

Nye marine ingredienser fra sildeavskjær som P ingrediens i fôr til lakseyngel (*Salmo salar* L.)

Sissel Albrektsen, Grete Bæverfjord, Erik-Jan Lock*, Mona Pedersen, Harald Takle, Robin Ørnsrud*, Eva Veiseth-Kent, Rune Waagbø* og Elisabeth Ytteborg (*NIFES, 5004 Bergen, Norge)





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

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy 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 Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

Faks: 64 94 33 14

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

		ISBN 978-82-8296-165-3 trykt ISBN 978-82-8296-166-0 pdf ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Nye marine ingredienser fra sildeavskjær som P ingrediens i fôr til lakseyngel (Salmo salar L.)		<i>Rapportnr.:</i> 09/2014
		<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Sissel Albrektsen, Grete Bæverfjord, Erik-Jan Lock, Mona Pedersen, Harald Takle, Robin Ørnsrud, Eva Veiseth-Kent, Rune Waagbø og Elisabeth Ytteborg		<i>Dato:</i> 31 januar 2014
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi		<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 37+6
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfond (FHF)		<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF #900558
<i>Stikkord:</i> Sildeavskjær, fosforutnyttelse, syrehydrolyse, startfôring, laks		<i>Prosjektnr.:</i> 21109
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Det ble gjennomført et forsøk med lakseyngel for å evaluere tilgjengelighet av fosfor (P) hydrolysert fra fiskebein (FBH sild), relativt til et mono-Na-P salt. P-kildene ble testet på tidlige stadier i laksens utvikling, fra startfôring til 30 g i ferskvann. Forsøket inkluderte en lav P kontroll diett (0,55 % løselig P) og samme diett tilsatt to graderte P nivåer (0,70 og 0,85 % løselig P) fra henholdsvis FBH og Na-P. Effektiviteten i P utnyttelse fra FBH sild ble evaluert basert på vekst, dødelighet, mineralanalyser og røntgen, samt histologi, FTIR, transkripsjons- (qPCR) og enzymanalyser (ALP, TRAP) og vitamin D₃ metabolitter i plasma. Fisk fôret med lav P diett viste klare P-mangelsymptomer i form av redusert mineralisering og morfologiske avvik/deformiteter i skjelettet som ikke ble funnet i fisk fôret med noen av de andre diettene. Fisk fôret med FBH 1 viste små avvik i histologi, FTIR og genuttrykk i ryggbein fra 15 g fisk tilsvarende funnene for lav P diett. Dette ble ikke funnet for FBH 2. Tilsvarende ble heller ikke funnet i 33 g fisk, noe som indikerer at diettresponsene var stabilisert i den største fisken. Resultatene totalt sett indikerer at P hydrolysert fra beinfraksjon av sildeavskjær kan utnyttes effektivt til å opprettholde normal vekst, mineralisering og skjelettutvikling i lakseyngel, men at tilgjengeligheten av P kan være litt lavere enn for Na -P på de tidligste utviklingsstadier før fisken når 15 g. Prosjektet har dokumentert at behovet for P til lakseyngel er dekket med 0,80 % løselig P i fôret.</p>		
<i>English summary/recommendation:</i> <p>An experiment was conducted to study the utilization efficiency of P from fish bone hydrolysate (FBH) relative to a Na -P salt in Atlantic salmon fry. A low P diet (0.55% soluble P) was compared with FBH and Na-P at two levels (0.70% and 0.85% soluble P) in triplicates from start feeding until 30 g size. The results were evaluated based on growth, mortality, mineral analysis and X-ray, and by histopathology, FTIR, transcriptomics (qPCR) and enzymes (ALP, TRAP). Fish fed a low P diet showed clear P-deficiency signs. Fish fed FBH1 showed some small differences in histology, FTIR and gene expression in the bones of 15g fish corresponding to findings in the low P diet. This was not found for FBH2. Overall, results indicated that P hydrolyzed from the bone fraction of herring trimmings can be effectively utilized to maintain normal growth, mineralization and bone development of salmon fry, but that the availability of P may be slightly lower than that of Na-P in the early salmon fry stage until the fish reaches approximately 15 g size.</p>		

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Executive summary	2
3	Bakgrunn	3
4	Materiale og metoder	6
4.1	Produksjon av beinhydrolysat	6
4.2	Fôrproduksjon	6
4.3	Fiskeforsøk	7
4.4	Røntgenevaluering	8
4.5	Helkroppsfarging med Alizarin rød og Alcian blå	8
4.6	Ytre velferdsindikatorer	8
4.7	Kjemiske analyser i fôr, hel fisk og bein	9
4.8	Real time qPCR	9
4.9	<i>In vitro</i> forsøk med beinceller	9
4.10	FTIR	10
4.11	Histologi	10
4.12	Enzymer (ALP og TRAP) i ryggbein	10
4.1	Vit D metabolitter i plasma	10
4.2	Statistiske analyser	11
5	Resultater	12
5.1	Fôr	12
5.2	Røntgenevaluering	14
5.3	Helkroppsfarging med Alizarin rød og Alcian blå	18
5.4	Ytre velferdsindikatorer	19
5.5	Aske og mineraler i hel fisk og i bein	20
5.6	Aske i hel fisk	20
5.6.1	Aske i ryggbein	21
5.6.2	Makromineraler og Ca:P ratio i lakseyngel	21
5.6.3	Makromineraler og Ca:P ratio i ryggbein	25
5.6.4	Na og K i bein	26
5.6.5	Tungmetaller:	26
5.7	Vevsanalyser	26
5.7.1	Real time qPCR med markører for beindannelse og mineralisering i virvlene	27
5.7.2	<i>In vitro</i> forsøk med beinceller	28
5.7.3	Histologi av brusk og beinområder i virvlene	29
5.7.4	ALP og TRAP aktivitet i fiskebein og vitamin D metabolitter i plasma	31
6	Diskusjon	32
7	Referanser	35

