskallmel viste signifikant høyere fordøyelse av det totale aminosyreinnholdet (91 %) sammenlignet med kontroll og fôr med rekeskallmel (89 %). Denne forskjellen mellom fôrgruppene var også gjenspeilet i de fleste essensielle aminosyrene, utenom i fordøyelse av leucin og threonin, som ikke var forskjellig mellom gruppene. Fordøyelse av lysin, metionin og valin var ikke signifikant forskjellig mellom gruppene tildelt skallmel, men torsk tildelt krabbeskallmel hadde signifikant høyere fordøyelse av disse aminosyrene sammenlignet med

kontrollgruppen (Tabell 5). Tilførsel av krystallinske aminosyrer vil kunne påvirke tolkningen av disse resultatene da disse vil ha lik fordøyelighet mellom fôrgruppene.

Tabell 5 Aminosyrefordøyelse hos torsk tildelt ulike forsøksfôr

Fordøyelse, %	Kontroll	Krabbe	Reke	P-verdi
Total AA	88.8±0.1 ^a	91.0±0.6 ^b	89.0±0.7 ^a	0.005
Essensielle aminosyrer				
His	85.9±0.2 ^a	88.4±0.7 ^b	85.5±1.1 ^a	0.008
Ile	88.5±0.4 ^a	91.3±0.6 ^b	89.3±0.9 ^a	0.005
Leu	89.5±0.4 ^a	92.6±0.5 ^a	90.2±0.9 ^a	0.002
Lys	90.3±0.7 ^a	92.7±0.5 ^b	91.1±0.8 ^{ab}	0.013
Met	88.8±0.6 ^a	91.9±0.6 ^b	89.7±1.4 ^{ab}	0.016
Phe	90.9±0.2 ^a	92.8±0.5 ^b	91.1±0.6 ^a	0.003
Thr	83.6±1.2 ^a	87.4±1.2 ^a	84.1±3.0 ^a	0.114
Val	86.7±1.0 ^a	90.4±0.7 ^b	87.8±1.3 ^{ab}	0.013
Arg	92.8±0.1 ^a	94.0±0.3 ^b	92.9±0.6 ^a	0.019
Ikke-essensielle aminosyrer				
Ala	89.5±0.1 ^a	91.5±0.5 ^b	89.8±0.7 ^a	0.005
Asp	78.0±0.4 ^a	80.3±1.6 ^a	77.8±1.9 ^a	0.152
Glu	94.0±0.1 ^a	95.3±0.3 ^b	93.9±0.3 ^a	0.001
Gly	84.1±0.0 ^a	85.5±1.1 ^a	84.5±0.6 ^a	0.143
Hyp	84.8±4.1 ^a	90.2±0.5 ^a	83.8±4.2 ^a	0.118
Pro	91.6±0.3 ^a	93.2±0.4 ^b	91.1±0.7 ^a	0.005
Ser	84.9±0.0 ^a	88.2±0.7 ^b	85.3±0.7 ^a	0.001
Tyr	87.6±0.3 ^a	89.3±0.7 ^a	87.5±1.5 ^a	0.114

Gjennomsnitt ± standardavvik, N=3 kar. Statistikk ved ANOVA for effekter diett, etterfulgt av Tukey post hoc test. Forskjell i bokstavene viser signifikante forskjeller mellom diettgruppene ($P < 0.05$).

5.7 Tarmhelse

Makroskopiske observasjoner: Det ble observert stor variasjon i tarmleie/tarmforløp, lengde, og krøsoopheng i prøvetatt fisk. Tarmens lengde sett i forhold til kroppslengde varierte mellom om lag 1:1, og helt opp til en tarmlengde 2,3 ganger kroppslengde (se også Figur 9). De kortere tarmene hadde som regel et relativt enkelt tarmforløp og lå godt organisert i bukhulen, mens de lengre tarmene ofte hadde et komplisert tarmforløp med mange slynger og buktninger (Figur 17). Det var som nevnt over ingen effekter av diett på tarmlengde (Figur 8). Av totalt 54 obduserte fisk ble det kun registrert ett individ med feilleie av tarm, der tarmen (tarmavsnitt M1-2) var avsnørt gjennom et hull (ruptur) i krøset (Figur 17). I krøset går blodforsyning til tarmene, venøst blod som frakter næringsstoffer fra tarmen til lever, og nerver. Det kan spekuleres i om en lang tarm i kombinasjon med utbredt krøs hvor mineraliserte avleiringer muligens lager små hull, kan bidra til at tarmen dras inn/gjennom disse hullene og dermed avsnøres av de sterkere, fibrøse bindevevsdragene i krøset.



Figur 17 Eksempler på prøvetatt fisk med kort, enkelt tarmforløp (venstre) og langt, komplisert tarmforløp med mange slynger (midtre panel). Til høyre vises ett individ med feilleie av tarm, såkalt strangulerende obstruksjon, der en fibrøs streng i krøset avsnører passasjen i tarmen.

