

## **Forebyggende ernæring mot lus på laks**

Forsøk og dokumentasjon på betydning av samvirkning mellom aktive tilsetninger og grunnfôr. Faglig delrapport, finansiert at FHF

André S Bøgevik, Lene Sveen, Elisabeth Ytteborg, Christian René Karlsen, Carlo Lazado, Aleksei Krasnov, Gerrit Timmerhaus, Linda Andersen, Steffen H Blindheim, Ole Myre, Grigory Merkin, Mearge Okubamichael og Karin Pittman





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

Nofima har om lag 370 ansatte.

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

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunnalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Alta:**

Kunnskapsparken, Markedsgata 3  
NO-9510 Alta

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

# Rapport

<p><i>Tittel:</i>  <b>Forebyggende ernæring mot lus på laks - forsøk og dokumentasjon på betydning av samvirkning mellom aktive tilsetninger og grunnfôr</b>          Faglig delrapport, finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	ISBN 978-82-8296-609-2 (pdf) ISSN 1890-579X
<p><i>Title:</i>          Nutrition as a mean to reduce sea lice infestation in Atlantic salmon</p>	<p><i>Rapportnr.:</i>          30/2019</p> <p><i>Tilgjengelighet:</i>  <b>Åpen</b></p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i>          Andre S. Bøgevik<sup>1</sup>, Lene Sveen<sup>1</sup>, Elisabeth Ytteborg<sup>1</sup>, Christian René Karlsen<sup>1</sup>, Carlo Lazado<sup>1</sup>, Aleksei Krasnov<sup>1</sup>, Gerrit Timmerhaus<sup>1</sup>, Linda Andersen<sup>2</sup>, Steffen H Blindheim<sup>2</sup>, Ole Myre<sup>3</sup>, Grigory Merkin<sup>3</sup>, Mearge Okubamichael<sup>3</sup> og Karin Pittman<sup>3</sup>  <sup>1</sup>Nofima AS - <sup>2</sup>Industrilaboratoriet AS - <sup>3</sup>Quantidoc AS</p>	<p><i>Dato:</i>          7. november 2019</p>
<p><i>Avdeling:</i>          Ernæring og forteknologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i>          33</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i>          Aller Aqua AS</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i>          FHF 901458</p>
<p><i>Stikkord:</i>          Ernæring, laks, lakselus, lusefôr, mineraltilsetning, regnbueørret</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i>          10601</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Aller Aqua Norway AS ble i 2017 gjennom en åpen utlysning tildelt midler fra FHF (prosjekt nr 901458) for å dokumentere effekten av mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) mot lusesmitte på laks. Forsøk på regnbueørret ved Aller Aqua sin FoU-konsesjon Floteneset (Seamatech AS) har i 2 produksjoner 2015-2018 indikert effekter av BF-fôr på lusetall av hunnlus. Det er utført tilsvarende forsøk på laks ved lokaliteten Leland (Fylkesnes Fisk AS) i 2017, men effekter av BF-fôret på lusetall kunne ikke påvises i dette forsøket. Formålet med prosjektet var derfor å gjøre endringer på ingrediensen slik at den gav bedre virkning mot lus på laks.</p> <p>Aller Aqua Norway AS har vært prosjektansvarlig, og stått for avgjørelser i prosjektet. Dette gjelder valg av mineralingredienser til uttesting i forsøk, godkjenning av fôrresepter og forsøksdesign. Nofima har vært FoU-ansvarlig og stått for planlegging av fôringsforsøk med laks ved Ilab og småmerdforsøk ved Seamatech sitt anlegg ved Vadheim. Til disse forsøkene ble det brukt en mineralingrediens valgt av Aller Aqua ut fra <i>in vitro</i> forsøk ved Ilab, tilsatt etter anbefalinger 4 % i forsøksfôret produsert ved Nofimas Fôrteknologisenter. Nofima-produsert BF-fôr viste seg høst 2018 å inneholde verdier av jod (1200 mg/kg) over øvre tillatte grenseverdi (20 mg/kg) grunnet en blandingsfeil av mineralingrediensen Biofeed Forte gjort av produsenten, Pharmatech AS. Nofima-produsert kontrollfôr uten mineralingrediensen hadde et jodinnhold på 7 mg/kg. Effekter observert i karforsøk ved Ilab og småmerdforsøk Vadheim 2018 er derfor ikke kommersielt relevant, da de observerte effektene ikke kan tilskrives jodinnholdet eller øvrige komponenter i mineralingrediensen. Til tross for dette ble det observert interessante funn på fisk fôret med BF-fôr på lusetall og skinnets morfologi/fysiologi som diskuteres i rapporten. Disse funnene danner grunnlag for videre studier for å forstå effekter av fôringsredienser som kan påvirke skinnhelse og redusere lusetall hos laks og regnbueørret.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>Aller Aqua Norway have in collaboration with Biofeed developed an ingredient (BF) that dissolved in sea water appears to in-activate adult sea lice (<i>in vitro</i> model, Ilab). Trials at the Aller Aqua R&amp;D-licenses have shown that BF-feeds to rainbow trout appear to reduce lice number, while this effect is not observed in Atlantic salmon. Funding from FHF was therefore given to further develop the ingredient to target a feed that also can reduce lice numbers in Atlantic salmon. Aller Aqua Norway has been the project leader and provided design and ingredients for the experiments. Spring 2018 an ingredient provided by Biofeed was chosen due to its in-activation of adult lice. The ingredients were provided to Nofima June 2018 to be included in feeds for trial in tanks at Ilab and sea cages at Sematech. However, analysis of feed and fish after the trials showed high value of iodine (1200 mg/kg) due to inclusion of components in the Biofeed ingredients. The iodine content in the control feed was 7 mg/kg. Nonetheless the experiments provided interesting results (e.g. reduced lice number and altered skin morphology/physiology) that are discussed in the report, and could be basis for further research on the nutritional impact on skin health and sea lice in Atlantic salmon and rainbow trout.</p>	

## Forord og nøkkelopplysninger

Aller Aqua Norway AS har vært prosjektansvarlig og har stått for valg av mineralingredienser til uttesting i forsøk. Fôr med uttesting av ulike varianter av mineralingredienser er designet av Aller Aqua og testet på lusesmittet laks og ørret ved Ilab. Aller Aqua har i tillegg gjennomført andre uttestinger av ulike varianter av mineralingredienser direkte på voksen lus ved Ilab. Nofima har ikke hatt tilgang på informasjon om valg av mineralingrediens til videre bruk i forsøk og til kommersielle fôr. Nofima har stått for planlegging av fôringsforsøk med laks etterfulgt av kopepodittsmitte gjennomført ved Ilab og forsøk i 5 x 5 m merder med laks og regnbueørret på Seamatech sitt anlegg ved Vadheim. Til disse forsøkene ble det brukt en mineralingrediens valgt av Aller Aqua, tilsatt etter anbefalinger 4 % i forsøksfôret produsert ved Nofimas Fôrteknologisenter. Nofima har vært deltagende i uttak og gjennomført analyser fra disse forsøkene.

Det ble ved et uhell produsert en mineralingrediens med et forhøyet nivå av jod sommeren 2018. Denne ingrediensen ble benyttet i fôr produsert av Nofima til forsøk ved Ilab juni-august 2018 og i Vadheim oktober-november 2018. Denne feilen ble oppdaget ved mineralanalyser av fôr og fisk fra Ilab forsøket høsten 2018. Effekter observert i karforsøk ved Ilab og småmerdforsøk Vadheim 2018 er derfor ikke kommersielt relevant, og kan ikke sammenlignes med resultat oppnådd ved Aller Aqua sine FoU-konsesjoner.

Prosjektnummer FHF	FHF 901458
Prosjektperiode	2017-2019
<b>Prosjektansvarlig</b>	Sturle Skeidsvoll
Telefon/Mobil	977 01 367
E-post	<a href="mailto:sturle.skeidsvoll@gmail.com">sturle.skeidsvoll@gmail.com</a>
Posisjon	Daglig leder Aller Aqua Norway
<b>Prosjektleder</b>	Jørgen Borthen
Telefon/Mobil	951 39 288
E-post	<a href="mailto:borthen@sjomat.no">borthen@sjomat.no</a>
Posisjon	Daglig leder, Norsk Sjømatsenter

<b>Prosjektleder i Nofima</b>	André S Bogevik
Telefon/Mobil	55 11 21 65
E-post	<a href="mailto:andre.bogevik@nofima.no">andre.bogevik@nofima.no</a>
Posisjon	Forsker

# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag (både på norsk og engelsk)</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b> .....	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring og resultater AP 1 – Fôrdesign laks</b> .....	<b>5</b>
4.1	Biofeed Forte varianter .....	5
4.2	Fôringsforsøk ved Stiftelsen Industrilaboratoriet (ILAB) Bergen.....	8
4.2.1	Mineralanalyser .....	10
4.2.2	Histologiske analyser av laksens skinn og tarm.....	10
4.2.3	Spektroskopiske analyser av mukus .....	14
4.2.4	ELISA av immunparametre i mukus.....	15
4.2.5	Genekspresjonsanalyser med microarray .....	15
4.2.6	Effekten av fôrforsøket, lusesmitte på histologi og transkripsjon i gjeller.....	17
4.2.7	Mikrobiotaanalyser .....	18
4.2.8	Proteomikkanalyser.....	18
4.2.9	Oppsummering av resultater fra llab-forsøk.....	19
<b>5</b>	<b>Prosjektgjennomføring og resultater AP 2: Laks mot regnbueørret</b> .....	<b>22</b>
5.1	Storskalaforsøk Bømlo.....	22
5.2	Småmerder ved Seamatech AS sin lokalitet Floteneset, Vadheim .....	28
<b>6</b>	<b>Hovedfunn</b> .....	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser</b> .....	<b>31</b>
<b>8</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>32</b>

## 1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Aller Aqua Norway AS ble i 2017 tildelt midler fra FHF (nr 901458) for å dokumentere effekten av mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) mot lusesmitte på laks, samt optimalisere bruken av mineralingrediensen i kommersielle fôr til laks. Aller Aqua Norway har i samarbeid med Biofeed utviklet en ingrediens som er valgt ut ifra inaktivering av voksen lus i en sjøvannsløsning (*in vitro* modell utviklet av Ilab). I storskala-forsøk på regnbueørret ved Aller Aqua sin FoU-konsesjon Floteneset (Seamatech AS, Vadheim, Sogn og Fjordane) har en i 2 produksjoner 2015-2018 indikert effekter av BF-fôr på lusetall av hunnlus. Det er utført tilsvarende forsøk på laks ved lokaliteten Leland (Fylkesnes Fisk AS, Bømlo, Hordaland) i 2017, men effekter av BF-fôret på lusetall kunne ikke påvises i dette forsøket. Formålet med prosjektet var derfor å gjøre eventuelle endringer på ingrediensen slik at den gav bedre virkning mot lus på laks, og se på samspillseffekter med andre ingredienser i fôret.

Aller Aqua Norway AS har vært prosjektansvarlig, og stått for avgjørelser i prosjektet. Dette gjelder valg av mineralingredienser til uttesting i forsøk, godkjenning av fôrresepter og forsøksdesign. Nofima har vært FoU-ansvarlig og stått for planlegging av fôringsforsøk med laks ved Ilab og småmerdforsøk ved Seamatech sitt anlegg ved Vadheim. Innledningsvis i prosjektet vinter 2017-2018 ble det utført forsøk på lusesmittet regnbueørret og laks i enkeltfiskenheter ved Ilab for å studere effekter av ulike BF-varianter og fôr. En kunne ikke fra disse forsøkene konkludere med effekter av BF-ingrediensene på lusesmitte, og nye BF-varianter ble derfor testet og valgt ut ifra inaktivering av voksen lus ved bruk av en *in vitro* modell ved Ilab. Basert på disse forsøkene ble det valgt en mineralingrediens av Aller Aqua som skulle benyttes i fiskeforsøkene i prosjektet, og som ble tilsatt etter anbefalinger 4 % i forsøksfôret produsert ved Nofimas Fôrteknologisenter. Nofima-produsert BF-fôr viste seg høst 2018 å inneholde verdier av jod (1200 mg/kg) over øvre tillatte grenseverdi (20 mg/kg) grunnet en blandingsfeil av mineralingrediensen Biofeed Forte gjort av produsenten, Pharmatech AS. Nofima-produsert kontrollfôr uten mineralingrediensen hadde et jodinnhold på 7 mg/kg. Effekter observert i karforsøk ved Ilab og småmerdforsøk Vadheim 2018 er derfor ikke kommersielt relevant, da de observerte effektene ikke kan tilskrives jodinnholdet eller øvrige komponenter i mineralingrediensen. Til tross for dette ble det observert interessante funn på fisk fôret med BF-fôr på lusetall og skinnets morfologi/fysiologi som diskuteres i rapporten. Disse funnene danner grunnlag for videre studier for å forstå effekter av fôringredienser som kan påvirke skinnhelse og redusere lusetall hos laks og regnbueørret.

### English Summary

Aller Aqua Norway AS has in collaboration with Biofeed developed an ingredient (BF) that in a sea water solution appears to in-activate adult sea lice (*in vitro* model, Ilab). Commercial trials with rainbow trout at the Aller Aqua R&D-license location Floteneset (Sematech AS, Vadheim, Sogn & Fjordane) have shown that the ingredients appear to reduce female lice numbers, while this effect are not observed in Atlantic salmon at the R&D-license location Leland (Fylkesnes Fisk AS, Bømlo, Hordaland). Funding from FHF was therefore given to further develop the ingredient from Biofeed and included together with ingredients to target a feed that also can reduce lice numbers in Atlantic salmon.

Aller Aqua Norway has been the project leader and provided design and ingredients for the experiments. Winter 2017-2018 tank trials with rainbow trout and Atlantic salmon in single fish units challenged with sea lice were performed with different BF-ingredients and feeds. However, an effect of the ingredients on lice numbers was not concluded from these trials and therefore spring 2018 an

ingredient provided by Biofeed was chosen due to its in-activation of adult sea lice by an *in vitro* model developed by Ilab. The ingredients were provided to Nofima June 2018 to be included in feeds for trial in tanks at Ilab and sea cages at Sematech. However, analysis of feed and fish after the trials showed high value of iodine (1200 mg/kg) due to a mistaken inclusion of components in the Biofeed ingredients. The iodine content in the control feed was 7 mg/kg. The BF-feed used in the tank trial at Ilab and small-cage trial at Vadheim are not commercially relevant to the feeds used. This also reflects the results from the R&D license trials at Fylkesnes Fisk in 2018 that showed no effect of BF-feed on number of sea lice. The experiments with the iodine-rich BF-feed provided nonetheless interesting results (e.g. reduced lice number and altered skin morphology/physiology) that are discussed in the report, and could be basis for further research on the nutritional impact of skin health and sea lice in Atlantic salmon and rainbow trout.