Appendixes

1 Sammenndrag

Målet med dette prosjektet var å utvikle nye marine kilder ved å frigjøre fosfor (P) fra biprodukter av sild (hode og rygggrad) ved hjelp av hydrolyse i en sterk syre (H_2SO_4). Videre skulle effekten av frigjort P evalueres i et fiskeforsøk, der lakseyngel ble fôret med en diett tilsatt P fra fiskebeinhydrolysat (FBH). FBH som P kilde ble evaluert basert på fiskens vekst, mineralisering og utvikling av skjelettet. Fem forsøksfôr ble produsert fra en fiskemel-formulert basis: en Lav P kontrolldiett (0,55 % løselig P), to dietter med 2 konsentrasjoner av P fra FBH, FBH 1 og FBH 2 (0,70 og 0,85 % løselig P) og to dietter med 2 konsentrasjoner av P fra et fritt krystallinsk mono-Na-P salt, Na-P 1 og Na P 2 (0,70 og 0,85 % løselig P). Fisk ble foret med disse diettene i 168 dager, fra startfôring til 33g. Periodisk og daglig vekst (SGR) viste ikke diett-avhengige forskjeller ($p>0,05$), bortsett fra i de første seks ukene i foringsperioden (0.2-0.8g). I denne perioden viste fisk fôret med FBH 1 høyere dødelighet og lavere vekst ($p<0,05$) sammenlignet med fisk fôret med Na-P diettene. Mineralisering av hele kroppen og spesifikt for bein ble evaluert og både aske og mineralinnhold viste en klar dose respons til diett P nivå ($p<0,05$), men ikke til P kilde ($p> 0,05$). Fisk fôret med Lav P kontrolldiett viste klare P-mangelsymptomer, bl.a. betydelig redusert aske og mineralinnhold, redusert Ca:P forhold og morfologiske avvik i skjelettet. Ingen morfologiske avvik ble observert i fisk fôret med noen av diettene som inneholdt nok P ($\geq 0,65$ % løselig P). Histologisk evaluering av ryggvirvlene av fisk på 15g viste at fisk som hadde fått lav P dietten hadde en stagnasjon i bruskutvikling, der modne bruskceller hopet seg opp i overgangen fra brusk til bein i ribbeinsbuene. Halvparten av fisken som fikk FBH 1 hadde en fenotype som lignet den positive kontrollen (Na-P 1), mens den andre halvparten var fenotypisk mer lik den negative kontrollen (lav P diett). I tillegg viste FTIR analyser at fisk fôret med FBH 1 hadde lavere mineralisering og økt mengde kryssbindinger i de vertebrale endeplatene. Fisk som ble fôret med FBH2 lignet derimot den positive Na-P kontrollen. Transkripsjonsanalyser med qPCR bekreftet de histologiske resultatene, col10a1 (en markør for modne bruskceller) var oppregulert i fisk fôret med lav P diett og FBH 1. Dietteffektene på histologi, FTIR og qPCR ble ikke detektert i 33g fisk, noe som indikerer at direkte effekter og kompensatoriske tiltak var stabilisert i større fisk. Resultatene totalt sett viser at P frigjort fra beinfraksjonen i sildeavskjær effektivt kan utnyttes og brukes i fôr til lakseyngel, men at tilgjengelig P i FBH kan være noe lavere enn for mono-Na-P i den innledende startfôringsfasen til fisken, før den når 15g. Det er mulig at nøytraliseringsmiddel anvendt etter syrehydrolyse (ammoniakk-N), lav P eller andre komponenter i FBH kan forklare problem på de tidligste utviklingstrinn. Behovet for P til lakseyngel er dekket med 0,80 % løselig P i fôret, uavhengig av P kilde. Dette er i overensstemmelse med offentlige anbefalinger (NRC, 2011). Vi konkluderer med at P fra marine biprodukter er en fullgod P-kilde i for til lakseyngel.

2 Executive summary

The aim of the presented study was to develop new marine P ingredients from the fish bone fraction of herring by-products (head- and backbone) by hydrolysis in a strong acid (H_2SO_4), and to evaluate the dietary impacts of the ingredient on growth, mineralisation and skeletal development in Atlantic salmon fry. Five experimental diets were produced from a fish meal formulated basal diet, only differing in the dietary P source and P level; 0.55 % soluble P (Low P control); and 2 graded levels of P (0.70 and 0.85 % soluble P) from either fish bone hydrolysate (FBH1, FBH2); or from mono-Na-P salt (Na-P 1, Na-P 2). The diets were given for 168 days, from start feeding (0.17g fish) until 33g size. Periodic and overall daily growth (SGR) did not show diet dependent differences ($p>0.05$) except in the initial 6 weeks feeding period (0.2–0.8g) where fish fed FBH1 showed higher mortality and lower growth ($p<0.05$) as compared to fish fed the Na-P diets. Mineralization of fish evaluated by whole body and bone ash and mineral contents showed diet dependent differences that related to dietary P level ($p<0.05$), but not to dietary P sources ($p > 0.05$). Fish fed the low P diet showed clear P deficiency signs with significantly reduced tissue ash and mineral contents, reduced whole body Ca:P ratio and morphological deviation from the normal. No morphological deviation appeared in fish fed any of the P supplemented diets. Histological evaluation of the vertebrae of 15g fish revealed stagnation in cartilage development, with accumulation of mature chondrocytes, in fish fed Low P control diet. Half of the fish fed FBH1 had a phenotype similar to the positive control (Na-P 1) and the other half a phenotype similar to the negative control (Low P diet). In addition, FTIR showed that fish fed FBH1 had lower mineralisation and increased cross binding in the vertebral end plates. Fish fed FBH2 resembled the positive Na-P 1 control. Real time qPCR analyses confirmed the histological results, by showing up-regulation of *col10a1* (marker for mature cartilage) in fish fed Low P diet and FBH. *Osteocalcin* (marker for mineralization) was also activated in fish fed Low P control diet and FBH 1, possibly indicating a compensatory regulation in response to inadequate P. The dietary impacts on histology, FTIR and qPCR analyses did not appear at 33g size, indicating that direct and compensatory responses to the diets were stabilized in larger fish. In conclusion, the results showed that P solubilized from bone fraction of herring can be efficiently utilized for growth, mineralization and skeletal development in Atlantic salmon fry, but that the P availability in FBH may be slightly lower than for mono-Na-P in the initial stages until the fish reach 15g size. Overall results in this project show that the dietary P requirement in Atlantic salmon fry was 0.80 % soluble P, independent of dietary P source. The main conclusion is that P solubilized from herring trimmings efficiently can be used as a dietary P source in Atlantic salmon fry.

3 Bakgrunn

Fosfor (P) er et mineral som er helt nødvendig for bl.a. normal vekst og beinutvikling. Behovet for dette mineralet i kaldtvannsfisk er høyt og anbefalt økt til 0,8 % P (NRC, 2011). Tilgjengeligheten av mineraler fra fôr er avhengig av kilden, dvs. hvilke råvarer eller tilsetningsform de finnes i og av fôrets sammensetning. Fiskemel har tradisjonelt vært den viktigste naturlige P kilden i fôret, og er det fortsatt, selv om nivået av fiskemel i fôret har gått betydelig ned. Mye av P i det marine råstoffet, minst 40 %, finner man i beinfraksjonen som tungt løselige mineralkomplekser som er vanskelig å fordøye for laks. Fordøyeligheten av P i laksefôr varierer, men er relativt lav (30–50 %), og anslagsvis 60 - 80 % slippes rett ut og bidrar til forurensning av miljøet. Erstatning av fiskemel med vegetabiliske fôrmidler som inneholder 60–80 % fytinsyre kan i tillegg hemme opptak av P (Helland *et al.*, 2006).

Fosfor er en begrenset ressurs globalt, og det er høy etterspørsel av P til både gjødsling og dyrehold. EU har identifisert redusert tilgang på P som en av de største utfordringene for Europa i det 21. århundre og EU Kommisjonen har iverksatt en rekke initiativ for å redusere overforbruk av denne knappe ressursen (<http://www.phosphorusplatform.eu>). Økt effektivisering i bruken av P, samt bedre gjenvinning av P fra avfall og gjødsel er eksempler på tiltak som kan redusere næringens sårbarhet for økende P priser samtidig som det kan redusere negative miljøkonsekvenser. Utvikling av nye, fornybare P kilder og nye retningslinjer for å etablere sikre P behov, er avgjørende for fremtidig vekst i akvakulturen, både økonomisk og miljømessig. Nofima har tidligere patentert en prosess for syrehydrolyse av fiskebein for å gjøre mineraler som fosfor mer vannløselige og lett tilgjengelig for oppdrettsfisk (Aksnes 2002; revidert 2007).