Det ble videre observert enkelte fisk med redusert tarmsystem og grønlig tarminnhold (trolig galle), eller fokalt grønn lever (Figur 18). Muskelatrofi (muskelsvinn) i bukvegg, som regel sett i sammenheng med oppblåst buk og vandig innhold i magesekk, ble observert hos enkelte individer (Figur 19).



Figur 18 Eksempler på prøvetatt fisk med kort tarm med grønlig innhold (venstre) og fokalt grønn lever (høyre)



Figur 19 Eksempler på prøvetatt fisk med muskelatrofi i bukvegg (venstre) og oppspilt buk med vandig innhold i magesekk (høyre)

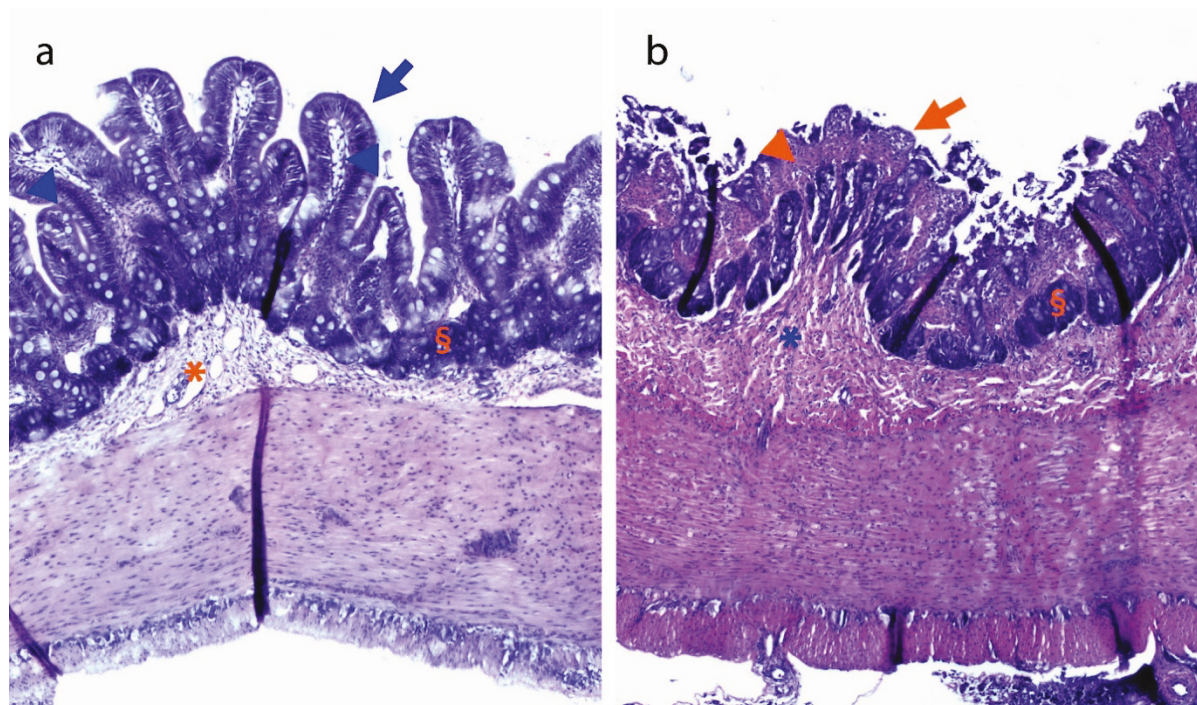
Mikroskopiske observasjoner av midttarm:

Midttarm 1 (MI1): Alle vurderte MI-1 vevsprøver utenom én ble observert med normal og frisk morfologi (Figur 20a og 21). Villiene ble observert dekket med intakt tarmepitel med en tynn, sparsomt cellulær lamina propria og submucosa, samt tilstedeværelse av tarmkrypter. Én fisk fra kontrollgruppen ble observert med markerte endringer, kjennetegnet av total tap av epitel- og villus-strukturer (Figur 20b). Lamina propria så ut til å være mer kompakt med en mild økning i celletetthet, mens kryptene så ut til å være mildt krympet i størrelse. Endringene i MI-1 ble også observert i MI-2 og MI-3 segmentene for den samme fisken.