## 2 Innledning

Prosjekteier Aller Aqua Norway AS ble tildelt 1 FoU tillatelse (á 780MTB) i 2013 som har blitt benyttet på Seamatech AS sin lokalitet Floteneset i Vadheim, Sogn og Fjordane. Denne tillatelsen ble forlenget med 5 år i 2016-2017, og ytterligere en tillatelse på 780 MTB i 5 år ble tildelt. Aller Aqua AS benytter disse tillatelsene på lokaliteten Floteneset (Sogn og Fjordane) hos Seamatech AS og lokaliteter på Bømlo i Sunn-Hordaland hos Fylkesnes Fisk AS. Hos Seamatech AS har det vært gjennomført forsøk på regnbueørret tildelt Aller Active fôr med mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) i 2 produksjonssykluser 2015-2016 og 2016-2017. Anlegget har ikke hatt mekanisk avlusning under disse produksjonene, med indikasjoner at BF-fôr gir signifikant lavere antall kjønnsmodne hunnlus per fisk enn fisk tildelt fôr uten BF. Hvilke direkte innvirkninger BF har på regnbueørretens skinnhelse kan enda ikke fastslås, men det er indikasjoner om endring i fiskens slimceller og transkriptomiske effekter på fiskens skinn. Nofima AS har som FoU-ansvarlig i prosjektene skrevet 3 rapporter fra disse forsøkene (K-81 2016, K-74 2017 og K-30 2018). I tillegg er det gjennomført forsøk på Atlantisk laks hos Fylkesnes Fisk der en så effekt på lusetall hos fisk fôret med Aller Active med BF, men det var også brukt leppefisk i merd (K-64 2018). Fra forsøkene som er gjennomført i perioden 2015-2017 anser Nofima at det er ikke mulig å konkludere effekt på lusepåslag til å kun tilskrives tilsetningen av ingrediensen Biofeed Forte. Dette begrunnes i at i forsøk med både laks og regnbueørret har det vært variasjon i fôrets grunnoppskrift (kontroll-fôr ulikt til test-fôr), i tillegg til ulike varianter av mineralingrediensen Biofeed Forte som gjør det vanskelig å sammenligne forsøk. I tillegg har det vært variasjon mellom merder i fiskestørrelse/-antall/-opphav, og ulik innblanding av rensefisk (i forsøk med laks). Nye forsøk med kontrollert oppsett ble derfor planlagt i dette FHF-støttede prosjektet for å dokumentere effekten av mineralingrediensen Biofeed Forte på lusepåslag hos laks og regnbueørret.



### **3 Problemstilling og formål**

Hovedmålet til dette prosjektet har vært å minimalisere mekanisk/medikamentelle avlusning ved å bruke ernæringsrelatert strategi. Aller Aqua Norway AS har i samarbeid med Biofeed AS utviklet en mineralingrediens som har vist å gi direkte virkning på voksne lakselus i forsøk ved Industrielaboratoriet AS (Ilab). I prosjektet skulle en ny generasjon av mineralingrediensen Biofeed Forte velges ut fra samme metode. Utvalgt mineralingrediens og grunnfôr skulle benyttes til å studere effekt på fiskens prestasjon, skinnhelse og lusepåslag i kontrollerte karforsøk ved Ilab samt, forsøk i merdanlegg med laks og regnbueørret for å verifisere resultat som er observert tidligere.

## 4 Prosjektgjennomføring og resultater AP 1 – Fôrdesign laks

### 4.1 Biofeed Forte varianter

Fem varianter av mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) har blitt testet i enkeltfiskforsøk (1 fisk per kar) med laks og regnbueørret i perioden 2017-2018 ved Ilab. Fôrene ble produsert ved Aller Aqua i Tyskland, med samme grunnfôr i alle diettene (unntatt et fôr med høyt animalsk innhold), og sammenlignet med Aller Gold som er et ferskvannsfôr til ørret med lavt innhold av fiskemel (tabell 1).

Tabell 1 Fôrsammensetning med ulike varianter av mineralingrediensen (%)

	Aller Gold	Lx1A	Lx1B	Lx2	Lx3	Lx4
Marine ingredienser	?	41	51	51	51	51
Planteingredienser	?	31	37	37	37	37
Animalske ingredienser	?	14	2	2	2	2
Tilsetningsstoffer	?	10	6	8	8	8
Mineralmix LX1	0	4	4			
Mineralmix LX2	0	0		2		
Mineralmix LX3	0	0			2	
Mineralmix LX4	0	0				2

Laks på 400 g og regnbueørret på 300 g ble ved to ulike tidspunkt fordelt i 18 enkeltfiskenheter. Når tilfredsstillende appetitt på alle individene var oppnådd med standard Skretting-fôr ble 5 voksne hunnlus satt på hver av fiskene. Fisken ble fulgt opp daglig med bla observasjon om fisken hadde mistet noen av lusene. I løpet av en måneds tid ble det på nytt påført voksne hunnlus 2 ganger, slik alle fiskene skulle ha 5 voksne hunnlus ved diettskifte fra standard Skrettingfôr til Aller Aqua fôr. Enda voksne hunnlus var påført fisken en rekke ganger var det ved diettskifte flere fisk som kun hadde 2 voksne hunnlus igjen (Tabell 2 og 3). Antall voksne hunnlus per fisk var observert daglig i 20 dager. Enda det var observert 20-50 % reduksjon i antall voksne hunnlus gjennom forsøksperioden, var det også flere fisk som hadde alle 5 lusene festet på seg ved forsøkslutt. Det ble ikke observert systematiske effekter av de tildelte diettene verken på laks eller regnbueørret (Figur 1AB).

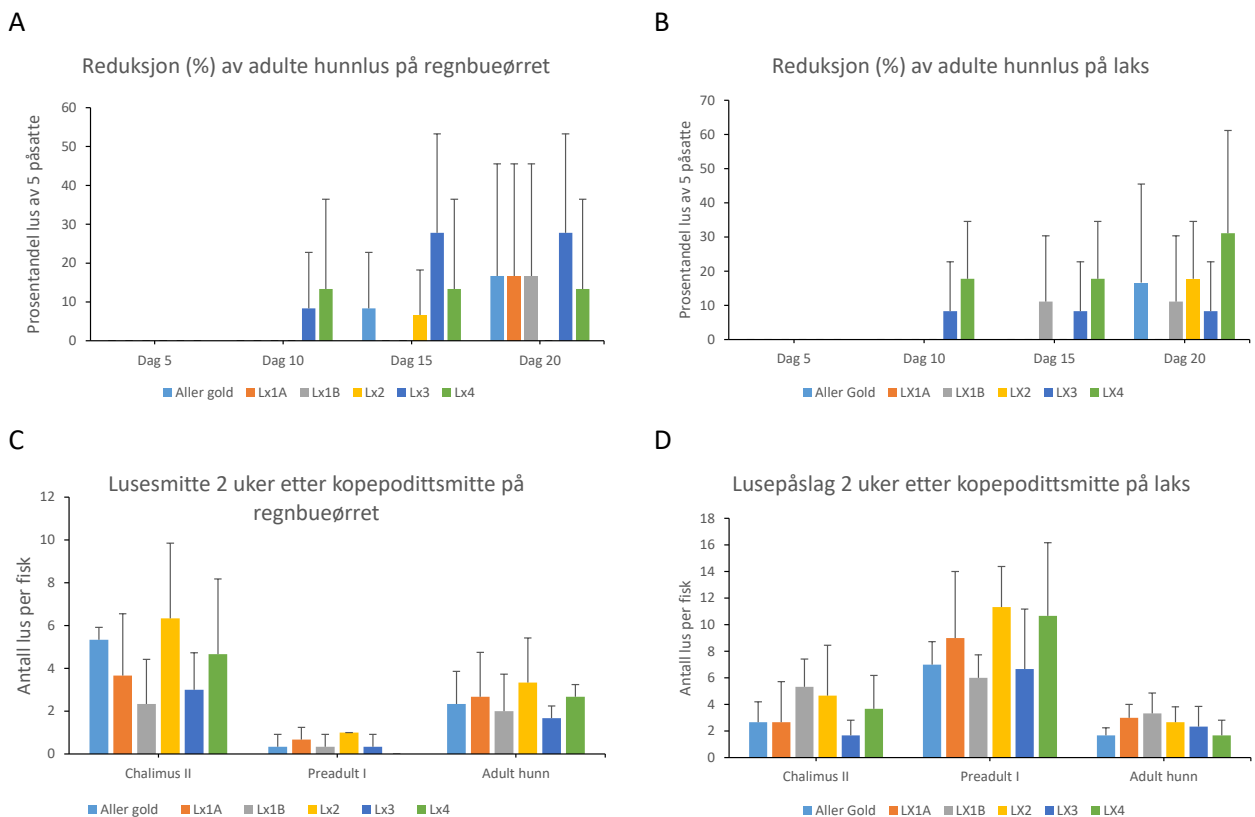
Tabell 2 Voksne hunnlus på laks antall dager før diettskifte (dfd) til respektive kontrollfôr (Aller Gold) og Aller fôr med innblanding av ulike BF-varianter

Kar	B2	C2	C5	B1	B5	C6	A4	B3	C4	A1	A5	B6	A2	A6	C3	A3	B4	C1
dfd	Aller Gold			LX1A			LX1B			LX2			LX3			LX4		
-46	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-35	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-20	4	4	5	4	5	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
0	3	2	2	4	4	4	5	3	3	3	5	3	3	4	4	3	5	3

Tabell 3 Voksne hunnlus på regnbueørret antall dager før diettskiften (dfd) til respektive kontrollfôr (Aller Gold) og Aller fôr med innblanding av ulike BF-varianter. Verdier i parentes er antall ekstra hunnlus tilfôr for å opprettholde 5 lus per fisk

Kar	A2	A6	C5	A4	B3	C1	A1	B2	C6	A5	B5	C4	B1	B6	C2	A3	B4	C3
dfd	Aller Gold			LX1A			LX1B			LX2			LX3			LX4		
-21	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-13	5	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4
		(+2)	(+2)			(+2)	(+3)	(+3)				(+3)		(+3)	(+2)		(+3)	
0	4	4	2	4	4	2	2	5	2	4	5	1	3	3	4	5	3	4

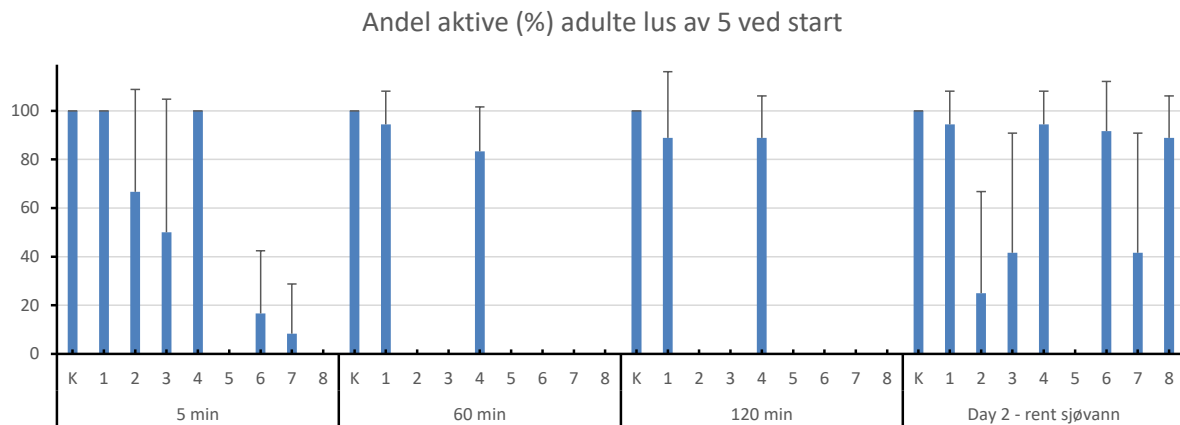
Fisken i de respektive enhetene ble deretter individmerket og smittet med 25-30 kopepoditter per fisk i et samlekar. Etter smitte ble fisken ført tilbake i de respektive enkeltfiskene. To uker etter smitte ble antall lus talt, og utviklingsstadium notert (chalimus II, preadult I og voksne hunnlus). Ingen systematiske effekter av de tildelte diettene verken på laks eller regnbueørret ble observert (Figur 1 C og D).



Figur 1 Telling av voksne hunnlus på regnbueørret (A) og laks (B) 5, 10, 15 og 20 dager etter diettskifte til respektive kontrollfôr (Aller Gold) og Aller fôr med innblanding av ulike BF-varianter (Lx1-4), samt telling av ulike stadier av lus påfølgende uker etter kopepodittsmitte på regnbueørret (C) og laks (D).

Vår 2018 ble 8 nye varianter (Lx1-Lx8) av Biofeed-ingrediensen testet direkte på lus ved Ilab i et *in vitro* oppsett/bioassay. Ingrediensen ble blandet med sjøvann for å lage 4 % løsning, samt en kontrollblanding med kun sjøvann. Blandingene (å 100 ml) ble fordelt i begerglass i lakseluslaboratoriet ved 12 grader, totalt 27 begerglass med fem lus i hver (to hanner, tre hunner) ble benyttet i forsøket.

Adferd hos lus (antall fastsittende samt aktivitet) ble undersøkt ved ulike tidspunkt. Etter 210 minutter ble lusene ført tilbake til rennende sjøvann og undersøkt på nytt dagen etter. Resultatene viste at lus i Lx5 og Lx8 ble inaktive tilsynelatende umiddelbart (<5 min) etter eksponering for løsningene. Neste dag var det kun lus i Lx5 som var døde, mens de fleste i Lx8 var i live. For Lx2, Lx3, Lx6 og Lx7 ble lusene inaktive tilsynelatende etter 5-30 minutter, men dagen etter var flere lus i live - da spesielt hannlus. I Lx6 var også de fleste hunnlusene i live dagen etter. Ingen dødelighet ble observert i sjøvannskontrollene. I Lx1 og Lx4 var det liten effekt på lusene (Figur 2). Det kan se ut som flere av stoffene har en paralyserende effekt på lakselusen, spesielt hannlusen, mens Lx5 var det eneste stoffet hvor alle lusene døde (Ilab FoU rapport 2-2018).



**Figur 2** BF varianter 1 - 8 blandet ut i sjøvann (1:24) og K=kontroll kun sjøvann. 100 ml løsning i hvert begerglass, 3 per behandling. Beholder med 5 lus (2 han + 3 hun) i 0-210 min og deretter i rent sjøvann over natten. Resultat vist som prosentandel aktive lus ved gitte tidspunkt (n=3; gjennomsnitt ± standardavvik).