Fiskeavskjær inngår i økende grad som råstoff i fiskemelsproduksjon og globalt er det forventet at så mye som 40 % av råstoffet vil komme fra avskjær innen 2020 (IFFO, 2013). Dette råstoffet inneholder mye bein, og mye avskjær i fiskemel og fôr vil derfor tilsynelatende gi et høyt P innhold. Andelen av P som er biologisk tilgjengelig vil imidlertid bli redusert, fordi mye av P er bundet til tungt løselige mineralkomplekser (hydroxyapatitt) i bein. Analysen som brukes til å analysere den totale mengden P i fôr sier lite om hvor stor andel av P som er biotilgjengelig i laks. Mangel på gode metoder som kan si noe om P tilgjengelighet kan være et av hovedproblemene for riktig mineralforsyning i dagens laksefôr. De biologiske metodene for å vurdere biotilgjengelighet er også relativt grove og svært arbeidskrevende. Det er derfor et behov for å utvikle mer presise metoder. Nofima har utviklet en kjemisk analysemetode som skiller mellom beinbundet og ikke-beinbundet P (Hovde, 2013), der man antar at P som ikke er bundet i fiskebein vil være løselig og lett tilgjengelig for laks. Metoden ble opprinnelig utviklet for å få et mål på hvor stor andel av P som ble løst ut fra fiskebein ved hydrolyse i sterke syrer. Egnetheten av denne metoden som mål på biologisk tilgjengelig P i laks er nærmere belyst i en artikkel i Norsk Fiskeoppdrett (Albrektsen, 2013).

Det har tidligere vært gjennomført 2 smoltforsøk som viser at P fra fiskeavskjær kan frigjøres ved hydrolyse i sterke syrer og at utnyttelsen av denne P kilden tilsvarer andre lett løselige og tilgjengelige P-salter. Fiskebeinhydrolysat (FBH) produsert fra kolmule (Albrektsen, 2010, 2013) og fra sild (Albrektsen *et al.*, 2014) har vist seg å gi både god tilvekst, effektiv mineralisering og normal beinutvikling i laksesmolt i perioden rett etter sjøutsett. I det første smoltforsøket der fisken ble fôret med beinhydrolysat fra kolmule, ble det i tillegg påvist signifikant økt fordøyelighet av protein, fett, total energi og for mange ulike makro og mikromineraler. Det ble også funnet tendenser til bedre vekst (5 %), og klare indikasjoner på mindre variasjon i fiskematerialet, noe som totalt sett indikerer at FBH kan ha en potensiell merverdi utover å fungere som en effektiv P kilde til laks. Beinhydrolysat

fra sildeavskjær gav tilsvarende effektiv P utnyttelse fra fôret, mens fordøyeligheten av total energi i fôret synes å reflektere fôrnivået av P, og ikke de ulike P kildene som inngikk i forsøket. Hovedkonklusjonen i smoltforsøkene var at P utnyttelsen etter syrehydrolyse av beinfraksjon fra kolmule og fra sildeavskjær basert på vekst, røntgen, P fordøyelighet, P retensjon og P nivå i ved var helt like og sammenlignbare med et lett løselige og høyt tilgjengelig mono-Na-P salt.

På lik linje med pattedyr, blir mye av grunnlaget for normal beinutvikling og senere god beinhelse hos laks lagt på de tidlige livsstadier. Laksen er i hurtig vekst og skjelettet gjennomgår store forandringer før smoltutsett. Fiskeforsøk har vist at underdekning av P gir redusert mineralinnhold i bein, noe som har stor betydning for den normale beinutviklingen (Roy *et al.*, 2002; Refstie *et al.*, 2005; Lall og Lewis-McCrea, 2007). I laks er det vist at faktorer i tidlig yngelstadier, f.eks. begrenset tilgang på P, kan gi negative effekter på beinutvikling, bl.a. i form av svakere beinstrukturer, (Bæverfjord *et al.*, 1998), og på senere stadier være direkte knyttet til utvikling av deformiteter i fisken, også lenge etter sjøutsett (Fjelldal *et al.*, 2012).

Skjelettdannelse og vekst skjer som følge av produksjon og mineralisering av ekstracellulær matriks (ECM), og forstyrrelser i form av rask vekst eller mineralmangel kan forårsake feilutvikling. ECM består av fibre, hovedsakelig collagen, innleiret i en grunnmasse av proteoglykaner (PG) og proteiner. Betydningen av proteiner og PG i skjelettutvikling og beindannelse har tidligere blitt vist (Aszódi *et al.*, 2000; Boskey *et al.*, 1997; Hunter *et al.*, 1992). Mekanisk styrke av bein er avhengig av mineralinnhold, krystalliniteten og kryssbindingene i bindevevet, samt forholdet relativt til den ikke-mineralholdige fasen av bein (Currey *et al.*, 2003). Hos mennesker har Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) bildebehandling vært et nyttig diagnostisk verktøy i forhold til å studere sykdomsrelaterte endringer av mineralisert vev (Boskey *et al.*, 2003; Faibish *et al.*, 2005).

En balansert aktivitet fra osteoblaster (beinceller) og chondrocytter (bruskceller) i skjelettet er helt essensielt for normal beinutvikling. Utvikling (differensieringen) av disse cellene er styrt av en rekke ulike faktorer; bl.a. molekulære reguleringsmekanismer, miljøforhold og tilgjengelighet av mineraler. I tillegg er disse cellene svært følsomme for mineralmangel, så vel som endringer i miljøet (Fontagnè *et al.*, 2009; Ytteborg *et al.*, 2010a og b). Reguleringsmekanismene for opptak og omsetting av P i laks er komplisert, og det er ikke helt klart hva P betyr på vevsnivå og hvilket P nivå som kan være kritisk for ulike biologiske funksjoner. Studier har vist at ulike faser i bein- og bruskutvikling kan brukes som indikatorer for riktig utvikling av ryggvirvlene og mineralmangel kan være en direkte årsak til ubalansert mineralisering og cellulære og morfologiske endringer av patologisk karakter.