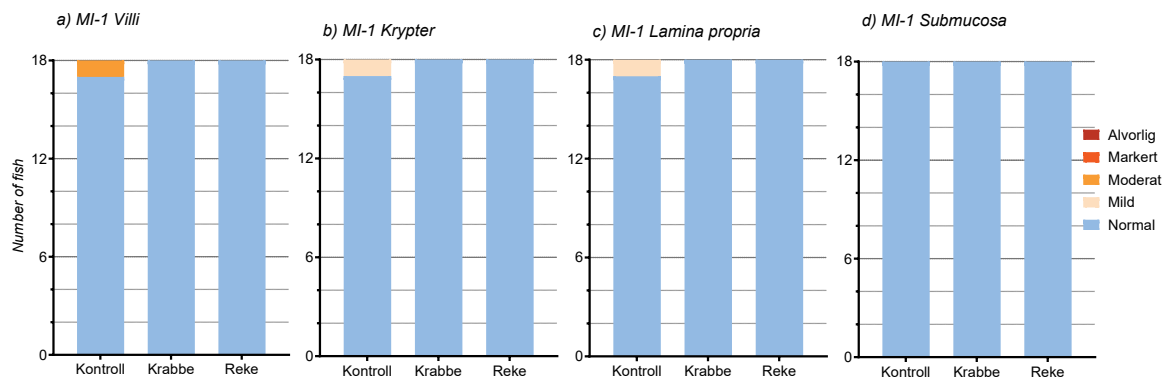
Midttarm 2 (MI2): MI-2-vevet ble også vurdert til hovedsakelig normalt og friskt. Se Figur 22 og 23. To individer ble imidlertid observert med markerte endringer som beskrevet ovenfor for MI-1. De to fiskene med patologiske endringer hadde utseende tilsvarende illustrasjon i Figur 20b, kjennetegnet ved totalt tap av tarmepitel og villusstruktur, men med minimal enteritt eller andre endringer.

Midttarm 3 (MI3): På samme måte som for MI-1 og MI-2 segmentene, ble flertallet av fiskene observert med normal og sunn morfologi i MI-3 segmentet. Se Figur 24 og 25. Unntaket var den ene fisken som ble observert med patologi i MI-1- og MI-2-segmentene, som også ble observert med patologi i MI-3-regionen.

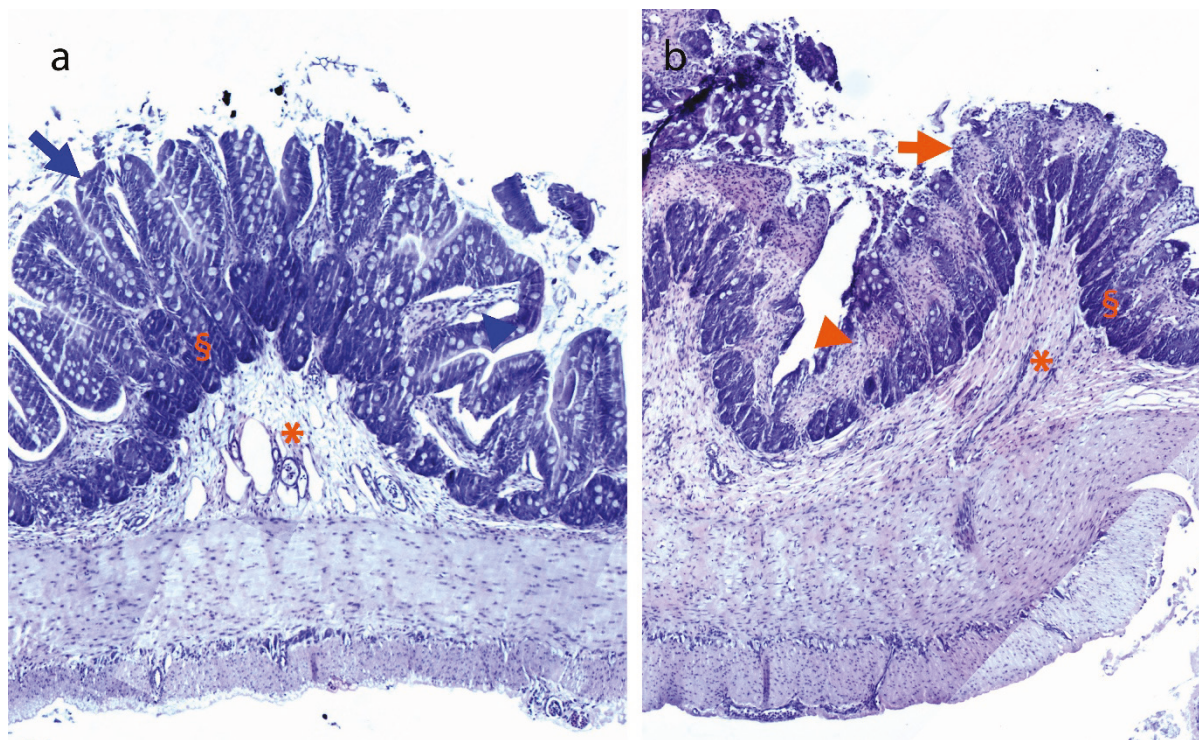
Fisk med patologiske observasjoner histologisk var ikke notert til å ha makroskopiske utfordringer med tarm.