## 4.2 Fôringforsøk ved Stiftelsen Industrielaboratoriet (ILAB) Bergen

Nofima produserte mai 2018 to fôr på 3 mm pelletstørrelse basert på ingredienssammensetning i fôr brukt ved Aller Aqua sine FoU-konsesjoner, samt etter anbefaling fra Biofeed AS og Aller Aqua Norway AS innblanding av 4 % av den utvalgte varianten av Biofeed Forte fra forsøkene over ved Ilab (Tabell 4). Fôret med mineralingrediensen Biofeed Forte ble høsten 2018 analysert til å inneholde jod (1200 mg/kg) over øvre grenseverdi for hva som er tillatt i fullfôr til laks (20 mg/kg). Dette begrunner Biofeed i en innblandingsfeil som har gitt et forhøyet nivå av jod. Kontrollfôret inneholdt 7 mg/kg jod. De andre mineralene var innenfor tillatte grenseverdier, med noe lavere innhold av mangan og sink i forsøksfôret. Alle fôrene produsert til disse forsøkene ble tilsatt yttrium for å gjennomføre fordøyelsesanalyser

Tabell 4 Sammensetning av forsøksfôr

Diettsammensetning (%)	Aller C	Aller BF
Marine ingredienser	34,0	
Planteingredienser	55,3	
Animalske ingredienser	4,0	
Tilsetningsstoffer	6,7	
Ingrediensblanding diett Aller C		96,0
Biofeed Forte ingrediens		4,0

I begynnelsen av juli 2018 ble 360 postsmolt laks bulkveid (snitt  $87,5 \pm 0,6$  g) og fordelt likt til 6 kar med sjøvann (450L kar i hall AH10 ved Ilab, Bergen). Fisken var tildelt standard kommersielt fôr (Skretting Nutra Olympic, 3 mm) under smoltfisering og frem til forsøksstart. Samtidig med forsøksstart ble det tatt prøver fra 15 fisk av skinn, gjeller, fortarm og baktarm til histologianalyser av slimceller. Fra 9 av disse ble det også tatt prøver av baktarminnhold til mikrobiotaanalyser, samt lever, muskel og skinn til mineralanalyser. De 6 resterende fiskene ble analysert for mineralinnhold i hel fisk.

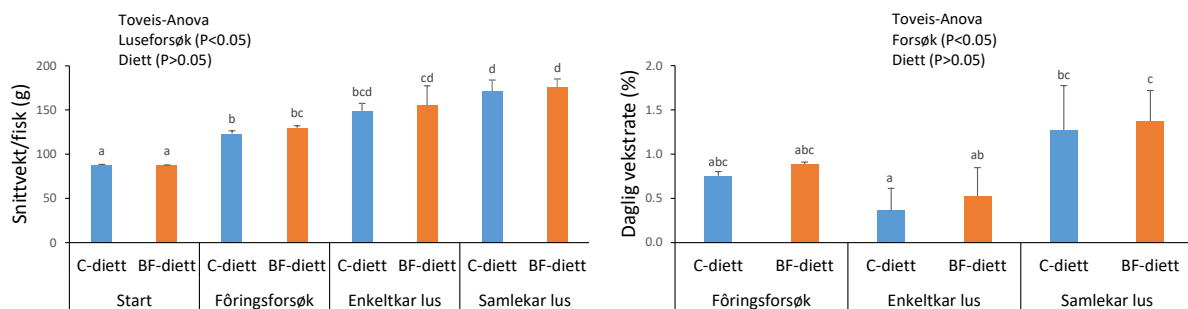
Fisk i triplikate kar ble tildelt kontrollfôr eller eksperimentelt fôr med Biofeed Forte i 45 dager i et randomisert kardesign. Fisk ble fôret etter appetitt, med tilstrekkelig overføring som sikrer at all fisk hadde god tilgang på fôr. Etter den innledende forsøksperioden ble 5 fisk per kar individveid og prøver ble tatt til histologi som over, samt prøver av skinn og slim til microarray og proteomikk, og lever, muskel og skinn til mineralanalyser. I tillegg ble det strøket faeces fra 10 fisk per kar, og disse ble også analysert for mineraler.

De resterende 45 fiskene per kar ble individmerket med VIE-merker i gjennomsiktig fettvev bak øye (elastomermerker i ulike farger). Tre 3 individmerkede fisk per kar (total 18 fisk, 9 per diett) ble så overført til enkeltfiskenheter. Ytterligere syv individmerkede fisk per kar ble samlet i et felles kar per diettgruppe (21 fisk per diett). Deretter ble de resterende fiskene flyttet tilbake i respektive kar fra den foregående forsøksperioden for amøbesmitte i henhold til planene i RFFV-prosjektet (ikke rapportert her).

Fisk fra enkeltfiskenheter og de 2 store karene ble tildelt de respektive diettene med og uten BF og smittet med lakselus kopepoditter når tilfredsstillende fôropptak var oppnådd. Individmerket fisk i enkeltfiskenheter ble samlet i et kar for smitte, mens fisk i store kar ble smittet i de respektive karene.

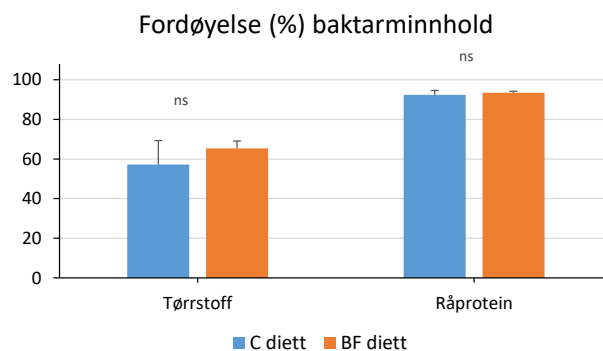
Fisken ble smittet med 35 lakselus-koepoditter per fisk i ca 30 minutter. Fisk ble tilbakeført til enkeltfiskerhetene og føret i ytterligere 2 uker etter smitten. Forsøket ble avsluttet i begynnelsen av september 2018 ved at all fisk ble talt for lus, individveid og all fisk fra enkeltfiskerhetene og et utvalg av 9 fisk per samlekar ble tatt prøver av på samme måte som før lusesmitte.

Laksen vokste fra 88 g ved start til et gjennomsnitt på 134 g etter 6 uker i forsøk. Det ble ikke observert signifikante effekter av diettene på vekst i forsøket. Etter ytterligere 2 uker i forsøk med lusesmitte vokste fisk til i gjennomsnitt 152 g i enkeltfiskerhetene og 174 g i samlekarene. Det var heller ikke her observert signifikante forskjeller mellom diettgruppene, men en lavere vekst i enkeltfiskerhetene sammenlignet med fisk i samlekar (Figur 3).



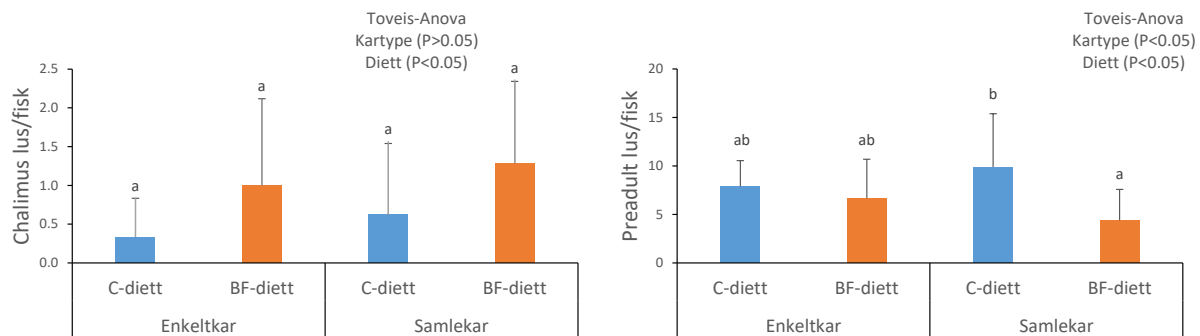
Figur 3 Gjennomsnitts vekt og daglig vekstrate hos postsmolt laks tildelt kontrolldiett (C) og diett med mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) i en fôringsperiode på 45 dager etterfulgt av koepodittsmitte og vektmålinger for fisk i enkeltfiskerheter (n=9) eller samlekar (n=21).

Det var ingen signifikant forskjell i fordøyelse av tørrstoff og råprotein mellom diettgruppene (Figur 4).



Figur 4 Apparent fordøyelse av tørrstoff og råprotein hos postsmolt laks tildelt kontrolldiett (C) og diett med mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) i en fôringsperiode på 45 dager (n=3; samleprøve av strøket baktarminnhold fra 10 fisk per kar). Ns = ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene.

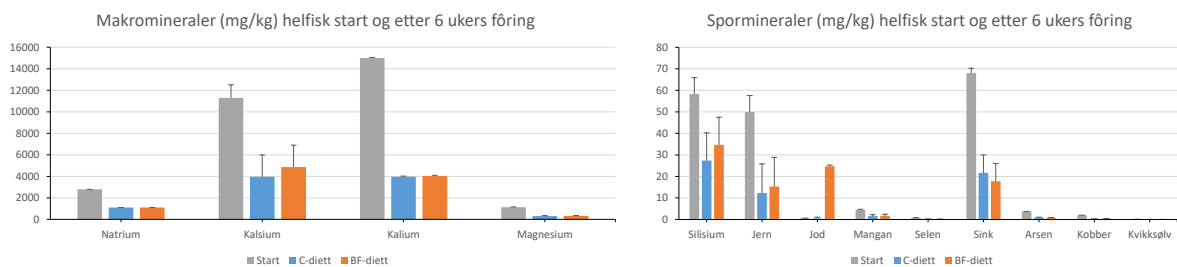
Det ble kun observert lakselus ved stadiene chalimus og preadulte ved uttaket to uker etter koepodittsmitten for fisk i både enkeltfiskerhetene og samlekar. Det ble talt et lite antall lakselus på stadiet chalimus (0-3 per individ), og dermed ikke mulig å konkludere en dietteffekt ut fra disse resultatene. Det ble derimot talt 1-21 individ av lakselus på det preadulte stadiet per fisk, med et signifikant høyere antall lus på fisk føret kontrollføret sammenlignet med fisk føret forsøksføret i samlekarene. Denne effekten ble ikke observert i enkeltfiskerhetene (Figur 5).



Figur 5 Gjennomsnitt antall lakselus av stadiene chalimus og preadult på postsmolt laks tildelt kontrolldiett (C) og diett med mineralingrediensen Biofeed Forte (BF) 2 uker etter kopepodittsmitte for fisk i enkeltfiskenheter (n=9) eller samlekar (n=21).

#### 4.2.1 Mineralanalyser

Analyser av mineraler i helfisk tilsier at det var en endring i mineralsammensetning fra start av forsøket til etter fôringsperioden på 6 uker. Noe kan antagelig også tilskrives at fisken var nylig smoltifisert før forsøksperioden, noe en vet påvirker mineralmetabolismen, i tillegg til forskjeller mellom det kommersielle fôret brukt før forsøksstart og forsøksfôrene produsert ved Nofima. Dette gjaldt særlig mineralene kalsium, kalium, silisium, jern og sink, men også tendenser hos flere mineraler. Det høye innholdet av jod i forsøksfôret med BF var reflektert i innholdet i helfiskprøvene (Figur 6).



Figur 6 Mineralinnhold helfisk-laks ved start og etter 6 ukers fôring av kontrolldiett (C) og diett med mineralingrediensen Biofeed Forte (BF).

#### 4.2.2 Histologiske analyser av laksens skinn og tarm

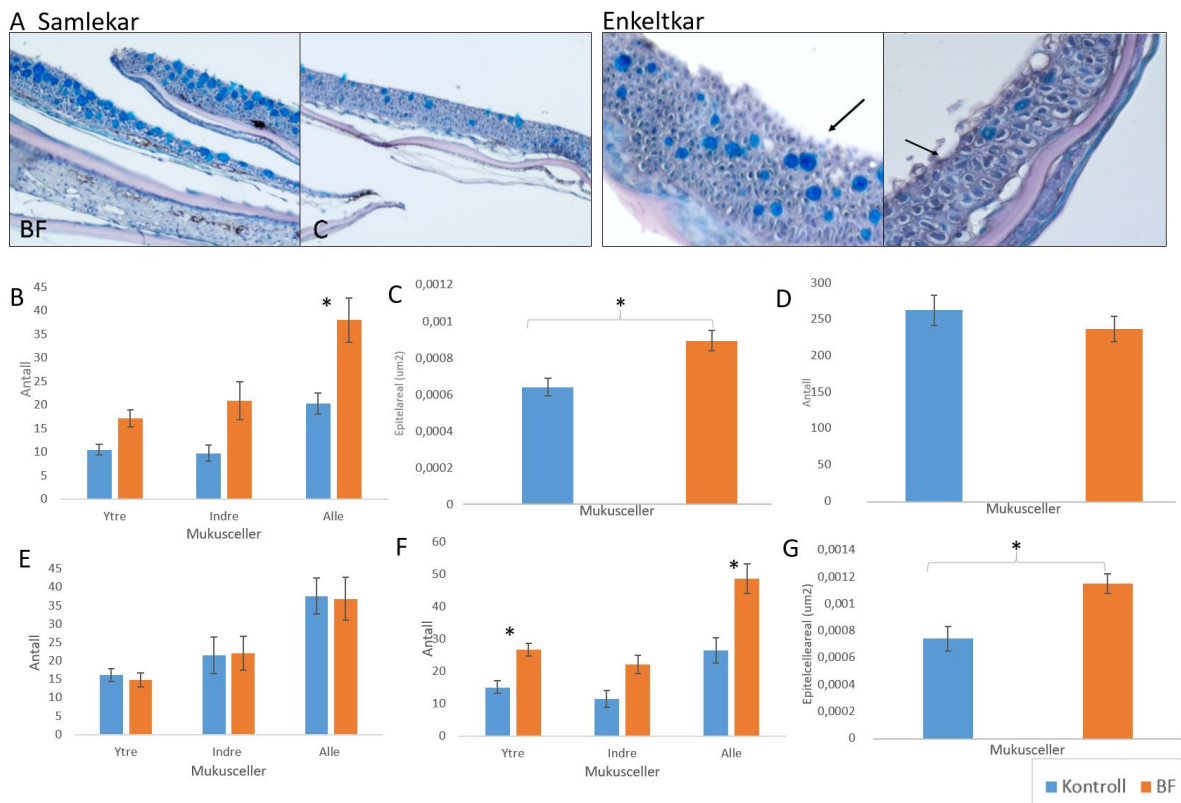
Histologiske analyser ble utført på følgende prøver:

- 1 Forsøksstart (dag 0); skinn, gjeller og tarm av 15 fisk (Quantidoc).
- 2 Fôringsforsøket (dag 45); skinn, gjeller, tarm av 15 fisk per diett (Quantidoc og Nofima).
- 3 Lusesmitte i enkeltkar (dag 60); skinn av 9 fisk per diett (Quantidoc og Nofima).
- 4 Lusesmitte i samlekar (dag 60); skinn av 9 fisk per diett (Quantidoc og Nofima).