Sub-optimale P nivå gir forhøyete konsentrasjoner av vitamin D metabolittene 1,25(OH)₂D₃ og 25(OH)D₃ (Fjelldal *et al.*, 2009). Vitamin D kan påvirke både beindannelse og beinresorpsjon gjennom å stimulere aktiviteten til ulike enzymer. For å studere dette kan man måle enzymaktivitet av alkalisk fosfatase (ALP) og tartrate resistent syre fosfatase (TRACP) som markør for hhv beindannelse og beinresorpsjon. Fjelldal *et al.* (2012) viste at P mangel førte til deformiteter, redusert mineralinnhold, økt ALP aktivitet, og redusert TRACP aktivitet i vertebra samt økt konsentrasjon av 1,25(OH)₂D₃ i plasma fra post smolt av Atlantisk laks. Videre kan morfologiske og cellulære forandringer i ryggvirvler generelt fungere som gode P markører. I dette forsøket ble slike markører brukt til å vurdere tilgjengelighet av P fra beinhydrolysat på vevsnivå. Den metodiske tilnærmingen vi valgte var utviklet og demonstrert nyttig i andre forsøk (Ytteborg *et al.*, 2010a og b; Pedersen *et al.*, 2010) og inkluderer en kombinasjon av kjemiske analyser (aske og mineraler), røntgenanalyse, ulike histologiske fargeteknikker for mineralisert beinvev (Alizarin Red S) og bruskvev (Alcian Blue), samt

studier av nøkkel-faktorer i mineraliseringsprosessene (blant annet transkripsjonsfaktorer, osteocalcin, osteonectin, og collagener). Selv om forandringer i virvlene forårsaket av feilernæring kan være fraværende eller ikke-detekterbare ved røntgen på samplingstidspunktet vil selv små, ikke-visuelle forandringer kunne manifestere seg på senere tidspunkt som alvorlige deformiteter. Det var forventet at de molekylære finanalysene våre ville fange opp og detektere eventuelle transkripsjonelle forandringer som tidligere har vært linket til mineralmangel. Effekter på beinkvalitet ble evaluert ved FTIR spektroskopi for å analysere spesifikke egenskaper i endeplaten på virvel (vekstsonene for virvlene). Forsøk med laks i ferskvann vil kunne gi svar på hvor velegnet P fra beinhydrolysat er som alternativ P kilde med hensyn til normal vekst og beinutvikling. Det ble gjennomført et startfôringsforsøk med lakseyngel for å undersøke effekter av P fra beinhydrolysat på både vekst og mineralisering, og for å påvise eventuelle begrensninger for normal beinutvikling i lakseyngel under startfôring og på tidlig parrstadie. Forsøket inkluderte en lav P kontrolldiett og graderte nivåer av P fra henholdsvis syrehydrolysert beinhydrolysat og fra et lett løselig mono-Na-P salt med kjent høy P tilgjengelighet. Forsøket ga oss mulighet til å vurdere P-behovet basert på løselig P fra ulike P-kilder. Resultatene ble evaluert basert på vekst, mineralisering og røntgenanalyser, FTIR og gjennom studier av ulike molekylære markører for utvikling av bein. Målet var å identifisere eventuelle avvik som induseres når P blir en begrensende faktor og å sammenligne disse faktorene med de målte verdiene til fisk som hadde fått P fra FBH.

4 Materiale og metoder

4.1 Produksjon av beinhydrolysat

Fiskebeinhydrolysat (FBH) fra sild (hode- og ryggavskjær) ble produsert med utgangspunkt i 1.6 MT sildeavskjær. Biproduktene ble samlet opp ferskt på et fiskemottak (Norway Pelagic AS, Avd. Liavåg) og beinråstoffet ble separert fra fiskemuskel ved fysisk separasjon på en beinseparator. Beinfraksjonen ble vasket 2 ganger i kaldt vann for å fjerne rester av bløtvev og blod, og stabilisert ved vacuumering og frysing før frysetransport til Bergen. Råstoffet ble tint før hydrolyse i en prosess der fiskebein og vann ble blandet (1:5), tilsatt syre (H_2SO_4 , 5 %) og hydrolysert i 18 t for å frigjøre mineraler fra hydroxyapatitt i bein. Vannfraksjonen ble separert fra partikulært materiale, pH justert med 25 % NH_3 -løsning (pH = 2.8), oppkonsentrert (33 % Brix) og spraytørket (Niro atomizer P-6,3, Danmark). Prosessen ble optimalisert for å fjerne mest mulig fett og tungt løselige Ca-utfellinger, noe som gav en betydelig reduksjon i både fett (50 %) og Ca (65 %) sammenlignet med tidligere produksjoner. Det ble produsert ca. 21 kg tørket FBH, og denne ingrediensen ble testet som alternativ P kilde i et startfôringsforsøk med laks basert på 2 graderte innblandingsnivå. Den marine P ingrediensen som ble framstilt inneholdt 10,88 % total P og 9,22 % løselig P, omtrent identisk med det som er oppnådd i tidligere pilotproduksjoner.

4.2 Fôrproduksjon

Det ble produsert fem eksperimentelle fôr som inkluderte en basis Lav P kontroll diett, og dietter med 2 gradert økte P nivå fra henholdsvis fiskebeinhydrolysat (FBH 1 og FBH 2) og fra et fritt krystallinsk salt, NaH_2PO_4 , 24 %, (Na-P 1 og Na-P 2) for direkte sammenligning av ulike P kilder. Diettene var formulert slik at basisfôret skulle gi klinisk P mangel, mens de to gradert økte P nivå skulle gi A) antatt sub-optimal P dekning og B) nær behovsdekning av P, Tabell 1a.

Tabell 1a Total P og løselig P i eksperimentelle dietter

Fôr	Total P (%)	Beregnet løselig P (%)	Analysert løselig P (%)	Beskrivelse
Lav P kontroll	1,06	0,55	0,53	Negativ kontroll, P mangel
FBH 1	1,22	0,70	0,65	Beinhydrolysat, nivå 1
FBH 2	1,37	0,85	0,81	Beinhydrolysat, nivå 2
Na-P 1	1,20	0,70	0,66	Positiv Na-P kontroll, nivå 1
Na-P 2	1,34	0,85	0,79	Positiv Na-P kontroll, nivå 2

Blandelistene for de 5 eksperimentelle fôrene ble formulert av Nofima og er oppgitt i Appendix A1. Basisfôret (Lav P kontroll) inneholdt 42 % fiskemel (FM 88/04) produsert fra kolmule (42 %), avskjær fra sild (42 %), øyepål (15 %) og samfengt råstoff (1 %). Fiskemelet inneholdt 2,09 % total P og 1,02 % løselig P. Hvetegluten og hvetemel ble brukt som henholdsvis planteprotein og som bindemiddel, og ble valgt fordi hvetete inneholder lavt P nivå (< 0,25 % løselig P) sammenlignet med andre planteproteinråvarer. Diettene ble balansert for Met, Thre, Lys og Arg for å dekke vekstbehovet i lakseyngel. Oljen (O5/10) var en blanding av 75 % fiskeolje og 25 % rapsolje.

Grunnet produksjonstekniske problem med ekstruderen på Fôrteknologi senteret, Titlestad, ble de 5 diettene produsert av EWOS Innovation i Dirdal. Fôrblandingene ble prekondisjonert i en dobbel

differensial sylinder (DDC; Wenger Manufacturing Inc., Sabetha, KS) før ekstrudering på en X-85 enkelt skrue ekstruder (Wenger USA) med dyse størrelse 1,5 mm i diameter. Fôrene ble sendt til Nofima, granulert og siktet til ulike pelletstørrelser og til slutt coatet manuelt med olje på Nofimas Fôrteknologisenter på Titlestad (Tabell 1b). Fôrene ble deretter transportert til Sunndalsøra, og lagret på kjøll inntil oppstart av forsøk i april 2012.