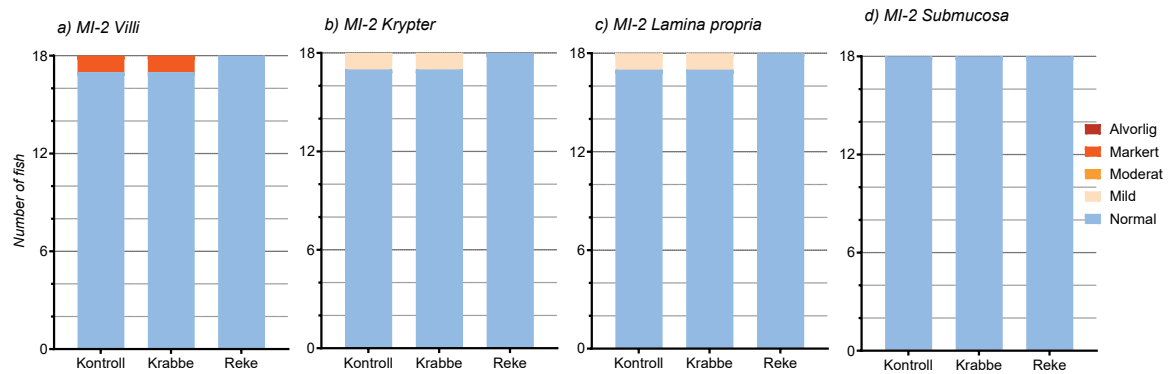
Figur 20 Representative bilder av MI-1-regionen hos de 54 evaluerte fiskene. (a) Flertallet av fiskene hadde normal og frisk morfologi, kjennetegnet av et intakt epitel som dekket villiene (blå pil), tynn lamina propria med sparsom cellulær sammensetning (blå pilspisser), og en tykkere, men sparsomt cellulær submucosa (). Kryptene er merket med §. (b) Én fisk ble observert med totalt tap av tarmepitel og fravær av villi-struktur (oransje pil), lamina propria var mildt tykkere (oransje pilspiss), og kryptene (§) så ut til å være mildt krympet. Bildene stammer fra det samme individet som er opphavet til bildene i Figur 22 og 24.*



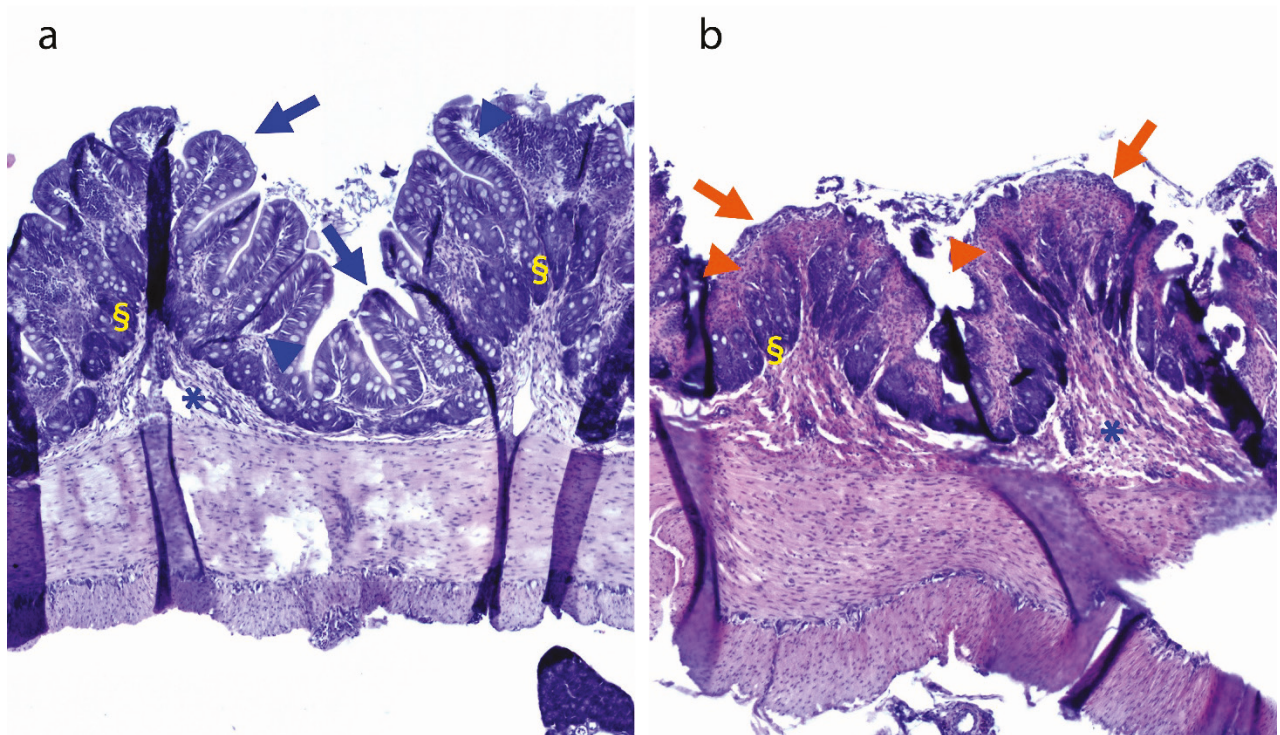
Figur 21 Antall MI-1 vevsseksjoner som ble vurdert som "normal", "mild", "moderat", "markert" eller "alvorlig" for endringer i morfologi av (a) villusstruktur og utseende av tarmepitel, (b) endringer i kryptstruktur, (c) økninger i bredde og inflammatorisk celleinfiltrering i lamina propria, og (d) submucosa.