Skinprøver ble tatt i et standardisert område på dorsal side under ryggfinner. Skinnets morfologi er studert tangentielt (1-2cm<sup>2</sup> av vevets overflate) av Quantidoc og i transvers retning av Nofima. En sammenligner dermed to teknikker for å kartlegge slimcelle distribusjon både over fiskens skinnareal og nedover i skinnlaget, henholdsvis. Det ble totalt tatt prøver av 81 fisk. Av disse ble det hos Quantidoc foretatt 261 kvantitative analyser av vev (dorsalskinn, fortarm, baktarm, gjelle filament, gjelle lameller) for å undersøke slimcelledynamikk med henhold til størrelse (µm<sup>2</sup>), prosentandel av epitel med

slimceller (tetthet i %) og barrierestatus (kombinasjonen). Samsvarende effekt av BF ingrediensen ble observert ved de to teknikkene.

I de transversale analysene av skinn ble alle lagene av skinn (epidermis, underhuden, og fettvevet) målt og slimcellene i skinn ble talt opp og differensiert på bakgrunn av plasseringen i epidermis (Figur 7a). Fisk fôret med mineralingrediensen Biofeed Forte hadde en tendens til flere slimceller ytterst i skinn, mens det ikke ble observert forskjell på antall slimceller i indre del av epidermis sammenlignet med fisk fôret med kontrollfôret. Totalt antall slimceller uavhengig av plassering var høyere i skinn fra BF-gruppen sammenlignet med kontroll (Figur 7). Denne effekten var tilstede både etter fôringsforsøket og etter lusesmitte. Etter lusesmitte var det kun målbare forskjeller på fisk i samlekar, mens det ikke ble observert forskjeller i antall slimceller mellom gruppene på fisk i enkeltkar. Generelt hadde fisk i enkeltkar en mer rufsete ytre overflate på skinn, med noe som ser ut til å være tomme slimceller (Figur 7). Dette kan muligens være en stressrespons hvor slimcellene blir tømt hyppig. Det ble ikke funnet noen forskjeller i tykkelsen til fettlaget, epitellaget eller underhuden i noen av gruppene. Skinn ble også scoret etter Nofimas histologistandard for skinn. BF-gruppen fikk en høyere mukusscore, mens skinn fra kontrollfisk hadde en tendens til mer rufsete ytre overflate og løsere bindevev rundt skjellommene.



**Figur 7** Mukusceller i skinn (A) Transverse snitt av skinn. Representative bilder av lakseskinn etter fôringsforsøket, Biofeed Forte (BF) og kontroll (C) fôr, i samlekar. Rufsete ytre epidermis og tomme mukusceller ble funnet hos fisk i enkeltkar (pil). (B) Totalt antall slimceller i lakseskinn, samt differensiering mellom ytre og indre plassering i epitellaget, 45 dager med fôring (C) Mukusceller per epitellareal 45 dager med fôring (D) Antall mukusceller i tarm, 45 dager med fôring (E) Totalt antall slimceller i lakseskinn, samt differensiering mellom ytre og indre plassering i eitellaget, smitte enkeltkar (F) Slimceller i lakseskinn, samt differensiering mellom ytre og indre plassering i eitellaget, smitte samlekar (G) Mukusceller per epitellareal, samlekar. Stjerne = signifikante forskjeller linear mixed effect (lme) modell ( $P < 0,05$ ) (F) og enveis ANOVA ( $p < 0,05$ ), error bars (SEM) (B og G). Alle prøvene er tatt fra ett standardisert område på fisken uten lus.



Tangentielle analyser av slimcellene i skinnet, utført av Quantidoc, viste tilsvarende effekt (Figur 8, Tabell 5). Ved forsøksstart (laks fôret med Skretting-diett) besto huden av 12,3 % slimceller med en snitt størrelse på  $179 \mu\text{m}^2$ , som ga en barrierestatus på 0,68 (Figur 8). Både antall og størrelsen på slimcellene minket signifikant på dag 45 for kontrollgruppen som hadde mindre slimceller ( $131 \mu\text{m}^2$ ) og lavere tetthet (6 %) ( $p=0,04$  for begge). Selv om BF-gruppen også viste nedgang i antall slimceller og størrelse på dag 45 var det ingen signifikante forskjeller fra dag 0. Denne nedgangen kan skyldes endringer i antall slimceller i skinnet i forbindelse med smoltifisering (O'Byrne-Ring mfl. 2003). Etter fôringsforsøket (dag 45) hadde BF-gruppen høyere slimcelletetthet enn kontrollgruppen (12 % vs. 6 %), noe som ga en høyere barrierestatus (0,67 vs. 0,44). Denne effekten fortsatte etter lusesmitte i samlekar, hvor BF-gruppen hadde signifikant høyere barrierestatus (0,78 vs. 0,53;  $p=0,02$ ), og en tendens til høyere tetthet av slimceller med omtrent lik størrelse (13 % vs. 8,5 %;  $p=0,08$ ). Det virker derfor som BF-fôret fører til flere slimceller i skinnet som trolig er med på å beskytte laksen mot lusepåslag.

Lusesmittet fisk i enkeltkar viste ingen signifikante forskjeller mellom diettene for hverken barrierestatus, slimcellestørrelse eller slimcelletetthet på skinnet. Det ble likevel observert en dynamikk i slimcellene fra dag 45 dag til dag 60 for kontrollgruppen i enkeltkar med en signifikant høyere tetthet (8 %) av litt større celler ( $142 \mu\text{m}^2$ ) og en signifikant økning av barrierestatus (0,5;  $p=0,04$ ). Med andre ord stimulerer lusen fiskens hud til en respons hos kontrollgruppen. Dette kan tyde på at enkeltkar stresser laksen og gir variable resultater på den enkelte fisk.

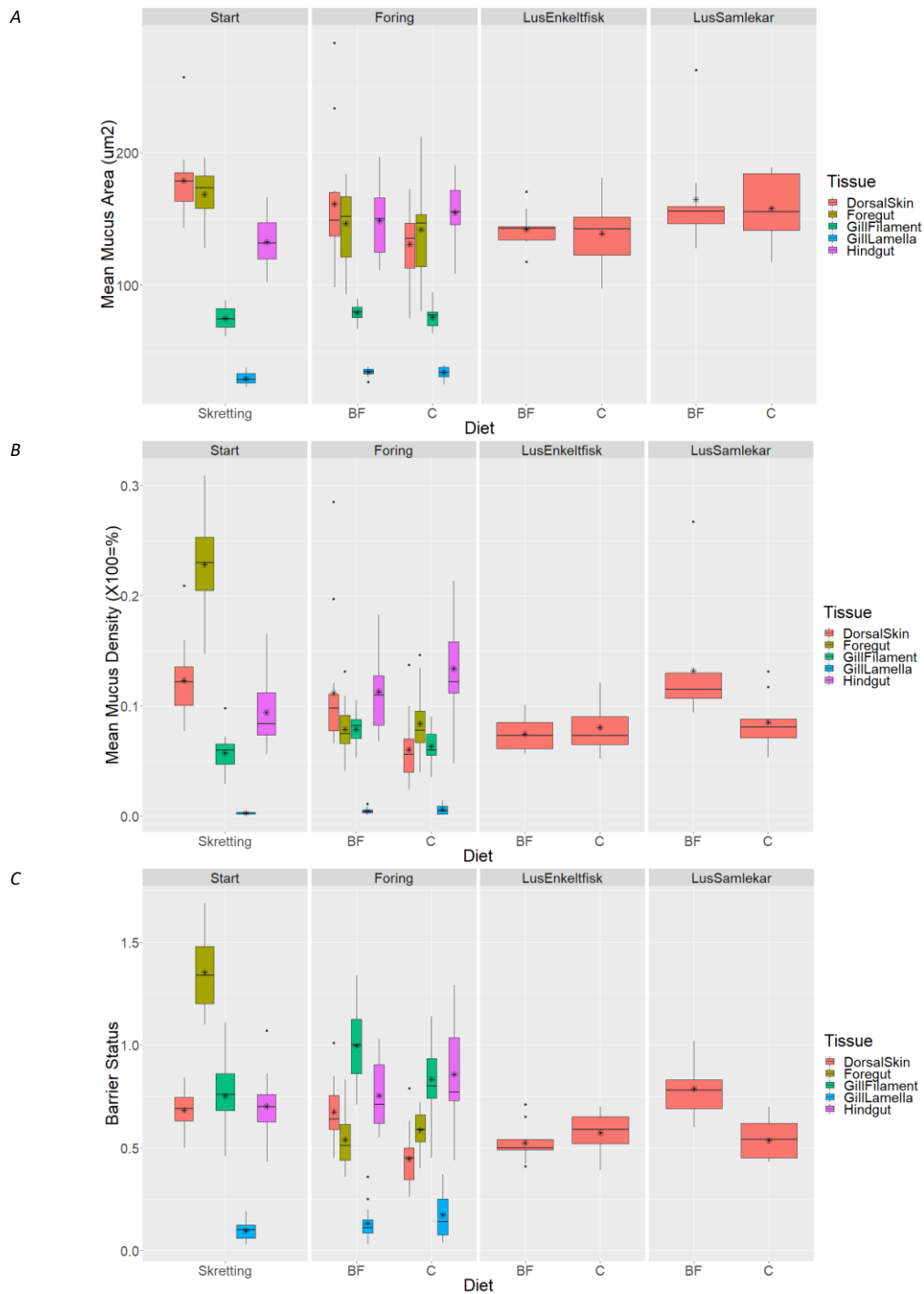
Histologiske analyser av baktarmen i transverse snitt hos Nofima viste ingen signifikante forskjeller i tarmmorfologi mellom fisk fôret med Biofeed Forte og kontrollfôr. Parametere som ble målt var antall slimceller, vakuolisering, folding og strukturen til lamina propria og stratum kompaktum. Quantidoc analyserte slimceller i både fortarm og baktarm. Disse vevene har forskjellig slimcelledynamikk og behandles derfor hver for seg. Ved forsøksstart hadde fortarmen  $168 \mu\text{m}^2$  store slimceller som utgjorde 23 % av epitelet noe som ga en barrierestatus på 1,35. Etter fôringsforsøket var celledettheten omtrent den samme, men for begge diettene ble fortarmens slimcelletetthet redusert signifikant (BF-fôr 7,8 %;  $p<0,01$ ; og kontroll-fôr 8,3 %;  $p<0,01$ ) og barrierestatusen var også signifikant redusert for begge ( $p<0,01$ ), mens cellene var bare litt mindre enn ved forsøksstart (omtrent  $142 \mu\text{m}^2$ ). En nedgang i størrelse og en nedgang i tetthet er ofte tegn til reduksjon i den medfødte immunrespons for slimlaget og slikt vises tidligere i fortarm enn i baktarm (Quantidoc unpub data). Dette tyder på at begge diettene kan stimulere slimbarrieren i fortarmen. Dette kan trolig påvirke veksten til fisken (Kousoulaki et. al. in prep).

Baktarmen startet ut med celler på  $132,6 \mu\text{m}^2$  som utgjorde 9 % av slimepitelet og ga en barrierestatus på 0,70. Etter 45 dager var det ingen signifikante forskjeller hverken mellom diettene eller som en følge av tid. Dette tyder på at alle tre diettene hadde lik virkning på baktarmen (Figur 8).

På gjellene var virkningen av fôret delt mellom den på lamellene (respiratorisk overflate) og filamentet. Oksygen skal ha kortest mulig avstand til blodceller i lamellene, som hadde veldig lave tettheter (<0,5 %) av små slimceller (<  $35 \mu\text{m}^2$ ), noen som tyder på at vannkvalitet var god i alle kar og for alle diettene og alle gjellenes var friske (Haddeland 2019).

For filamentet i gjellene var slimcellene både tettere (opptil 8 % volumet av epitelet) og større ( $75-80 \mu\text{m}^2$ ) og det var en tendens til at BF fôret ga større og tettere slimceller enn C-dietten ( $p=0,06$ ). Filamentet er koblet til utskillelse av ioner, metaller og mineraler (Dang et al. 2019; Leknes 2002) og

kan reflektere systemisk helse (Dang et al., in submission) så resultatene kan tyde på en oppregulering av metabolisme eller økt behov for utskillelse av metabolske stoffer over filamentets slimceller ved bruk av BF fôret.



**Figur 8** Tangentielt snitting av skinn, tarm og gjeller analyser av Quantidoc fra laks tildelt fôr med og uten tilsetning av mineralingrediensen Biofeed Forte (BF). A (øverst) Objektiv målinger av slimcellestørrelse i  $\mu\text{m}^2$ ; B (midten) volumetrisk tetthet av slimceller i slimepitel i % fyll og C (nederst) Barriere status for hvert vev. Måling av slimceller i lakseskinn (rødt), baktarm (illa), fortarm (brunt), gjellelameller (blått) og gjellefilament (grønt) ved forsøksstart (venstre,  $n=15$ ) og etter 45 dager fôring (venstre midt,  $n=15$  per diett), samt slimcelletetthet i skinn to uker etter kopepoditt-smitte for fisk i samlekar (høyre midt) og enkeltkar (høyre) tildelt de respektive diettene ( $n=9$  per diett).