Tabell 1b Fraksjonering og sikting av de eksperimentelle fôrene

Fôrpellet, mm	Siktestr.	Kg fôr
0,5-0,7	0,6 - 0,8	2
1	0,8 - 1,0	3
1,2	1,0 - 1,25	10
1,7	1,25 - 1,6	25

4.3 Fiskeforsøk

Forsøket startet med 0,17 g lakseyngel fra startfôring, og ble avsluttet ved 30g størrelse. Forsøket ble gjort ved Nofima Sunndalsøra fra april til oktober 2012. Til forsøket ble det brukt startfôringsklar yngel av SalmoBreed-stamme. Yngelen ble fordelt på 15 sylindriske kar med Ø 0,5m, 350 yngel *per* kar. Gjennomsnittsvekt ved startfôring var 0,17g. Under startfôring ble vanntemperaturen i karene økt fra 8 °C til 12 °C gradvis over to døgn. Vannforsyningen var initielt 2.5L/min *per* kar og ble oppjustert etter hvert som biomassen økte basert på O₂-målinger i utløp >90 %. I forsøksperioden ble temperaturen holdt på 12 °C (12.1 ± 0.32 °C, max-min 12.4-10 °C). Det var kontinuerlig lys i karene gjennom hele forsøksperioden fra lamper som var plassert over hvert kar. Kar og fisk fikk daglig ettersyn og død fisk ble registrert og fjernet umiddelbart. Karene ble rengjort tre ganger ukentlig.

Fôr ble tildelt fra belteautomater som ble etterfylt daglig. Fôringsintervall var 15 min 24 timer i døgnet. Fôrmengder ble kalkulert ut fra forventet vektutvikling (ClubN, Skretting) med 20 % overfôring for å sikre at fôrmengde ikke var en begrensende faktor for tilvekst. Før prøveuttak ble fisken fastet i 24 timer. Etter veiing ble vekstprognosene justert i forhold til reelle vekter.

Fisken ble veid (gruppevekt) ved startfôring, og ved 6, 15, 19 og 24 uker. Ved veiing i uke 19 (ca 15g) ble fisken sortert for å eliminere undermåls fisk. Dette ble gjort fordi det ble observert et variabelt antall små fisk med stagnert vekst i karene. Gruppene ble standardisert til 150 fisk av den største sorteringen. Antall og vekt av utsortert fisk ble registrert. Periodisert daglig tilvekst (SGR, i %) ble beregnet for periodene 0,2–0,8 g, 0,8–1,8g, 1,8–6g, 6–15g og 15–30g. I tillegg ble total vekst beregnet for perioden 0,2–15g.

Det ble tatt ut prøver av fisk fra forsøket ved startfôring, og etter bulkveiing ved 6, 10, 15, 19 og 24 uker. Ved startfôring ble prøvene tatt fra overskuddet av yngel i klekkekaret etter utplassering av yngel i startfôringskarene. Ved seinere prøveuttak ble det samlet et tilfeldig utvalg av fisk fra forsøkskarene. Vekt og lengde av prøvefisken ble registrert (ikke for fisk < 1 g). Prøvefisk ble homogenisert og analysert for tørrstoff, aske og mineraler i alle uttak. I tillegg ble det dissekert ut beinmateriale fra et definert område mellom ryggfinne og bukfinne for 15 og 30 g fisk. Prøvemateriale av bein ble tatt ut manuelt, beina ble skrubbet og rensket med en neglebørste, frysetørket og analysert for aske og mineraler. Oversikt over uttak av prøver er gitt i tabell 2.

Tabell 2 Oversikt over uttak av prøver fra hvert forsøkskar til ulike analyser.

	Start	6 uker (1g)	15 uker (6g)	19 uker (15g)	24 uker (30g)
Helkroppsanalyse (mineralinnhold)	2x25*	20	10	10	10
Røntgen	-	20	20	25	30
Ryggbein (mineraler)	-	-	-	10	10
Beinfarging med Alizarin	-	-	5	-	-
Bruskfarging (Alcian Blue)		5			
Vevsprøver	-	5	5	10	10
Ytre velferdsindikatorer	-	-	-	-	50

* To samleprøver a 25 fisk tatt fra utgangspopulasjonen

4.4 Røntgenevaluering

Utvikling av beinstrukturene ble undersøkt ved hjelp av røntgen. Fisken ble røntgenfotografert ved Nofimas røntgenlaboratorium på Sunndalsøra. Oppsettet var semi-digitalt, med en mammografi røntgenkilde (MS Giotto, Bologna, Italia) og med bruk av flergangsbildeplater med mammografi-oppløsning. Ved røntgenfotografering av fisk på 1g og 6g størrelse ble det brukt tilleggsforstørrelse. Bildene ble avlest og overført til datamaskinen i en plateleser (FCR Profect, Fuji Medical Inc., Japan). Bildene ble automatisk behandlet før lagring, med justering av lyshet og kontrast, utjevning av eksponering og framheving av kanter (Fuji CR Console software, Fuji Medical Inc., Japan). De digitale bildene ble evaluert visuelt, og avvik i beinstrukturene ble registrert og klassifisert.

4.5 Helkroppsfarging med Alizarin rød og Alcian blå

For detaljstudier og illustrasjon av utvikling av virvler hos fisk fra de første uttakene ble det utført helkropps-farging med hhv. brusk- og beinfarge. Hel fisk ble fiksert i 4 % fosfatbufret formalin. Fem fisk *per* kar fra uttak ved 6 uker (1g) ble farget spesifikt for brusk (Alcian Blue 8GX, Sigma, A-9186), og to fisk *per* kar fra uttak ved 15 uker (6g) ble farget spesifikt for mineralisert beinvev (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich, C.I. 58005) som beskrevet av Potthoff (1984) og modifisert av Helland (2009). Etter innfarging ble fisken klarnet ved alternerende 35 % mettet Borax løsning og 1 % KOH. Fisken ble deretter gradvis overført til 100 % glycerol. Ferdig fargede preparater ble avfotografert liggende i glycerolbad enten under lupe og digitalt montert kamera (brusk og beindetaljer, Q Imaging Micro Publisher 3.3 RTV kamera, Q Capture Pro software, Media Cybernetics 2011) eller med underlys med og speilreflekskamera (hele fisk brusk og bein, Nikon D5000).

4.6 Ytre velferdsindikatorer

Ved avslutning av forsøket ble det gjort en undersøkelse av ytre velferdsindikatorer. Undersøkelsen omfattet avvik og skader på finner, gjellelokk, skjellkledning og øyne, modifisert etter Kolarevic *et al.* (2013) og Hoyle *et al.* (2006). Cirka 50 fisk fra hvert kar ble avlivet med en overdose av metacain, og skader og avvik ble registrert og klassifisert med score mellom 0 og 3, der 0 er ingen avvik fra det normale og 3 er alvorlig skade.

4.7 Kjemiske analyser i fôr, hel fisk og bein

Kjemiske analyser ble utført i duplikat ved et akkreditert laboratorium (BioLab, Nofima). Tørrstoff (ISO 6496-1983) og aske (ISO 5984-1978) i fôr og vevsprøver ble bestemt gravimetrisk etter tørking i 4 timer ved 105 °C og etter forbrenning for 16 timer ved 450 °C, henholdsvis. Råprotein (N x 6,25) i fôr og feces ble bestemt ved Kjeldal-metoden (ISO 5983-1979), mens fettinnhold i fôr og feces ble bestemt ved henholdsvis syrehydrolyse («EU-fett»), (Commission Directive 98/64/EC, Part B), og ved Folch metode med syrehydrolyse (SSF-rapport: A-102, 1978). Yttrium ble bestemt ved induktivt koblet plasma -atom-emisjonsspektroskopi (ISO 11885-1996).