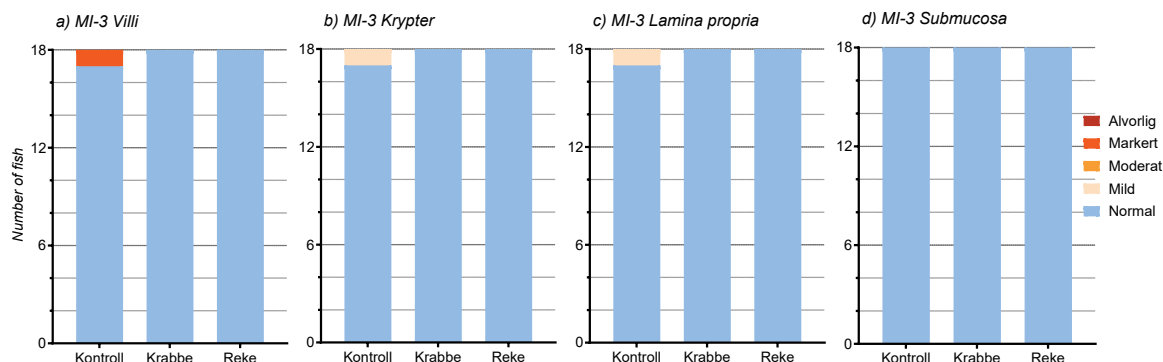
Figur 22 Representative bilder av MI-2-segmentet hos de 54 evaluerte fiskene. (a) Flertallet av fiskene hadde normal og frisk morfologi, kjennetegnet av et intakt epitel som dekket villiene (blå pil), tynn lamina propria med sparsom cellulær sammensetning (blå pilspisser), og en tykkere, men sparsomt cellulær submucosa (*). Kryptene er merket med §. (b) To fisker ble observert med totalt tap av tarmepitel og fravær av villi-struktur (oransje pil), lamina propria var mildt tykkere (oransje pilspiss), og kryptene (§) så ut til å være mildt krympet. Bildene stammer fra det samme individet som er opphavet til bildene i Figur 20 og 24.



Figur 23 Antall MI-2 vevsseksjoner som ble vurdert som "normal", "mild", "moderat", "markert" eller "alvorlig" for endringer i morfologi av (a) villusstruktur og utseende av tarmepitel, (b) endringer i kryptstruktur, (c) økninger i bredde og inflammatorisk celleinfiltrering i lamina propria, og (d) submucosa.



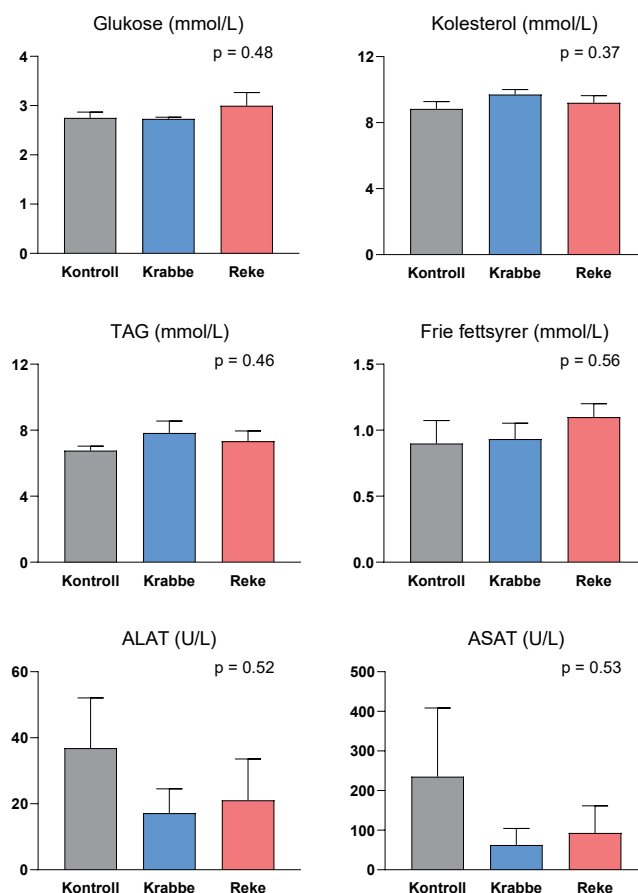
Figur 24 Representative bilder av MI-3-segmentet hos de 54 evaluerte fiskene. (a) Flertallet av fiskene hadde normal og frisk morfologi, kjennetegnet av et intakt epitel som dekket villiene (blå pil), tynn lamina propria med sparsom cellulær sammensetning (blå pilspisser), og en tykkere, men sparsomt cellulær submucosa (*). Kryptene er merket med §. (b) To fisker ble observert med totalt tap av tarmepitel og fravær av villi-struktur (oransje pil), lamina propria var mildt tykkere (oransje pilspiss), og kryptene (§) så ut til å være mildt krympet. Bildene stammer fra det samme individet som er opphavet til bildene i Figur 20 og 22.