Tabell 5 Oversikt over signifikante forskjeller i slimcelle respons i ulike vev av diett (C, BF) og tid (Dag 0, 45). Trender er markert med gult, mens signifikante forskjeller er markert med rød skrift. Fisk tatt ut dag 0 ved start er føret standard Skrettingdiett hos llab. Statistisk lm modell med signifikansnivå satt til 0.05)

	Dorsal skinn slimcelle status			P-verdi dag 0-45		P-verdi før dag 45
	Start	C-diett	BF-diett	Start – C	Start – BF	C – BF
Barrierestatus	0,682	0,446	0,675	0,1074	0,8889	0,0130
Slimcelle-areal ( $\mu\text{m}^2$ )	178,9	131,0	161,1	0,0360	0,6426	0,1719
Slimcelletetthet ( $\times 100/\mu\text{m}$ )	0,123	0,0603	0,112	0,0368	0,7262	0,0457

	Baktarm slimcelle status			P-verdi dag 0-45		P-verdi før dag 45
	Start	C-diett	BF-diett	Start – C	Start – BF	C – BF
Barrierestatus	0,701	0,856	0,753	0,4028	0,4804	0,2881
Slimcelle-areal ( $\mu\text{m}^2$ )	132,6	154,7	148,5	0,1645	0,3937	0,5822
Slimcelletetthet ( $\times 100/\mu\text{m}$ )	0,094	0,1338	0,1128	0,2314	0,3889	0,2843

	Fortarm slimcelle status			P-verdi Dag 0-45		P-verdi før dag 45
	Start	C-diett	BF-diett	Start – C	Start – BF	C – BF
Barrierestatus	1,352	0,586	0,539	0,0045	0,0050	0,3325
Slimcelle-areal ( $\mu\text{m}^2$ )	168,3	141,9	147,0	0,1431	0,2203	0,7183
Slimcelletetthet ( $\times 100/\mu\text{m}$ )	0,228	0,083	0,078	0,0092	0,0078	0,6341

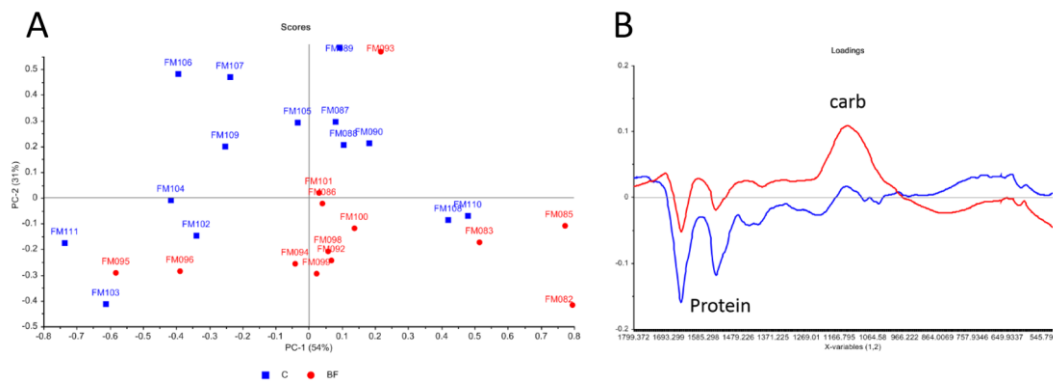
	Gjellelameller slimcelle status			P-verdi dag 0-45		P-verdi før dag 45
	Start	C-diett	BF-diett	Start – C	Start – BF	C – BF
Barrierestatus	0,096	0,174	0,132	0,5358	0,5816	0,5337
Slimcelle-areal ( $\mu\text{m}^2$ )	29,75	34,39	34,62	0,3753	0,0767	0,9254
Slimcelletetthet ( $\times 100/\mu\text{m}$ )	0,003	0,006	0,0046	0,5031	0,4306	0,5686

	Gjelle filamenter slimcelle status			P-verdi Dag 0-45		P-verdi før Dag 45
	Start	C-diett	BF-diett	Start – C	Start - BF	C - BF
Barrierestatus	0,752	0,833	0,997	0,3938	0,0645	0,0657
Slimcelle-areal ( $\mu\text{m}^2$ )	75,17	75,84	79,24	0,8786	0,2966	0,2766
Slimcelletetthet ( $\times 100/\mu\text{m}$ )	0,057	0,063	0,0787	0,4209	0,0637	0,0407

#### 4.2.3 Spektroskopiske analyser av mukus

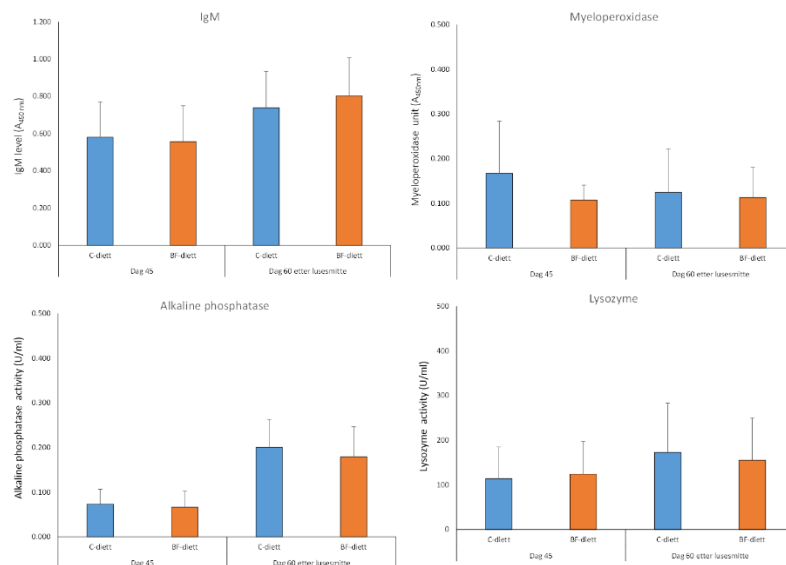
En pilotanalyse ble utført med IR- og fluorescens spektroskopi for å detektere evt. endringer i mukus som følge av diettene. IR-Spekteret antyder at det er forskjell i absorbansnivået i karbohydrat- og proteinfraksjonen, med hovedforskjell i karbohydratspekteret (Figur 9). De observerte endringene kan skyldes at dietten påvirker proteoglykanstrukturer i slimet. Disse resultatene kan være av interesse dersom de kan vises i flere uavhengige forsøk.



Figur 9 IR-spektroskopi av mukusgelen. (A) PCA plot over karbohydratspekteret, hvert punkt representerer en prøve, blå kontrollfôr, rød Biofeed Forte. (B) Loading plot som indikerer protein/karbohydrat informasjonen i spektrene.

#### 4.2.4 ELISA av immunparametre i mukus

Mukus fra fisk ble samlet inn etter fôringsforsøket og etter kopodittsesmitte. ELISA ble kjørt på immunparameterne IgM, myeloperoxidase, alkaline phosphatase og lysozyme. Nivåene av alkaline phosphatase økte etter lusesmitte i begge grupper. Det er kjent at den enzymatiske aktiviteten i mukus øker ved kopepodittsmitte (Ross mfl. 2000), ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom fôringsgruppene (Figur 10).



Figur 10 ELISA utført på immunparametre i slimlaget etter 45 dager fôring og ytterligere fôring til dag 60, 2 uker etter kopepodittsmitte.

#### 4.2.5 Genespresjonsanalyser med microarray

Analyser av genuttrykk ble utført med Nofima's 15 k microarray SIQ6 for Atlantisk laks. Analysene ble utført på følgende forsøk og organer:

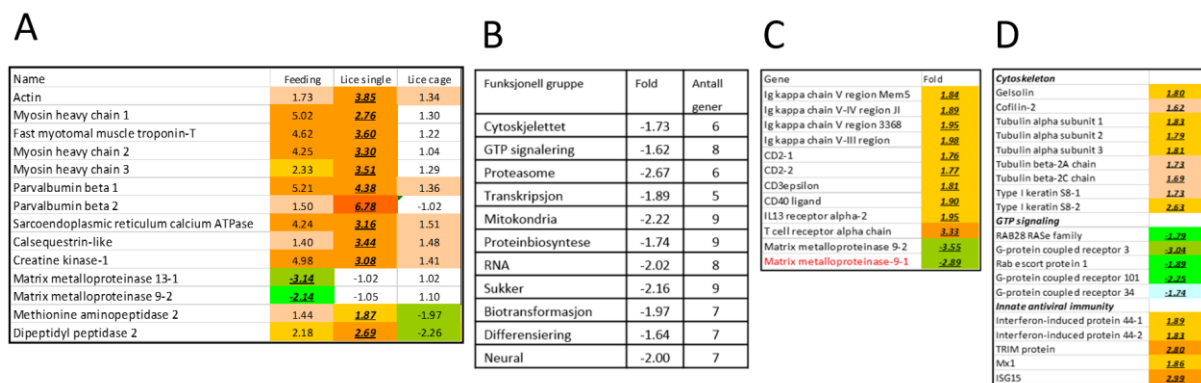
- 1 Etter fôringsforsøket (skinn og gjelle), 24 array.
- 2 Lusesmitte i enkeltkar (skinn og gjelle), 24 array.
- 3 Lus samlekar (skinn), 12 array.

Transkripsjonsanalysene fant små, men konsistente effekter av BF-dietten på skinn og gjelle etter fôringsforsøket dag 45, samt etter smitteforsøk med lus (Tabell 6). De største forskjellene ble observert i gjelle med 431 differensielt utrykte gener (DEG) mot slutten av fôringsforsøket, dag 45. Effekten av BF-fôr mot kontrollgruppen i skinn var liten, og 45 DEG etter fôringsforsøket, og 47 og 38 DEG etter henholdsvis lusesmitte i enkeltkar og i samlekar. Når genuttrykksendringene er små er det ofte vanskelig å finne konsistente trender og effekter fra tilfeldige svingninger. I dette eksperimentet ble flere gener med lignende funksjoner påvirket av dietten.

Tabell 6 Oversikt over forsøk, vevstype og antall differensielt utrykte gener (DEG)

Fôringsforsøk	Lusesmitte
Skinn (45)	Fôreffekt samlekar skinn (38)
Gjelle (431)	Fôreffekt enkeltkar skinn (47)
	Fôreffekt gjelle (101)
	Samlekar skinn smitte (123)
	Enkeltkar skinn smitte (353)
	Enkeltkar gjelle smitte (69)

Effekten av BF-dietten etter fôringsforsøket var bl.a. lavere uttrykk av *matrix metalloproteinase 9* og *13* (*mmp 9* og *mmp 13*) (Figur 11). Disse kollagen nedbrytende enzymene spiller en viktig rolle i betennelse og stressresponser i lakseskinn. Høyere uttrykk av disse enzymene kan trolig knyttes opp mot forsinket sårheling i Atlantisk laks (Sveen mfl. 2018). Nedregulering av *mmp9* og *13* ble ikke observert etter lusesmitte.



Figur 11 (A). Effekten of BF-dietten på genuttrykk i skinn. Data are foldchange mot kontroll, DEG er indikerte med fet skrift i kursiv. Differensielt utrykte gener (DEG) ble valgt etter kriteriet > 1,6 fold change,  $p < 0,05$ . (B) Funksjonelle grupper av gener som er nedregulert i gjelle etter fôringsforsøket. (C) Effekten av BF-dietten på genuttrykk i gjelle etter fôringsforsøket og (D) Effekten av BF-dietten på genuttrykk i gjelle etter lusesmitte. Dataene er foldchange til kontroll, alle forskjellene er signifikante. Differensielt utrykte gener (DEG) ble valgt etter kriteriet > 1,6 fold change, ( $p < 0,05$ ).

Effekten av BF-dietten var størst etter lusesmitte i enkeltkar, men en lignende tendens ble også funnet etter fôringsforsøket. Etter lusesmitte i enkeltkar aktiverte BF-fôret en gruppe gener som koder for myofiberproteiner, de viktigste strukturelle bestanddelene (actin, myosiner og troponin T), kalsiumtransportere (sarkoplasmisk ATPase) og lagringsproteiner (parvalbuminer og calsequestrin) og kreatinkinase (Figur 11), det viktigste enzym av energi metabolisme i muskel. Vi har vist i tidligere studier at genuttrykket av myofiber-proteiner endrer seg spesielt i forbindelse med luseinfeksjoner

(Krasnov mfl. 2012; Tadiso mfl. 2011). Fysiologiske konsekvenser av disse effektene er noe uklare. Skinnen til fisk i enkeltkar hadde også en rufsete yte barrierekant (Figur 7), noe som kan tyde på en stressrespons/slitasje i skinnets ytre lag. Dette kan muligens forklare noe av genuttrykket knyttet til oppregulering av myofiberproteiner i denne gruppen. Myofiberproteiner i fiskeskinn kan blant annet knyttes til mobilitet av keratocytter (skinnceller) (Richardson mfl. 2016), og bevegelse hos disse cellene trigges blant annet av hudskader. Myofiberproteiner er også knyttet til muskelkontraksjon og sårheling. Det var heller ingen observerte forskjeller i antall lus mellom fôrgruppene i enkeltkar. Det kan derfor tyde på at enkeltkarforsøk utsetter fisken for en type stressrespons som påvirker både fisken og dermed forsøket, med redusert fôrintak som en kjent konsekvens (Hamre & Nilsen, 2011).

Prosjektet ga videre en unik mulighet til å sammenligne smitte modellen for lus i enkeltkar og smitte modell i samlekare, med langt flere gener oppregulert etter lusesmitte i enkeltkar (Tabell 6). Nesten halvparten av disse genene (93 av 196) tilhører fire funksjonelle grupper: cellulært stress (11 heat shock proteiner og cognater), muskelkontraksjon/celle migrasjon (45 gener for myofiber proteiner, kalsiumenzym, sukker og keratin metabolisme), andre metabolske funksjoner (28 gener) og dannelse av ekstracellulær matrix (12 gener), data ikke vist. Korrelasjonen var moderat (Pearson  $r = 0,61$ ), hovedsakelig fordi flere gener var signifikante i enkeltkar-oppsettet. Et bemerkelsesverdig trekk ved disse forsøkene var nesten fullstendig fravær av immunresponser.

#### 4.2.6 Effekten av fôrforsøket, lusesmitte på histologi og transkripsjon i gjeller

Gjellene utgjør mer enn 50 % av fiskens overflateareal og har to distinkte deler: filament som står for ioneutskillelse mm og lameller som er det respiratoriske overflate. Filamentet viser vanligvis større celler i høyere tetthet enn lamellene. På Skretting diett dag 0 var **lamellene** fylt med 0,3 % slimceller av ca  $30 \mu\text{m}^2$  størrelse og en barrierestatus på 0,096. På dag 45 ga BF-dietten en cellestørrelse som tenderer til å være større sammenlignet med dag 0 ( $34,6 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0,08$ ), mens det var ingen signifikante endringer i kontroll-fôret. Mellom diettgruppene var det ingen forskjell på lamellene på Dag 45. På **filamentet** var det ved dag 0 slimceller på  $75 \mu\text{m}^2$  som utgjorde 5,7 % av epitellaget, og ga en samlet barrierestatus på 0,75. På dag 45 hadde BF-fôret en tendens til både flere celler (7,9 % tetthet;  $p=0,06$ ) og en økning i barrierestatus (0,997;  $p=0,06$ ) for celler av omtrent samme størrelse som under kontroll- og skrettingfôret ( $79 \mu\text{m}^2$ ). BF-fôret ga signifikant høyere tetthet av slimceller på filamentet sammenlignet med kontroldietten på dag 45 (7,9 % vs 6,3 %;  $p=0,04$ ). Dette kan tyde på en oppregulering av utskillelse, da filament slimcellestørrelse og -tetthet kan reflektere miljøforurensing og størrelsen er sterkt korrelert med leverens toksiske blynivå (Dang et al., 2019).