Total P i ingredienser og fôr ble bestemt spektrofotometrisk (430nm) etter forasking og syreoppslutning i 6 M HCL (ISO 6491-1998). Løselig P ble bestemt ved spektrofotometriske metode etter inkubering av en definert prøvemengde (0.8 g) i 80 mL 1 N NaOH i 16 t som opprinnelig beskrevet av Ruban *et al.* (2001) og Hua *et al.* (2005), og seinere modifisert og validert av Hovde (2013). Vannløselig NaOH ekstrahert P (ikke beinbundet, løselig P) ble forasket og syreoppsluttet etter samme metode som for total P og skiller seg kun i det første ekstraksjonstrinnet.

Frysetørkede prøver av hel fisk og av et definert segment av ryggraden tatt ut mellom bakre del av ryggfinnen og fremre del av gattfinnen ble analysert for elementene *P, Ca, Mg, Na, K, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Ag, Cd, Sn, Ba, Hg og Pb* ved hjelp av multielement bestemmelse med induktivt koblet plasma-massespektrofotometri (ICP-MS) etter oppslutning i mikrobølgeovn. I korte trekk, den innveide prøvemengde tilsettes konsentrert salpetersyre og hydrogenperoksid og oppsluttes i mikrobølgeovn. Bestemmelsen av elementene gjøres med kvantitativ ICP-MS. Prøveløsning forstøves og føres inn i oppvarmet argongass (plasma, ca 7000 grader). I plasma fordamper løsemiddelet og elementene ioniseres. Ionene føres videre fram til en massesensitiv detektor der valgte masser detekteres som antall treff/sekund. Elementkonsentrasjonene beregnes ved hjelp av ekstern standardkurve.

4.8 Real time qPCR

Det ble gjort studier av genuttrykk for ulike markører knyttet til utvikling av bein, brusk og bindevev for å avdekke eventuelle forskjeller i beinutvikling og mineralisering. Tre fisk *per* kar fra uttak på både 15g og 30g ble brukt til disse analysene, dvs. til sammen ni virvler fra hver fôr-gruppe. RNA ble isolert (Micro to Midi Kit®, Invitrogen) og cDNA syntetisert (Taqman Gold RT-PCR kit, Applied Biosystems) fra hvert individ. To grupper gener ble inkludert i transkripsjonsanalysene, markører for proliferering og produksjon av bein (Runx2, Collagen 1a1, Osteocalcin, Osteonectin og PO4H) og markører for proliferering og modning av brusk (Collagen 2a, Collagen 10a og Mef2c). I tillegg ble MTA inkludert som et mål på mineralstatus i virvlene. Real time qPCR ble utført med SYBR Green på en Light cycler 480 (Roche, Switzerland) på følgende program: 95 °C i 10min, deretter 45 sykler på 95 °C i 15s, 60±1 °C i 15s og 72 °C i 15s. Referansegeneene som ble brukt var elongeringsfaktor *ef1a* og 18s. Rådata ble analysert statistisk ved hjelp av REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

4.9 *In vitro* forsøk med beinceller

For å teste den direkte effekten av hydrolysater på beinutvikling ble beinhydrolysater fra både sild og kolmule brukt i et *in vitro* forsøk med beinceller (osteoblaster) fra Atlantisk laks. Normalt brukes β -glycerophosphate som P-kilde i slike kulturer. I dette forsøket ble derfor β -glycerophosphate byttet

ut med tilsvarende mengde P fra et av beinhydrolysatene, enten ved 100 % utbytting eller 50 % hydrolysat:50 % β -glycerophosphate. Cellene ble deretter dyrket på 12 °C i CO₂-skap (som er vanlig for disse cellene, Ytteborg *et al.*, upublisert) i 2 uker før de ble analysert med real time qPCR. Cellene ble hele veien fulgt mikroskopisk.

4.10 FTIR

Fra hver fôr-gruppe ble snitt parallellt til histologien analysert for beinstruktur ved hjelp av FTIR. Plastsnitt på 8 μ m ble festet til ZnSe glass og analysert ved IRscope II kombinert med et Equinox 55 FTIR spektrometer (Brucker Optics). Spektra ble målt i område 4000 til 750 cm⁻¹ i de vertebrale endeplatene. Data ble behandlet med OPUS-NT software (versjon 4.0) og videre prosessert ved bruk av EMSC i Unscrambler (Camo Process AS, versjon 9.2) for å fjerne baselinje effekter. Mineral/matriks, krystallinitet og kollagen kryssbindinger ble beregnet ved bruk av mathworks (versjon 7.10,) og in-house utviklet algoritme (version 7.10) i MATLAB.

4.11 Histologi

Det ble gjort histologiske undersøkelser for å identifisere forskjeller i differensiering og vekst av celler og vev. I alt 6 virvelprøver (ca 1cm av virvelen fra under ryggfinnen, tilsvarende ca. 5 virvler) fra hver fôr-gruppe ble støpt inn i plast (PMMA) og snittet (5 μ m tykke) (Microm HM 355S, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Virvlene ble snittet slik at området som ble analysert var likt i hver virvel, et område som inkluderte både bein- og bruskstrukturene i virvelen. For histologiske analyser ble snittene deplastifisert, dehydrert og deretter farget med toluidine blue (Merck Chemicals Ltd.). Snittene ble analysert mikroskopisk (Carl Zeiss Microimaging GmbH).

4.12 Enzymer (ALP og TRAP) i ryggbein

Enzymanalysene ble gjort på prøver av 30 g fisk tatt fra et segment av rygggraden foran ryggfinnen og analysene ble utført på en pool av beinhomogenat fra fem fisk per kar. Prøvene ble rensert for nyre-, muskel- og nervevev ved uttaket og frosset i flytende N₂. Frosne prøver ble knust til et pulver i en morter og ca 300 mg ble veid inn og løst i saltløsning (9 g/L NaCl) og videre homogenisert med en stavmikser (Polytron PT2100). Fra dette homogenatet ble det overført 100 μ l til 1 ml ALP buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 CaCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 25 mM glycine, 10 mM para-nitrophenylphosphate, pH 10.2) og 100 μ l til 1 ml TRACP buffer (0.1 M NaCH₃COO, 20 mM C₄H₄KNaO₆·4H₂O, 10 mM para-nitrophenylphosphate, pH 5.3). Disse reaksjonsblandingene ble plassert i en risteinkubator ved 25 °C i én time og deretter stoppet med ved å tilsette 500 μ l NaOH (1 M). Prøveløsningene ble sentrifugert (12000 g, 10 min) og fargeutviklingen målt ved 405 nm (Labsystems iEMS Reader MF®, Helsinki, Finland) med triplikate avlesninger per prøve.