Figur 25 Antall MI-3 vevsseksjoner som ble vurdert som "normal", "mild", "moderat", "markert" eller "alvorlig" for endringer i morfologi av (a) villusstruktur og utseende av tarmepitel, (b) endringer i kryptstruktur, (c) økninger i bredde og inflammatorisk celleinfiltrering i lamina propria, og (d) submucosa.

5.8 Blodkjemi

Ernæringsrelaterte blodparametre (glukose, kolesterol, triglyserider, frie fettsyrer), samt blodmarkører for leverfunksjon (ALAT, ASAT) er presentert i Figur 26. Det var ingen signifikante effekter av diett på analyserte måleparametre. Det var heller ingen signifikante effekter av kjønn (data ikke vist). Nivåene på disse biomarkørene i blodet anses for å være innenfor normalområdet, og er i samsvar med tidligere data rapportert for torsk (Hansen m. fl., 2013; Rosenlund m. fl., 2004).



Figur 26 Ernæringsrelaterte blodparametre, herunder glukose, kolesterol, triglyserider (TAG), og frie fettsyrer, samt blodmarkører for leverfunksjon, herunder alanin aminotransferase (ALAT) og aspartataminotransferase (ASAT). Ingen signifikante forskjeller ble funnet ($P > 0,05$).

5.9 Oppsummerende diskusjon og implementering av resultatene

Juvenile torsk i kar ved Havbruksstasjonen i Tromsø ble tildelt kontrollfôr og testfôr med 10 % rekeskallmel (reke) og 15 % krabbeskallmel (krabbe) i en periode på 27 dager. Testingrediensene ble byttet ut mot solsikkemel for å opprettholde likt protein (50-51 %), fett (18-19 %) og energiinnhold (20-21 kJ/g) i diettene. Studien ble gjennomført i naturlig sjøvannstemperatur (5-6 °C) for Tromsø i perioden mai-juni. Torsken ble føret etter appetitt med et daglig fôrintak på 0,2-0,5 % av biomassen, med en gjennomsnittsvekt som økte fra 343±18 til 384±26 g. Optimum temperatur for vekst hos torsk er 10-12 °C ved en størrelse på ca. 200 g (Björnsson m.fl., 2007; Imsland m.fl., 2005), men da hovedformålet med studien var å se på effekter på fordøyelse og tarmhelse så var det mest relevant å gjennomføre forsøket med de naturlige sjøvannstemperaturer som forekommer i kommersielt oppdrett av torsk i Nord-Norge. Det ble ikke observert signifikante forskjeller mellom diettgruppene i vekst eller fôrintak, men det var en sterk tendens ($P=0,057$) til høyere fôrfaktor med 10 % reke i dietten sammenlignet med de andre diettgruppene. Tidligere studier har vist at 20 % rekeskallmel sammenlignet med en kontrolldiett med planteproteiner (50 % av proteinet i fôret) gir redusert forinntak, fordøyelse og vekst, men at denne effekten ble ikke observert ved 10 % innblanding (Hansen m. fl., 2013). Samsvarende med våre resultater med en lavere aminosyrefordøyelse av dietten med rekeskall sammenlignet med de andre diettgruppene, viste Tibbets m. fl. (2006) lavere protein og energifordøyelse av rekeskallmel sammenlignet med krabbeskallmel, men også andre ingredienser som krill, fiskemel og en rekke planteproteiner. Disse ingrediensene ble inkludert med 30 % på toppen av en referansediett med kun fiskemel som proteinkilde, og viste ingrediensenes potensial i fôr til torsk. Vi hadde i vår studie lite tilgang på prøvemateriell til videre analyser av protein, fett og energi, og prioriterte derfor aminosyrefordøyelse som er viktig faktor for fiskens vekst. Større fisk og mulig høyere temperatur kunne gitt mer prøvemateriell, men den korte baktarmen til torsken gjør det utfordrende å samle nok prøvemateriell til akkrediterte metoder. Uansett viser flere studier lavere fordøyelse av rekeskallmel uavhengig om ingrediensen er tilsatt på toppen av en fiskemeldiätt (Tibbets m. fl., 2006), i en planteproteindiätt (Hansen m. fl., 2013) eller byttet ut mot solsikkemel, som i vår studie, eller oppdrettet ved respektive 12, 8 eller 6 °C.