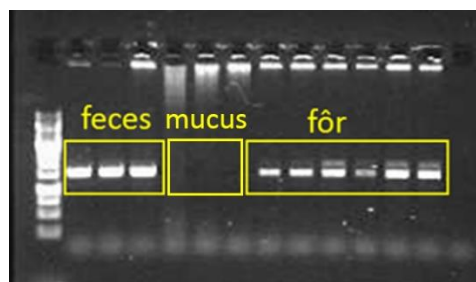
Microarray analysene viste stor effekt av BF-fôret i gjellene med 431 DEG etter fôringsforsøket. Etter fôringsforsøket var nedregulering av gener en tydelig respons til BF-dietten, med 324 og 107 gener med henholdsvis lavere og høyere uttrykk. Konsistent nedregulering ble vist for flere funksjonelle grupper relatert grunnleggende cellulære prosesser (Figur 14a). Det er videre verdt å nevne en liten, men konsistent økning av transkripsjon av B- og T-cellespesifikke gener og nedregulering av to gener for *mmp9*.

Effekten av lusesmitte på genuttrykket i gjelle var liten, med bare 69 DEG. I motsetning til i skinnen, spesielt etter smitte i enkeltkar, så vi ikke klare endringer i funksjonelle grupper uttrykt i gjellene. Noen funn, som oppregulering av *mmp9* og nedregulering av *iNOS* kan være av interesse hvis det bekreftes i fremtidige studier. Med hensyn til forskjeller mellom BF- og kontroldietten ble det funnet tre

funksjonelle grupper (med fem eller flere gener), hvor alle genene var enten opp- (cytoskjelett og medfødt antiviral immunitet) eller ned (signalering via GTP) regulert (Figur 11).

#### 4.2.7 Mikrobiotaanalyser

DNA ble isolert fra ett lite sett med prøver av slim og innhold fra baktarm av fisk ved forsøksstart og etter 45 dager fôring av de respektive diettene (kontroll og BF). DNA ble også isolert fra forsøksfôr og kommersielt fôr benyttet før forsøksstart. Noen av prøvene er testet med bakterieprimere (PCR) (Figur 12). Bakterielt DNA er å finne i faeces. Det er veldig lite bakterielt DNA i mucus fra tarm (de tre neste brønnene). Det er mye bakterielt DNA i fôrpelletene. I og med at det er mye bakterielt DNA fra fôret, vil DNAet som kommer opp i fra tarminnholdet i stor grad reflektere fôret. Derfor vil forsøksfisken mest sannsynlig gjenspeile kontrollen, og det blir vanskelig å si noe om forskjellen mellom fôringsgruppene.



Figur 12 Gel-plot som viser PCR-produkt etter amplifisering med bakterieprimere, i faeces, mucus og i fôrkomponenter.

#### 4.2.8 Proteomikkanalyser

Proteomikkanalyser ble utført på slimprøver (n=6 per diett) fra skinn etter fôringsforsøket. Det ble i snitt identifisert 1600 proteiner per prøve, blant disse proteinene var 158 påvirket av dietten. Gene ontology (GO) anrikninger ble utført for å få en oversikt over prosesser som var påvirket av fôret. GO-anrikningene ble utført separat for biologisk prosesser (BP), cellulær komponent (CC) og molekylær funksjoner (MF). De anrikede klassene var innenfor tre områder metabolisme, cytoskjelett og proteinturnover (Tabell 7).

Tabell 7 Proteomikkanalyser av skinn mukus etter fôringsforsøket, Kontroll vs BF, ( $p < 0.05$ )

GO-anrikning	GO-term	Funksjon
Molekylær funksjon	Microtubule motor activity	Cytoskjelett
	Oxidoreductase activity, CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor.	Metabolisme
	Metalloaminopeptidase activity	Protein turnover
Biologisk prosess	Microtubule-based movement	Cytoskjelett
Cellulære komponenter	Proteasome kompleks	Protein turnover

De differensiert utrykte proteinene gjenspeilet i stor grad GO-resultatene og proteinene kan i all hovedsak knyttes til metabolisme, cytoskjelettfunksjoner og protein turnover (Figur 13). Blant de differensiert utrykt proteinene kan elleve knyttes direkte til «Ubiquitin Proteasome Pathway», denne reaksjonsveien har en sentral rolle i selektiv nedbrytning og turnover av intracellulære proteiner. To

gener involvert i denne reaksjonsveien var også differensiert uttrykt på gennivå i de utførte microarrayanalysene.

**A**

Nedregulerte proteiner	FC	Oppregulerte proteiner	FC
<b>Metabolisme</b>		<b>Metabolisme</b>	
78 kDa glucose-regulated protein	-0,8	L-lactate dehydrogenase B chain	1,85
enolase-like,	-0,8	<b>Cytoskjelett</b>	1,41
fructose-bisphosphate aldolase A	-0,8	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	1,44
<b>Cytoskjelett</b>		envoplakin-like	
Moesin	-0,9	spectrin alpha, non-erythrocytic 1	1,51
<b>Protein turnover</b>	-0,8	<b>Protein turnover</b>	2,62
protein disulfide-isomerase A3-like	-0,6	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	2,05
gelsolin-like	-0,8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13-like	
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	-0,7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	1,21
60S ribosomal protein L6	-0,7	T-complex protein 1 subunit delta	3,67
<b>Annet</b>		bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase-like	1,32
cytolysin RTX-A-like		<b>Annet</b>	1,32
14-3-3 protein beta/alpha-1-like (ukjent)	-0,7	protein FAM111A-like	

**B**

Ubiquitin Proteasome Pathway	p.value	m.diff
proteasome 26S subunit, non-ATPase 8	0,05	-0,9
proteasome subunit beta type-7-like	0,01	-0,9
proteasome subunit alpha type-2	0,03	-1,1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	0,00	2,8
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13-like	0,00	3,7
proteasome-associated protein ECM29 homolog	0,05	1,1
Caspase-3	0,02	-1,5
ubiquitin fold modifier 1	0,00	-1,1
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial-like	0,03	-0,6
ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4	0,00	1,9
cullin-9-like	0,02	2,5

Figur 13 Resultater fra proteomikkanalyser av mukus. (A) Differensiert uttrykt proteiner i mukus fra skinn, figuren viser de 10 proteinene som var mest påvirket av fôret (opp og ned regulert) (B) Differensiert uttrykte proteiner involvert i «Ubiquitin Proteasome Pathway».

#### 4.2.9 Oppsummering av resultater fra Ilab-forsøk

Mineralingrediens variant av Biofeed Forte ble valgt etter *in vitro* forsøk ved Ilab. Den utvalgte Biofeed-varianten ble feilprodusert av Pharmatech, og inneholdt et forhøyet innhold av jod som førte til fôr med jodnivå over øvre tillate grenseverdi for fullfôr. Feil ble oppdaget av Nofima etter mineralanalyser av helfisk høsten 2018, på et tidspunkt da en rekke analyser allerede var gjennomført. Eventuelle effekter av Biofeed Forte ingrediensen er dermed ikke sammenlignbar med ingrediensen som brukes kommersielt, da effekten kan ikke spesifikt tilskrives jod eller andre komponenter i ingrediensen. Basert på resultatene knyttet til fôringsforsøket og smitteforsøk med kopepoditter kan vi da trekke følgende slutninger:

- 1 Mineralinnholdet i helfisk gjenspeiler mineralinnholdet i fôret, særlig med tanke på jod
- 2 BF-fôr har signifikant effekt på antall lus på preadult stadiet i karforsøk.
- 3 BF-fôret fører til økt antall mukusceller i det ytre laget av fiskens epidermis etter lusesmitte
- 4 BF-fôret fører til signifikant økt tetthet av slimceller i skinnet og en signifikant høyere barrierestatus i skinnet ift C-dietten hos smittede laks i samle kar etter 45 dager på fôret. Begge diett-gruppene hadde en nedgang i slimcellestørrelse ift til start men cellene var signifikant mindre kun for C-dietten.
- 5 Volumet av slimceller i fortarmen (%) viste en signifikant nedgang og dermed en lavere barrierestatus fra start til dag 45 for begge fôrgruppene ( $p < 0,009$ ).
- 6 BF-fôret ga en trend til økning av slimcellenstørrelse ift Dag 0 i den respiratoriske del av gjellene (lameller) men dette var innenfor benchmarket mål for friske gjeller (Haddeland et al. In prep).



- 7 BF-fôret virket på gjelles filamentdel ved å gi større slimceller i høyere tetthet, noe som førte til en tendens mot økt barrierestatus ift Dag 0 ( $p=0,0645$ ) og ift C-dietten ( $p=0,0657$ ). BF-fôret ga signifikant høyere slimcelletetthet i filament enn gjorde C-dietten ( $p=0,0407$ ).
- 8 BF- og kontrollfôret hadde ulik påvirkning på skinn og slimlaget til fisken etter lusesmitte i enkeltkar og samlekar. I enkeltkar viste kontroll-fôret laks en usignifikant høyere tetthet av slimceller i skinnet, og ingen forskjell mellom diettgruppene. I samlekar var det flere signifikante forskjeller: BF-fôret ga signifikant høyere barrierestatus, og tendens til høyere tetthet av omtrent like store celler (13 % vs 8,5 %;  $p=0,0812$ ) sammenlignet med kontroll-fôret fisk.
- 9 BF-fôret påvirket proteinuttrykket i mukusgelen, i hovedsak knyttet til metabolisme, cytoskjelettkomponenter og protein-turnover. BF-fôret ser ut til å endre forholdet mellom sukker og proteiner som er tilstede i mukusgelen.
- 10 BF-fôret påvirker transkripsjon av gener i skinn og gjelle, med størst effekten i gjelle.

Underarter av stillehavslaks, slik som *Oncorhynchus kisutch* er resistente mot lakselus, og resistensen regnes å være knyttet til aktiviteten til hudcellene og immunresponser i skinnet. Det er derfor nærliggende å anta, gitt mindre lusepåslag, at BF-fôret endrer immunresponsen i laksens skinn. Basert på de utførte analysene (microarray og ELISA) fant vi ingen forskjeller i immunresponsen hos laks fôret med BF-fôr sammenlignet med kontrolldietten etter lusesmitte. Det bør likevel nevnes at skinnprøvene ble tatt i ett standardisert område, uten lus, og den systemiske responsen i skinnet kan avvike fra lokale responser med lusepåslag. Det var imidlertid en tendens til nedregulering av gener med immunfunksjoner som følge av BF-dietten etter fôringsforsøket.

Både transvers og tangentiell morfologi av laksens skinn viste påvirkning på slimceller ved fôring med BF etter 45 dager og ved lusesmitte (dag 45-60) under normale oppdrettsbetingelser (samlekar). Transvers morfologi viste en spesifikk økning i antall slimceller i det ytterste hudlaget hos BF-gruppen, med lignende respons både før og etter lusesmitte. Tilsvarende, tangentielle analyser av laksens skinn viste at fisk tildelt BF-dietten ga signifikant høyere barrierestatus, og tendens til høyere tetthet av omtrent like store slimceller sammenligner med kontrolldietten. Hva som fører til det økte antallet med mukusceller er ukjent. Tidligere studier har knyttet økt antall ytre mukusceller til høye kortisolnivåer (Iger mfl. 1995). Videre vet vi at hos mennesker er kaliumjodid (en av forbindelsene i BF-fôret) brukt i hostemedisin. Kaliumjodid virker som en expectorant og fører til økt sekresjon av respiratoriske væsker som resulterer i endret viskoelastisitet og mukusekresjon (Rubin, 2014). Med et økning i skinnets slimceller er det nærliggende å tro at BF-gruppens respons i skinnet førte til produksjon av mer slim/mucus til beskyttelse mot lusepåslag, sammenlignet med observasjonen hos kontrollfisken med færre slimceller og høyere lusepåslag under normale oppdrettsbetingelser.

En hypotese kan da være at mineralinnholdet i fôret påvirker produksjonen og egenskapene til skinnets slim (mukusgel). Vi observerte blant annet ved hjelp av IR-spektroskopi at fisk fôret med BF-fôr hadde en tendens til endret protein- og karbohydratfraksjon i mukusgelen sammenlignet med kontrollen. Proteinene som danner mukusgelen er store glykosylerte proteiner, og glykosyleringsmønsteret av disse proteinene endrer seg under en rekke ulike forhold, og glykosyleringsmønstrene påvirker egenskapene til slimet (Jin mfl. 2015; Padra mfl. 2014). Transkripsjonsanalysene etter fôringsforsøket viste også en endring i funksjonelle grupper tilknyttet sukkermetabolisme, denne effekten var størst i gjelle. Det kan derfor være av interesse å se videre på BF-fôret og hvordan det påvirker

glykosyleringsmønstrene til slimet. Proteomikkanalysene viste også at BF-fôret endrer proteinsammensetningen i mukusgelen fra skinn. I all hovedsak dreier det seg om proteiner knyttet til protein-turnover, generell metabolisme og cytoskjelett komponenter. Det virker derfor som at BF-fôret uavhengig av lusesmitte, påvirker både antall slimceller i skinnen og innholdet i slimcellene. Ved mukusanalyser i skinn må man imidlertid ta i betraktning at proteinene i mukusgelen kan også stamme fra lyserte hudceller. Uansett, det er mange faktorer som tyder på at BF-fôret endrer metabolske prosesser i skinnen til laks, men hvilke faktorer som bidrar til økt luseresistens er fremdeles uklart.

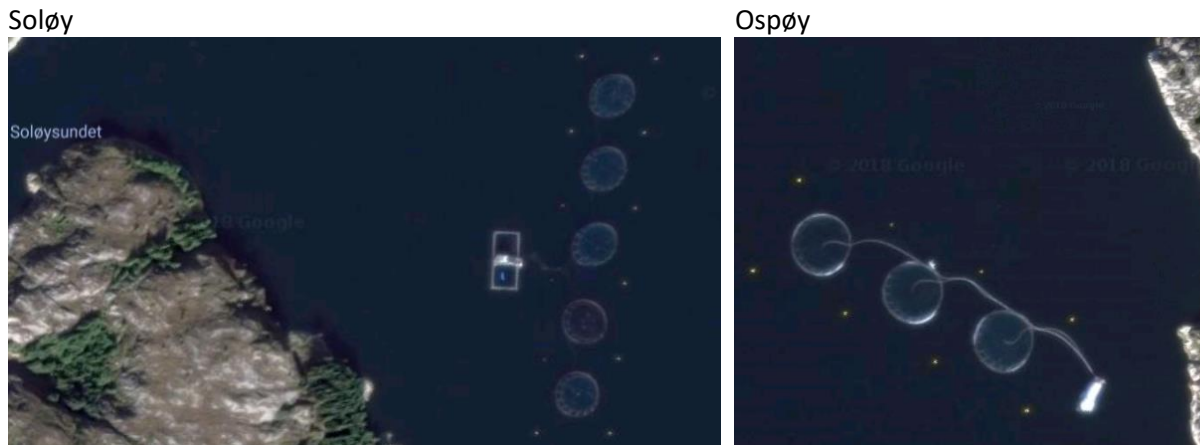
En siste hypotese er at overskuddsmineralene i fôret skilles ut av slimcellene. Dette støttes av målinger av gjellefilamentets slimceller der BF dietten viste signifikant høyere tetthet av slimceller i filamentet enn hos kontrolldietten på dag 45 ( $p=0,04$ ). Dette tyder på at ioneutskillelse er stimulert under BF-dietten. Dette kan støttes av Dang mfl. (2019) som i en økotoksikologistudie viste en sterk korrelasjon mellom størrelsen på disse cellene og leverens blynivå. Da regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble infisert med *Ichthyophthirius multifilii*, fant man mucosal immunoglobulin respons (t $\mu$ IgR) uttrykt markant i filamentet men bare litt ble funnet i lamellene (Xu et al., 2016). Gjellefilamentets slimceller har dermed en rolle i utskillelse av både ioner og tungmetaller. Dette tyder på at kroppssted er koblet til funksjon, med lamellar slimceller som beskytter det respiratoriske mens filamentslimceller representerer mer systemisk helse (Dang et al in submission; Pittman et al. 2013).