4.1 Vit D metabolitter i plasma

Vitamin D metabolittene, 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) og 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25OH₂D₃) ble analysert vha væskechromatografi og tandem massespektroskopi som beskrevet i Fjelldal *et al.* (2009). I korte trekk, 1 ml plasma ble ekstrahert vha fastfase ekstraksjon (Isolute_MFC18 SPE) og eluert med heptan:2-propanol (93:7), fordampet under N₂ og rekonstituert i 200 μ l methanol:1 M ammoniumacetate:vann (500:2:500) før injeksjon på væskechromatografisystemet. En ekstern

kalibreringskurve ble brukt for å kvantifisere prøvene. Vitamin D hormonene 1,25 OH₂ D₃ og 25 OH₂ D₃ ble målt i plasmaprøver av 30 g fisk og ble utført på en pool av 10 fisk per kar.

4.2 Statistiske analyser

Biologiske data ble statistisk evaluert basert på ANOVA-one way analyse av varians (ANOVA) med STATISTICA software (Ver 7.1, Statsoft, Tulsa, OK, USA). Signifikante forskjeller mellom dietter ble testet ved hjelp av Tukey HSD post-hoc test (Sokal og Rohlf, 1981) med sannsynlighet $P < 0,05$ som signifikansgrense. Pearson korrelasjon og Spearmans rank korrelasjonsanalyse ble videre brukt til å undersøke mulige sammenhenger mellom fôr variabler (P nivå og P kilde) og diettresponser.

5 Resultater

5.1 Fôr

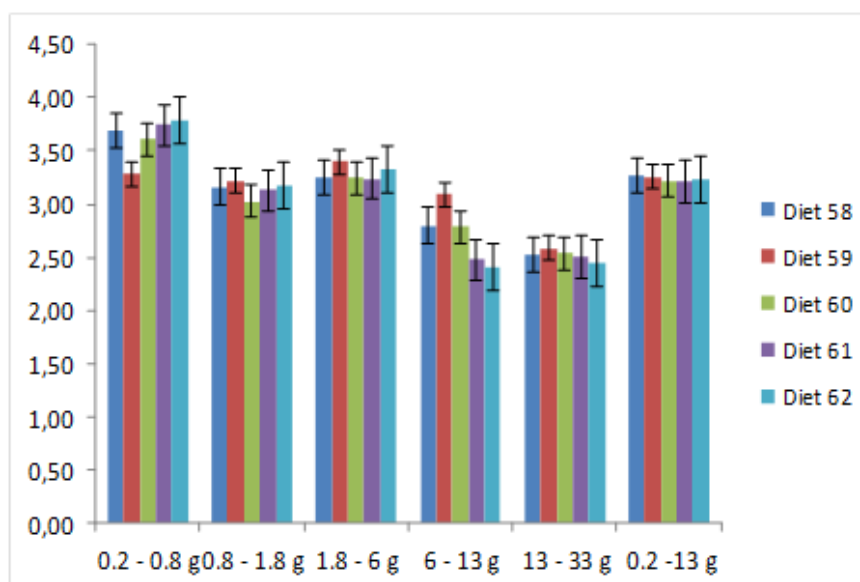
Forsøksdiettene var like med hensyn til kjemisk sammensetting og energiinnhold (Tabell 3) og inneholdt i gjennomsnitt 530 g kg⁻¹ protein, 236 g kg⁻¹ fett og 23,6 KJ g⁻¹ total energi (alle fôr korrigert til 94 % tørrstoff). Diettene viste gradert økte innhold av total P og løselig P omtrent likt for de to P kildene, men litt lavere enn forventet ut fra fôrformulering (Tabell 1a). Tilsynelatende høyere proteininnhold i FBH 1 og FBH 2 skyldes N bidrag fra NH₃-løsningen brukt til å justere pH i FBH.

Tabell 3 Diett sammensetting

Feed	Lav P kontroll	FBH 1	FBH 2	Na-P 1	Na-P 2
Protein (g kg ⁻¹)	516	533	533	519	515
Fett (g kg ⁻¹)	228	237	234	233	233
Vann (g kg ⁻¹)	74	57	77	75	81
Aske (g kg ⁻¹)	64	66	68	68	72
Karbohydrater (g kg ⁻¹)*	118	107	88	105	99
Total P, %	1,06	1,22	1,37	1,20	1,34
Løselig P, %	0,53	0,65	0,81	0,66	0,79
Total energi (MJ g ⁻¹)	23,2	23,8	23,3	23,2	23,1

*Karbohydrater beregnet ved differanse

Tilveksten var gjennomsnittlig 3,62; 3,14; 3,29; 2,71 og 2,52 etter 6, 10, 15, 19 og 24 uker, og 3,24 % totalt i vekstperioden fra 0,2 til 13 g fisk (Fig. 1).



Figur 1 Periodisert tilvekst (SGR, %) i lakseyngel etter 6 (0.8g), 10 (1.8g), 15 (6g), 19 (13g) og 24 (33g) uker, og total SGR for vekstperioden fram til uke 19 (0,2–13g). Diet 58=Lav P kontroll, Diet 59=FBH 1, Diet 60=FBH 2, Diet 61=Na-P 1, Diet 62=Na-P 2.

Med unntak av den innledende 6 ukers fôringsperioden (0.2—0.8g), der FBH 1 viste signifikant redusert tilvekst ($p < 0.05$), så ble det ikke påvist forskjeller i periodisert tilvekst av fisk for noen perioder, eller for tilvekst totalt sett fram til uke 19 (0.2—13 g), ($p > 0.05$). I vekstperioden fra 6 til 13 g er det en tendens til at fisk fôret med P fra FBH vokser best (Fig. 1), mens det innledningsvis kan synes som at fisk fôret med Na-P vokser best.

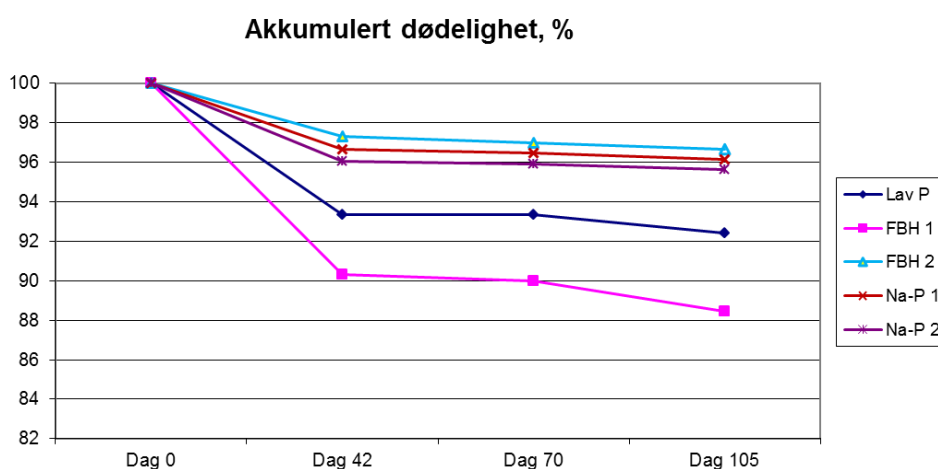
Tabell 4 Gjennomsnittlig vekt av fisk fôret med de 5 eksperimentelle diettene.