Tarmhelsen hos fisken ble vurdert til å være hovedsakelig normal, frisk, og funksjonell. Det ble ikke observert noen klare effekter av diett på dødelighet, næringsstoffnivåer i blodplasma, gallesaltnivåer i tarminnhold, eller tarmmorfologi. I så måte er resultatene i samsvar med studien utført av Hansen m. fl. (2013), der dietter med 10-20 % krabbeskallmel eller 10 % rekeskallmel ikke resulterte i noen negative effekter på tarmmorfologi. Den samme studien viste at en økning av rekeskallmel til 20 % resulterte i endret tarmhistologi og reduserte næringsstoffnivåer i blodplasma, og forfatterne av artikkelen spekulerte i om disse negative observasjonene skyldes kitininnholdet i rekeskallet. I vår studie ble det videre observert stor variasjon i tarmlengde, med en klar indikasjon at tarmlengde er korrelert til fiskens størrelse. De lengre tarmene hadde ofte et komplisert tarmforløp med mange slynger og buktinger, og det er ikke usannsynlig at en relativt lengre tarm med mer komplisert tarmforløp kan gjøre fisken predisponert for komplikasjoner senere i livsstadiet. Feilleie av tarm, såkalt strangulerende obstruksjon (Skredsmo m.fl. under review; Journal of Fish Diseases), tidligere kalt tarmslyng, ble imidlertid kun observert i ett individ.

Ut fra disse betraktningene er skallmel fra marine sidestrømmer potensielle ressurser som kan inngå som ingredienser i fôr til oppdrettsfisk, inkludert torsk. I kommersielle fôr til torsk kan det være hensiktsmessig å tilsette rekeskallmel ved en lav inklusjon på under 10 % for å hindre eventuell negativ påvirkning på vekst og fôrfaktor som indikert i dette forsøket. Dette med særlig tanke på at det tidligere (Tibbets m. fl., 2006) er påvist at rekeskallmel har noe lavere fordøyelse sammenlignet med andre ingredienser vurdert i fôr til torsk, som samsvarer med den lavere fordøyelsen av aminosyrer i dietten med rekeskallmel sammenlignet med krabbeskallmel i vår studie med torsk. Ingrediensen vil da bidra med essensielle aminosyrer, fettsyrer og mineraler, og kan brukes som en viktig kilde til disse næringsstoffene. Studien vår indikerer også at rekeskallmel kan gi appetittstimulerende effekter, og kan brukes med høyere innblandinger i overgangsfaser for å få opp fôrinntaket. For å beskrive rekeskallmelet sitt fulle potensial bør det gjennomføres vekstforsøk til dobbelt vekt med ulike innblandingsnivå av ingrediensen.

6 Hovedfunn

- Skallmel fra marine råstoff er en sidestrøm som kan brukes som ingredienser i fôr til fisk, redusere innblanding av fiskemel fra ville bestander og bidra til økt bærekraftig bruk av lokale ressurser i fôret til torsk. Fordøyelse og tarmhelse ble derfor studert i 300-grams torsk tildelt kontrolldiett med planteproteinet solsikkemel som i to testfôr ble byttet ut med 15 % krabbeskallmel eller 10 % rekeskallmel. Forsøket ble gjennomført over 27 dager med daglig registrering av fôrinntak. Lik vekst og fôrinntak ble det observert mellom diettgruppene, men en sterk tendens ($P=0.057$) til høyere fôrfaktor hos torsk tildelt dietten med rekeskallmel sammenlignet med de to andre diettgruppene.
- Tarmhelsen hos fisken ble vurdert til å være hovedsakelig normal, frisk, og funksjonell. Det ble ikke observert noen klare effekter av diett på dødelighet, næringsstoffnivåer i blodplasma, gallesaltnivåer i tarminnhold, eller utseende og struktur av tarm. Kun en fisk ble observert med feileie av tarm, såkalt strangulerende obstruksjon (tidligere kalt tarmslyng), men med stor variasjon i størrelse på fisken ble det observert en klar korrelasjon mellom tarmlengde og fiskestørrelse som mulig kan medvirke til tarmproblematikk i senere livsstadier. Videre undersøkelse for å avdekke om denne tilstanden er genetisk relatert eller er enestående for oppdrettsfisk er nødvendig. Samtidig bør fôringsstudier gjennomføres kommersielt for å i større grad avdekke om ulike behandlinger kan ha påvirkning på forekomst og dødelighet av denne tarmlidelsen.
- Økt innblanding av skallmel i fôr til torsk vil øke innholdet av mineraler med lav fordøyelighet, men så lenge innholdet av fordøyelig protein og energi opprettholdes vil dette ikke påvirke fiskens vekst. Krabbeskallmel har noe høyere aminosyrefordøyelse sammenlignet med rekeskallmel og kontroll, men enkelte aminosyrer som lysin, metionin og valin viste lik fordøyelighet mellom fôrgruppene tildelt skallmel. Med utgangspunkt i denne studien og tidligere publiserte funn er rekeskallmel en ressurs som kan brukes med verdifulle næringsstoffer som kan balansere diettene. Rekeskallmel kan på lik linje med krabbeskallmel redusere fôrets bulk tetthet, og gi redusert hardhet og stabilitet av fôrpelletene i vann. Tiltak i fôrformulering og under fôrproduksjon må vurderes for å optimalisere fôr kvalitet ved skallmeltilsetning. Ytterligere vekstforsøk til minst doblet vekt, gjerne på stor torsk, bør gjennomføres for å studere hvordan ulike innblandingsnivå av skallmel påvirke torskens fôrinntak, vekst og helse.