Det har videre blitt vist i ciklider (*Amphilophus citrinellus*), at radiomerket jod skilles ut gjennom mukuslaget i huden (Buckley mfl. 2010; Schütz & Barlow, 1997). Jod har som kjent antibakterielle egenskaper, og kan muligens også ha en anti-parasittisk effekt. Ettersom lus kun utsatt for mineralingredienser Lx5 og Lx8 ble paralyseret, kan det tyde på at fôringrediensene er direkte toksisk for lusen. Hvorvidt disse toksiske fôrkomponentene skilles ut av mukuscellene i skinn og gjelle er uklart. Flere forsøk er nødvendige for å avkrefte eller bekrefte disse hypotesene. Det hadde vært interessant å se videre på innholdet av jod (radiomerket) i slimlaget og glykoleringsmønstre til slimproteinene. Selv om grenseverdiene for mineraler i BF-fôret var over tillatte grenseverdier, kan fôr med tilsvarende innhold av jod benyttes i korte perioder eksperimentelt og dermed eventuelt bekrefte/avkrefte effekten av jod mot lakselus.

## 5 Prosjektgjennomføring og resultater AP 2: Laks mot regnbueørret

### 5.1 Storskalaforsøk Bømlo

Ved årsskiftet 2017-2018 ble det av Aller Aqua Norway AS planlagt forsøk ved Fylkesnes Fisk sine lokaliteter Soløy og Ospøy på Bømlo (Figur 14).



Figur 14 Fylkesnes Fisk AS sine lokaliteter Soløy og Ospøy på Bømlo.

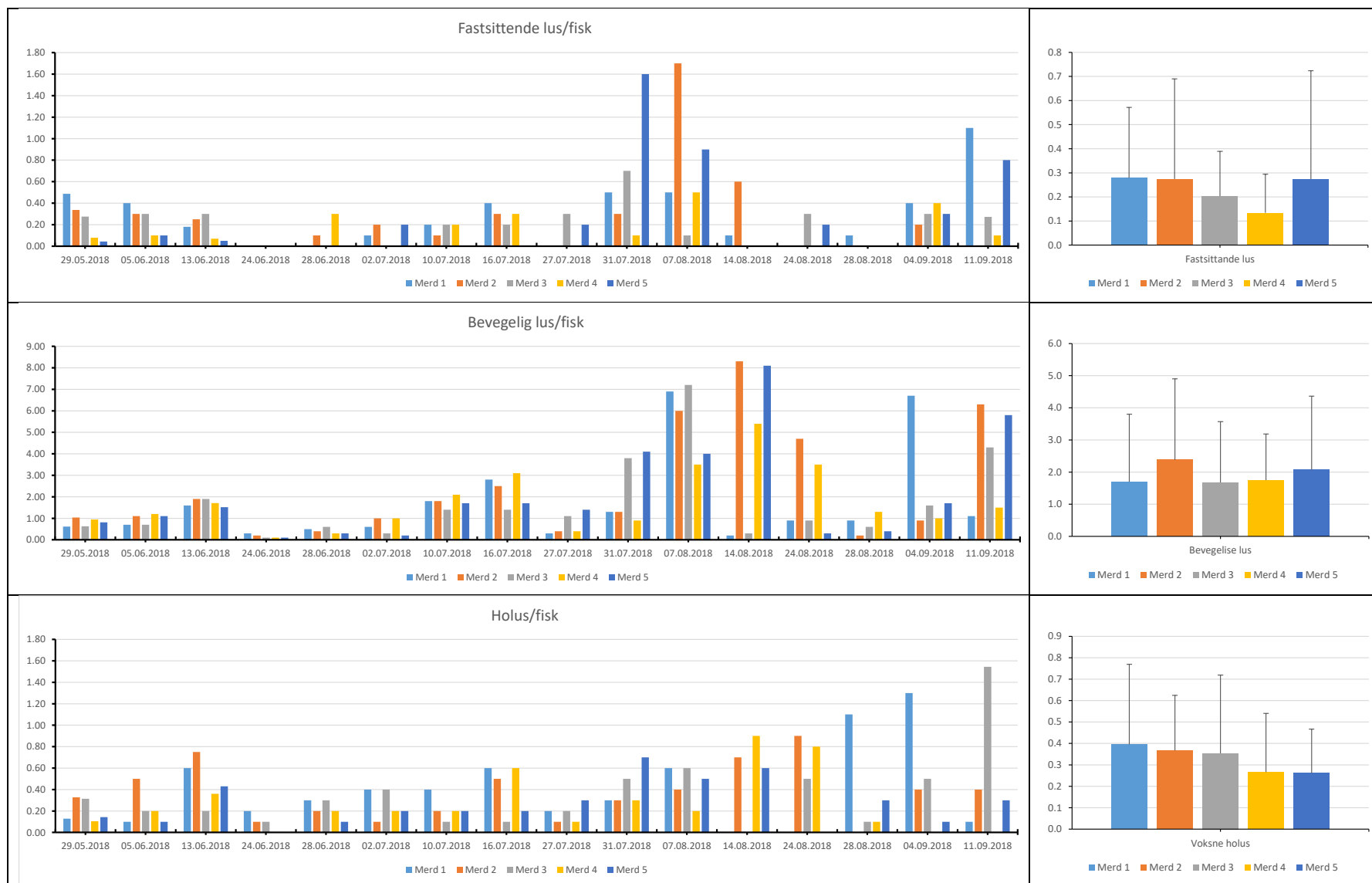
Ved Soløy, i et anlegg med 5 merder, ble det planlagt at 3 merder skulle tildeles Salmon Group fôr som en vet er tilsatt ingrediensen Aquate fra Alltech og 2 merder tildelt fôr fra Aller Aqua (Aller Active AF med høy andel fiskemel, og tilsetning av animalske ingredienser og 4 % Biofeed Forte generasjon 3. Dette er ikke den samme BF-ingrediensen som er benyttet i forsøk ved Ilab og 5x5-merder ved Vadheim). Fôret Aller Active AF har et høyt innhold av protein (43 %) og et moderat fettinnhold (31-32 %), sammenlignet med andre bulkfôr tilsvarende Salmon Group fôr med noe lavere protein (36 %) og høyere fettinnhold (37 %) for 9 mm pellet. Aller Active AF har et høyere innhold av mineralene jern, silisium, arsen og jod enn Salmon Group fôr (jod-verdier på henholdsvis 5,1 og 0,9 mg/kg). Jern i Aller Active AF var i disse batchene over øvre tillatte grenseverdi fôr jern (750 mg/kg), mens de andre mineralene var godt innenfor tillatte grenseverdier (også for jod). Mindre forskjeller i sammensetning av aminosyrer, fettsyrer og lipidklasser ble observert mellom fôrene. På fettsiden er det tydelig at det er benyttet ulike oljekilder, med et høyere innhold av 18:1, 22:1, 18:3 og DHA i Aller fôr mens Salmon Group fôr har ett høyere nivå av metta fettsyrer og EPA. I tillegg har Aller Active AF et høyere innhold av polare lipider.

Grunnet mangel på Aller Aqua fôr ved noen tidspunkt ble merdene ikke konsekvent fôret den samme fôret i forsøksperioden mai – september 2018 (Tabell 8).

Tabell 8 Fôrtildeling av Aller Active AF (AF) og Salmon Group (SG) fôr ved Fylkesnes Fisk AS sine lokalitet Soløy

Fôr i perioden	Merd 1	Merd 2	Merd 3	Merd 4	Merd 5
Januar - april 2018	SG	SG	SG	AF	AF
17. - 31. april 2018	SG	SG	SG	SG	SG
1. mai - 9. august 2018	SG	SG	SG	AF	AF
10. august - 3. september 2018	SG	SG	SG	SG	SG
4. - 8. september 2018	SG	SG	SG	AF	AF
8. - 22. september 2018	SG	SG	SG	AF	SG
22. september 2018 - slakt	SG	SG	SG	SG	SG

En kan i denne produksjonen ikke konkludere om fôret hadde effekt på lusetall da behandlingene ikke hadde replikate merder som var behandlet likt gjennom forsøksperioden mai – september 2018. I tillegg til at merd 4 og 5 i perioder fikk Salmon Group fôr, hadde disse merdene også en høyere innblanding av rensefisk. Merd 5 hadde kun leppefisk (25.248), mens merd 4 hadde den høyeste innblanding av rensefisk, med både leppefisk (21.983) og oppdrettet rognkjeks (20.000). Til sammenligning hadde merdene fôret med Salmon Group fôr i hovedsak innblanding av rognkjeks (20.000) og mindre mengder med leppefisk (Tabell 9). Gjennomsnittlig lusetall i periode mai til september 2018 for fastsittende, bevegelige og hunnlus var ikke signifikant forskjellig mellom fôrgruppene (Figur 15). Antall avlusninger i merd 4 og 5 var lavere enn merd 1-3, som kan samsvare med den ulike innblandingen av rensefisk i merdene.



Figur 15 Telling av lus 20 fisk per merd i perioden mai – september 2018. Samt gjennomsnittlig antall lus per fisk gjennom hele perioden (figur til venstre).

Tabell 9 Avlusninger og bruk av rensefisk ved lokaliteten Soløy mai – september 2018

Avlusninger	Merd 1	Merd 2	Merd 3	Merd 4	Merd 5	Metode
Desember 2018	1	1	1	1	1	Slice, 14 dager
Januar 2018	1	1	1	1	1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
April-Mai 2018	1	1	1	1	1	Ferskvann
Mai-Juni 2018	1	1	2	1	1	Themolicer
Juli 2018		1		1		Optilicer
Juli-aug 2018	2	1	1			Themolicer
Sept-Okt 2018	3	2	2	1	1	Optilicer
November 2018	1	1	1			Optilicer
Sum	10	9	9	6	5	

Antall rensefisk						
Leppefisk	5239	4765	12.281	21.983	25.248	
Rognkjeks	20.000	20.000	20.000	20.000	0	

Forsøket ved lokaliteten Ospøy ble gjennomført uten replikate merder ved tildeling av to fôr, henholdsvis Aller Active AF til merd 1 med laks og merd 3 med regnbueørret og Aller Active BF til merd 4 med regnbueørret. Den sistnevnte dietten er uten animalske ingredienser som isteden er erstattet av plante ingredienser, men samme innhold av BF. Vektregistreringer utført av Aller Aqua tilsier at det var stor individvariasjon innad i merdene, men også mellom merdene. I mai 2018 ble det målt vektforskjell på 1 kg mellom merdene med regnbueørret (merd 3 og 4), med antydning om bedre vekst på regnbueørret fôret med Aller Active BF. Etter ytterligere 3 måneder i sjø (august 2018) var det ingen forskjeller i gjennomsnittsvekten i merd 3 og 4 (Tabell 10).

Tabell 10 Vektregistreringer i forbindelse med store lusetellinger utført av Aller Aqua

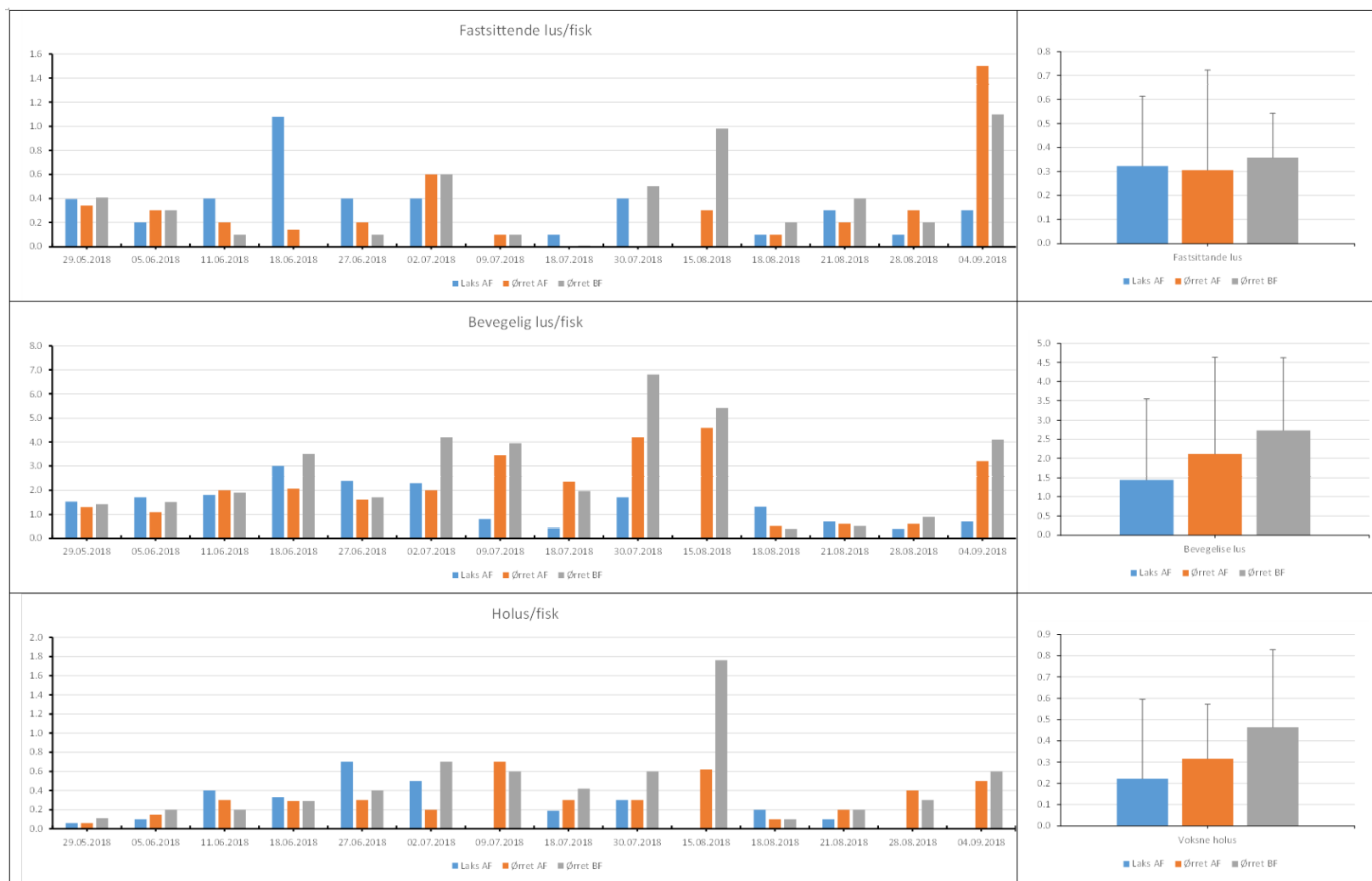
Registrering av vekt	Antall individ	Gjennomsnitt Vekt(g)	Standard avvik (g)
<b>29.05.2018</b>			
1	100	794	257
3	100	1589	523
4	100	527	344
<b>18.07.2018</b>			
1	100	1133	348
3	100	2440	666
4	100	2222	702
<b>15.08.2018</b>			
3	100	2661	770
4	100	2959	721

Lusetall for perioden mai til september viste i gjennomsnitt små forskjeller mellom de ulike fôrgruppene, og det er ikke mulig å gjøre statistiske beregninger da fôrene ikke ble tildelt replikate merder (Figur 16). Laksen hadde større påslag av lus våren 2018 som krevde avlusning, men til

gjengjeld hadde ørreten store problem med lus sommer 2018 som krevde 3 mekaniske avlusninger sensommer-høst 2018 (Tabell 11). Nofima har ingen informasjon om renseskik i disse merdene.