7 Leveranser

- Referat referansegruppemøte 30. mai 2023
- Referat referansegruppemøte 20. oktober 2023
- Referat referansegruppemøte med gjennomgang av sluttrapport (januar 2024)
- Faglig sluttrapport (januar 2024)
- Administrative sluttrapport (februar 2024)
- Utkast til artikkel for publisering i peer-review journal 2024
- Presentasjon på Havbrukskonferansen til FHF/NFR 2024

8 Referanser

- Björnsson, B., Steinarsson, A., Árnason, T., 2007. Growth model for Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effects of temperature and body weight on growth rate. *Aquaculture* 271, 216-226.
- Danulat, E., 1987. Digestibility of chitin in cod, *Gadus morhua*, in vivo. *Helgol. Meeresunters.* 41, 425–436.
- Hansen, A.C., Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Olsen, R.E., Hemre, G.I., 2013. Marine ash-products influence growth and feed utilization when Atlantic cod *Gadus morhua* L. are fed plant-based diets. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 532-540. <https://doi.org/10.1111/jai.12087>
- Imsland, A.K., Foss, A., Folkvord, A., Stefansson, S.O., Jonassen, T.M., 2005. The interrelation between temperature regimes and fish size in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): effects on growth and feed conversion efficiency. *Fish Physiology and Biochemistry* 31, 347-361.
- Kaada, I., 2008. Økt problem med tarmslyng hos torsk. kyst.no: <https://www.kyst.no/nr-10-2008/okt-problem-med-tarmslyng-hos-torsk/243860>.
- Kortner, T. M., Skugor, S., Penn, M. H., Mydland, L. T., Djordjevic, B., Hillestad, M., Krasnov, A. & Krogdahl, A., 2012. Dietary soyasaponin supplementation to pea protein concentrate reveals nutrigenomic interactions underlying enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Veterinary Research* 8, 101
- Kortner, T.M., Gu, J., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., 2013. Transcriptional regulation of cholesterol and bile acid metabolism after dietary soyabean meal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). 109, 593-604. [10.1017/s0007114512002024](https://doi.org/10.1017/s0007114512002024)
- Krogdahl, Å., Bakke-McCkellep, A. M. & Baeverfjord, G., 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*. 9, 361-371.
- Krogdahl, A., Kortner, T. M., Jaramillo-Torres, A., Gamil, A. A. A., Chikwati, E., Li, Y. X., Schmidt, M., Herman, E., Hymowitz, T., Teimouri, S. & Storbakken, T., 2020. Removal of three proteinaceous antinutrients from soybean does not mitigate soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture*, 514.
- Lall, S.P., Nanton, D., 2002. Nutrition of Atlantic cod. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 102-1, 23–26.
- NRC, 1993: Nutrient requirement of fish. In: R. P. Wilson (Ed). National Academy Press, Washington D.C., USA.
- Pike, I.H., 1991. Freshness of fish for fish meal—effect of growth on salmon. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice. Les Colloques*, vol. 61. INRA, Paris, pp. 843–846.
- Ringo E., Zhou Z., Olsen R. E., Song S. K., 2012. Use of chitin and krill in aquaculture - the effect on gut microbiota and the immune system: a review. *Aquaculture Nutrition* 18, 117-131.
- Rosenlund, G., Karlsen, Ø., Tveit, K., Mangor-Jensen, A., Hemre, G.I., 2004. Effect of feed composition and feeding frequency on growth, feed utilization and nutrient retention in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Nutrition* 10, 371-378.
- Skedsmo, F.S., Løkka, G., Chikwati, E., Jacobsen, J.V., Espenes, A., Kortner, T.M. (under review) Intestinal strangulation in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*): Pathological changes and possible predisposing anatomical features. *Journal of Fish Diseases*.
- Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Lall, S.P., 2006. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 261, 1314-1327. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.052>
- Toppe, J., Aksnes, A., Hope, B., Albrektsen, S., 2006. Inclusion of fish bone and crab by-products in diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 253, 636-645. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.015>