Tabell 11 Antall avlusninger Ospøy 2018

Dato	Merd 1	Merd 3	Merd 4	Metode
30. januar – 7. februar 2018	1			Slice, 10 mg/kg
Juli 2018	1			Thermolicer
August 2018		1	1	Optilicer
September 2018		1	1	Optilicer
Oktober 2018		1	1	Optilicer



Figur 16 Telling av lus 20 fisk per merd i perioden mai – september 2018 (29/5, 18/7, 15/8; telling av 100 fisk). Samt gjennomsnittlig antall lus per fisk gjennom hele perioden (figur til venstre).



## 5.2 Småmerder ved Seamatech AS sin lokalitet Floteneset, Vadheim

Det ble høsten 2018 satt opp 8 bur (5x5 m, 12m dyp) inni en 25x25 m merd ved lokaliteten Floteneset. Nylig utsatt laks fra anlegget og regnbueørret transportert fra settefiskanlegg ble fordelt i burene i henhold til tabell under 6. oktober 2018 (Figur 17). Duplikate merder med laks og regnbueørret ble tildelt samme Nofima produsert fôr benyttet i forsøk ved Ilab sommer 2018, kontrollfôr eller fôr tilsatt 4 % av Biofeed ingrediensen tilsendt til Nofima juni 2018. Det var på dette tidspunktet ikke kjent at jod-nivåene i fôr med BF var over øvre tillate grense for jod i fullfôr til oppdrettsfisk.

<b>M5 BF</b> Laks Ant.120 Vekt. 19,4kg	<b>M9 BF</b> Aure Osland Ant:100 Vekt:18,77 kg
<b>M6 BF</b> Aure ilsvåg Ant.100 Vekt: 20,4 kg	<b>M10 Kontroll</b> Laks Ant:100 Vekt:17,89 kg
<b>M7 Kontroll</b> Laks Ant:100 Vekt:17,55 kg	<b>M11 Kontroll</b> Aure Osland Ant:100 Vekt:17,5 kg
<b>M8 Kontroll</b> Aure ilsvåg Ant:100 Vekt:19,85 kg	<b>M12 BF</b> Laks Ant:100 Vekt:18,55 kg

Figur 17 Forsøksoppsett merder med laks og regnbueørret ved Floteneset høst 2018 (bilde; Rolv Tveit).

Fôrene ble tildelt de respektive merdene i litt over 8 uker. Ved forsøksslutt så det ut til at både laks og regnbueørret ikke trivdes i de små merdene. Lav vekst og høy økonomisk fôrfaktor preget forsøket, samt en rekke fisk med katarakt, finneslitasje og sår. Tilsvarende gruppe med laks fôret med Aller Active AF i stormerd (25x25 m) viste god vekst fra 180 g ved start til 530 g ved uttakstidspunktet (daglig vekst på 1,8 %), mens både laks og regnbueørret i småmerdforsøket hadde ved uttaket vekst i underkant av 50 g med en daglig vekst på under 0,5 % (Tabell 12). Lusetelling viste tendenser til lavere lusepåslag av fastsittende og hunnlus hos fisk tildelt BF-fôr, mens eneste signifikante forskjellen i forsøket var et lavere lusepåslag av hunnlus på regnbueørret sammenlignet med laks.

Tabell 12 Vekt ved forsøksstart og slutt, daglig vekstrate (SGR) og fôrfaktor (FCR) over 8 ukers fôring, og antall fastsittende (fast), bevegelige (bev) og hunnlus per fisk (n=100 per merd)

	Start vekt (g)	Sluttvekt (g)	SGR	FCR	Fast lus/fisk	Bev lus/fisk	Hunnlus/fisk
<b>Laks</b>							
Aller AF	180	530	1,8		0,7	2,6	0,3
Nofima C	177	239	0,5	1,1	1,3	3,1	0,9
Nofima BF	174	215	0,4	1,5	0,9	3,4	1,1
<b>Regnbueørret</b>							
Nofima C	187	237	0,4	1,2	1,6	4,4	0,8
Nofima BF	196	229	0,3	1,7	0,7	2,0	0,6
<b>ANOVA (P-verdi)</b>							
Art	0,164	0,545	0,429	0,747	0,955	0,948	<b>0,008</b>
Fôr	0,784	0,172	0,273	0,324	0,103	0,251	0,735

Siden fisken fôret med BF-fôr ble tildelt fôrhøyere nivå av jod ble det tatt prøver av helfisk for jodanalyser og thyroidea til morfologiske undersøkelser. Både hos laks og regnbueørret ble det observert et signifikant høyere innhold av jod i fisk fôret BF-fôret, men med noe lavere verdier i laks. Jod er et viktig spormineral i thyroidea for produksjon av hormoner. I dette forsøket ser det ut til at jod akkumuleres i thyroidea hos regnbueørret, mens laks har relativt likt jodinnhold i hele kroppen (Tabell 13). I tillegg ble det observert lavere verdier av jod i helfisk fra laks tildelt Aller Active AF sammenlignet med kontrollfôr fra Nofima, enda disse fôrene er analysert til å ha tilnærmet samme innhold av jod – henholdsvis 5 og 7 mg/kg fôr. Disse forskjellene kan være grunnet fysiologiske forskjeller som ulikt oppdrettsmiljø/vekst/robusthet, da laks i små merder så ut til å ha vært utsatt for større påkjenninger enn laks i stor merd. Innledende histologiske analyser av thyroidea antyder at laks er mer påvirket av det høye jodinnholdet i fôret, men ingen patologiske effekter er observert (data ikke vist).

Tabell 13 Jodinnhold i helfisk med og uten thyroidea

Total jod (mg/kg)	Helfisk med thyroidea	Helfisk uten thyroidea
<b>Laks</b>		
Aller AF	0,02	<0,02
Nofima C	1,03	0,50
Nofima BF	6,50	5,83
<b>Regnbueørret</b>		
Nofima C	0,53	0,20
Nofima BF	15,25	8,10
<b>ANOVA (P-verdier)</b>		
Art	0,074	0,078
Fôr	<b>0,004</b>	<b>&lt;0,001</b>

## 6 Hovedfunn

- Biofeed Forte ingrediensen brukt i fôr til fisk inaktiverer voksen lakselus ved direkte kontakt med ingrediensen i en 4 % løsnings i sjøvann (*in vitro* modell, Ilab).
- Kontrollert karforsøk med laks tildelt fôr med den feilproduserte Biofeed Forte ingrediensen inneholdt et ekstremt nivå av jod (1200 mg/kg), som gjenspeiles i fisken. Fôret ga en signifikant effekt på antall lus på preadult stadiet, sammenlignet med laks tildelt kontrollfôr med et jod-innhold på 7 mg/kg
- Effekten av fôret på antall preadulte lus kan ikke konkluderes til enten være en direkte respons av jod eller endringer av biologiske mekanismer (fiskeskinnets slimceller, slimsammensetning e.l.) grunnet det høye jod-innholdet
- Biofeed Forte varianten benyttet i kommersielle forsøk på laks og regnbueørret i 2018 med fôr-innhold av jod på 5,1 mg/kg gav ikke forskjell i lusetall sammenlignet med fisk tildelt Salmon Group fôr med et jod-innhold på 0,9 mg/kg.

## 7 Leveranser

André S Bøgevik, Thomas Larsson, Aleksei Krasnov, Carlo Lazado, Karin Pittman, Sturle Skeisvoll og Bjarne Hatlen. 2018. Redusert lusepåslag hos ørret føret med mineraltilsetninger. Foredrag Havbruk 2018, 18. – 20. april 2018 (Oslo, Norge).

André S Bøgevik, Lene Sveen, Elisabeth Ytteborg, Christian René Karlsen, Carlo Lazado, Aleksei Krasnov, Sissel Albrektsen, Linda Andersen, Ole Myre, Grigory Merkin, Mearge Okubamichael og Karin Pittman. 2018. Resultatoppsummering FHF finansiert prosjekt 901458: Forebyggende ernæring mot lus på laks - forsøk og dokumentasjon på betydning av samvirkning mellom aktive tilsetninger og grunnfôr. Konfidensiell Nofima rapport K17/2019.

Styringsgruppemøter 15. november 2017, 12. mars og 7. mai 2018, og 10. januar 2019.

## 8 Referanser

- Buckley, J., Maunder, R.J., Foey, A., Pearce, J., Val, A.L., Sloman, K.A. 2010. Biparental mucus feeding: a unique example of parental care in an Amazonian cichlid. *The Journal of Experimental Biology*, **213**(22), 3787.
- Dang M, Pittman K, Bach L, Sonne C, Hansson SV, S ndergaard J, Stride M and Nowak B. Mucous cell responses to contaminants and parasites in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*) from a former lead-zinc mine in West Greenland. *Science of the Total Environment* 678:207-216.
- Dang M, Pittman K, Bach L, Sonne C, Hansson S, S ndergaard J, Stride M and Nowak B. (2019 in prep) Comparison of mucosal mapping and histopathology to assess gill and skin health in shorthorn sculpin. Manuscript in submission.
- Haddeland S. 2019 Benchmarking healthy gills in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater recirculating aquaculture system after repeated peracetic acid exposure. Masters thesis. BIO, Univ of Bergen, Norway.
- Haddeland S<sup>1</sup>, Carlo C. Lazado<sup>2</sup>, Grigory Merkin<sup>3</sup>, Ole Jacob Myre<sup>3</sup>, Mearge Okubamichael<sup>2</sup>, Lars-Flemming Pedersen<sup>4</sup>, Karin Pittman<sup>1,3\*</sup> (2019 in prep) Morphometrics of mucous cells in the gills of Atlantic salmon smolt reveals that peracetic acid, an oxygen radical-forming agent, poses minimal impact to mucosal barrier (manuscript in submission).
- Hamre, L.A., Nilsen, F. 2011. Individual fish tank arrays in studies of *Lepeophtheirus salmonis* and lice loss variability. *Diseases of aquatic organisms*, **97**(1), 47-56.
- Iger, Y., Balm, P.H., Jenner, H.A., Wendelaar Bonga, S.E. 1995. Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol*, **97**(2), 188-98.
- Jin, C., Padra, J.n.T.s., Sundell, K., Sundh, H., Karlsson, N.G., Lind n, S.K. 2015. Atlantic salmon carries a range of novel O-glycan structures differentially localized on skin and intestinal mucins. *Journal of proteome research*, **14**(8), 3239-3251.
- Krasnov, A., Skugor, S., Todorovic, M., Glover, K.A., Nilsen, F. 2012. Gene expression in Atlantic salmon skin in response to infection with the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*, cortisol implant, and their combination. *BMC genomics*, **13**(1), 130.
- Leknes I.L. 2002 Uptake of foreign ferritin in platy *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae: Teleostei). *Dis. Aquat. Org.* vol 51:233-237.
- O'Byrne-Ring, N., Dowling, K., Cotter, D., Whelan, K., MacEilly, U. 2003. Changes in mucus cell numbers in the epidermis of the Atlantic salmon at the onset of smoltification. *Journal of fish Biology*, **63**(6), 1625-1630.
- Padra, J.T., Sundh, H., Jin, C., Karlsson, N.G., Sundell, K., Lind n, S.K. 2014. *Aeromonas salmonicida* Binds Differentially to Mucins Isolated from Skin and Intestinal Regions of Atlantic Salmon in an N-Acetylneuraminic Acid-Dependent Manner. *Infection and immunity*, **82**(12), 5235-5245.
- Pittman K, Pittman A, Karlson S, Cieplinska T, Sourd P, Redmond K, Ravn y B and Sweetman E. Body site matters: an evaluation and application of a novel histological methodology on the quantification of mucous cells in the skin of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. *Journal of Fish Diseases* 36:115-127.
- Richardson, R., Metzger, M., Knyphausen, P., Ramezani, T., Slanchev, K., Kraus, C., Schmelzer, E., Hammerschmidt, M. 2016. Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals. *Development (Cambridge, England)*, **143**(12), 2077-2088.
- Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., Johnson, S.C. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Dis Aquat Organ*, **41**(1), 43-51.
- Rubin, B.K. 2014. Secretion properties, clearance, and therapy in airway disease. *Translational Respiratory Medicine*, **2**(1), 6.

- Schütz, M., Barlow, G.W. 1997. Young of the Midas cichlid get biologically active nonnutrients by eating mucus from the surface of their parents. *Fish Physiology and Biochemistry*, **16**(1), 11-18.
- Sveen, L.R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Stefansson, S.O., Handeland, S.O., Ytteborg, E. 2018. High fish density delays wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scientific Reports*, **8**(1), 16907.
- Tadiso, T.M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., Nilsen, F. 2011. Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC Genomics*, **12**, 141.
- Xu, Z., Takizawa, F., Parra, D., Gómez, D., Von Gersdorff Jørgensen, L., Lapatra, S. E. and Sunyer, J. O. (2016). Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nature Communications* **7**,. doi: 10.1038/ncomms10728.