Fôr	Vekt Uke 0	Vekt Uke 6	Vekt Uke 10	Vekt Uke 15	Vekt Uke 19	Vekt Uke 24
Lav P	0,17	0,80	1,94	6,04	13,58	32,70
FBH 1	0,17	0,67a	1,66a	5,45	13,39	33,44
FBH 2	0,17	0,78	1,82	5,67	12,75	31,78
Na-P 1	0,17	0,83b	1,99b	6,18	12,67	32,48
Na-P 2	0,17	0,82b	2,00b	6,40	12,86	34,35
ANOVA $p <$	0,50	0,03	0,02	0,12*	0.84	0.18

Snittvekt i populasjon for hver diett viste at fisk fôret med FBH 1 hadde signifikant lavere vekt enn fisk fôret med Na-P ved uttak etter 6 og 10 uker (Tabell 4), og at vekten var lavest også i uke 15. Fisk fôret med FBH 2 vokser bedre, men vekten er lavere enn for fisk fôret med Na-P 1 og Na-P 2 fram til uke 15. Tilveksten for fisk fôret med P fra FBH bedret seg i perioden fra 6 g til 13 g (Fig. 1), og i denne perioden ble det påvist et svært godt vekstresultat sammenlignet med fisk fôret med Na-P.

Dødelighet

I forsøksperioden var det generelt god overlevelse av fisk, med unntak av den første fôringsperioden fra 0.2g til 0.8g (fram til dag 42), der det ble observert 8.9 % dødelighet for fisk fôret med FBH 1 sammenfallende med redusert tilvekst i samme periode (Fig. 2). Avviket skyldes primært negativt resultat for en av triplikatene. Lav P kontroll diett hadde 6.1 % dødelighet i denne perioden, mens fisk fôret med de øvrige diettene viste dødelighet som varierte fra 2.5 til 3.6 %. Dødeligheten totalt sett var 6.5, 10.7, 3.8, 3.8 og 4.3 % for *Lav P kontroll*, *FBH 1*, *FBH 2*, *Na-P 1* og *Na-P 2*. Det ble kun registrert 4 døde fisk i vekstperioden fra Dag 105 (6 g) til uke 24 (33 g).



Figur 2 Akkumulert dødelighet (vist som % overlevelse) av lakseyngel i vekstperioden fram til dag 42 (0.8g), dag 70 (1.8g), og dag 105 (6g) for alle fôrgrupper (Lav P, FBH 1, FBH 2, Na-P 1, Na-P 2).

5.2 Røntgenevaluering

Røntgen av fisk på 1g størrelse viste ingen identifiserbare forskjeller mellom fôrgruppene på dette stadiet. Fisken var for liten til å få gode detaljbilder. I fisk fra seinere uttak (6g, 15g og 30g) var det tre typer avvik fra det normale som dominerte; fusjoner (Figur 3, Witten *et al.*, 2006), høytetthets (HD) virvler (Figur 5, Helland *et al.*, 2006) og avvik i ganebeinets bue (Figur 7). Tabell 5 gir en oversikt over variasjon mellom de ulike diettene. Det ble påvist systematiske forskjeller knyttet til mineralisering av virvler, der fisk fra Lav P diett hadde tydelige tegn på en gjennomgående undermineralisering av skjelettet i form av spinkle og smale virvler med forstørrede mellomrom. I samme fôrgruppe ble det også observert krøllete ribbein og virvelbuer (Figur 6), og unormale underkjever (Figur 8) som antas å være tidlige stadier av hakeslepp.

Tabell 5 Oversikt over resultater fra røntgenevaluering ved 6g, 13g og 30g (avslutning). For referanse til de ulike kategorier, vennligst referer til tekst. Verdier er gitt som gjennomsnitt av snittverdier per 3 kar ± standardfeil.

6g	Fôr	Fisk med avvik	Fusjoner	HD-virvler	Ganebein	Undermineralisering
	Lav P kontroll	18,3*	1,7	0	16,7*	Ja
	FBH 1	5,0	3,3	0	0	Nei
	FBH 2	3,3	1,7	0	0	Nei
	Na-P 1	0,0	0,0	0	0	Nei
	Na-P 2	1,7	1,7	0	0	Nei

13g	Fôr	Fisk med avvik	Fusjoner	HD-virvler	Ganebein	Undermineralisering
	Lav P kontroll	45,3*	0 ^a	24,0*	29,3*	Ja
	FBH 1	1,3	1,3 ^{ab}	0	0	Nei
	FBH 2	2,7	2,7 ^{ab}	0	0	Nei
	Na-P 1	5,3	5,3 ^a	0	0	Nei
	Na-P 2	4,0	4,0 ^{ab}	0	0	Nei

30g	Fôr	Fisk med avvik	Fusjoner	HD-virvler	Ganebein	Under-mineralisering
	Lav P kontroll	58,9*	2,2	31,1*	32,2*	Ja
	FBH 1	2,2	1,1	0	0	Nei
	FBH 2	4,4	2,2	1,1	0	Nei
	Na-P 1	3,3	1,1	2,2	0	Nei
	Na-P 2	0	0	0	0	Nei

*p<0,05

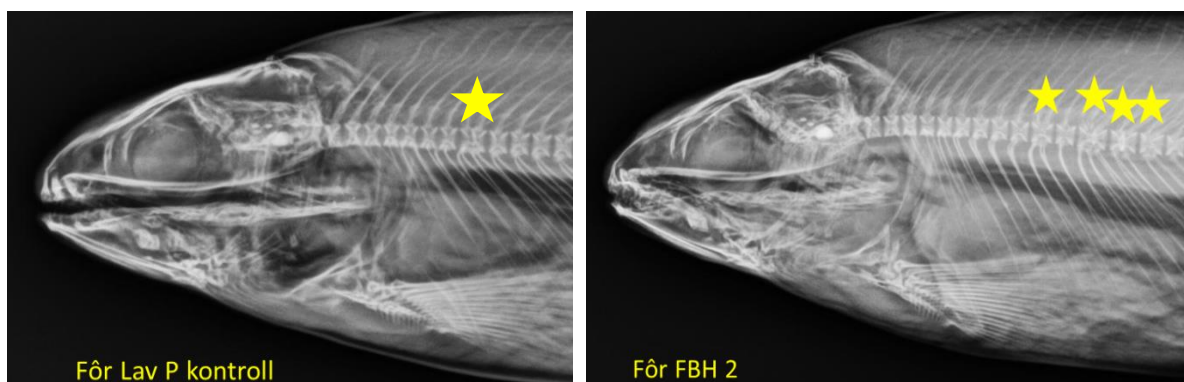
Ved 6 g størrelse var det få registrerbare feil i ryggvirvlene. Det var et lite antall fisk med fusjoner, fordelt på 4 av 5 fôrgrupper. Det ble ikke observert HD-virvler på denne størrelsen. Det var et tydelig innslag av fisk med avvikende form på ganebeinet, alle i fôrgruppe Lav P kontroll. I samme gruppe hadde alle individer også preg av undermineralisering i form av spinkle og smale virvler med forstørrede mellomrom, som illustrert i figur 4a.

Ved 13 g størrelse ble det påvist avvik i skjelettet hos 45 % av fisken fra fôrgruppe Lav P kontroll. 24 % av individene hadde synlige HD-virvler, og 29 % hadde avvik i ganebuen. Disse symptomene ble ikke funnet hos de andre fôrgruppene. All fisk fra fôrgruppe Lav P kontroll hadde også det typiske

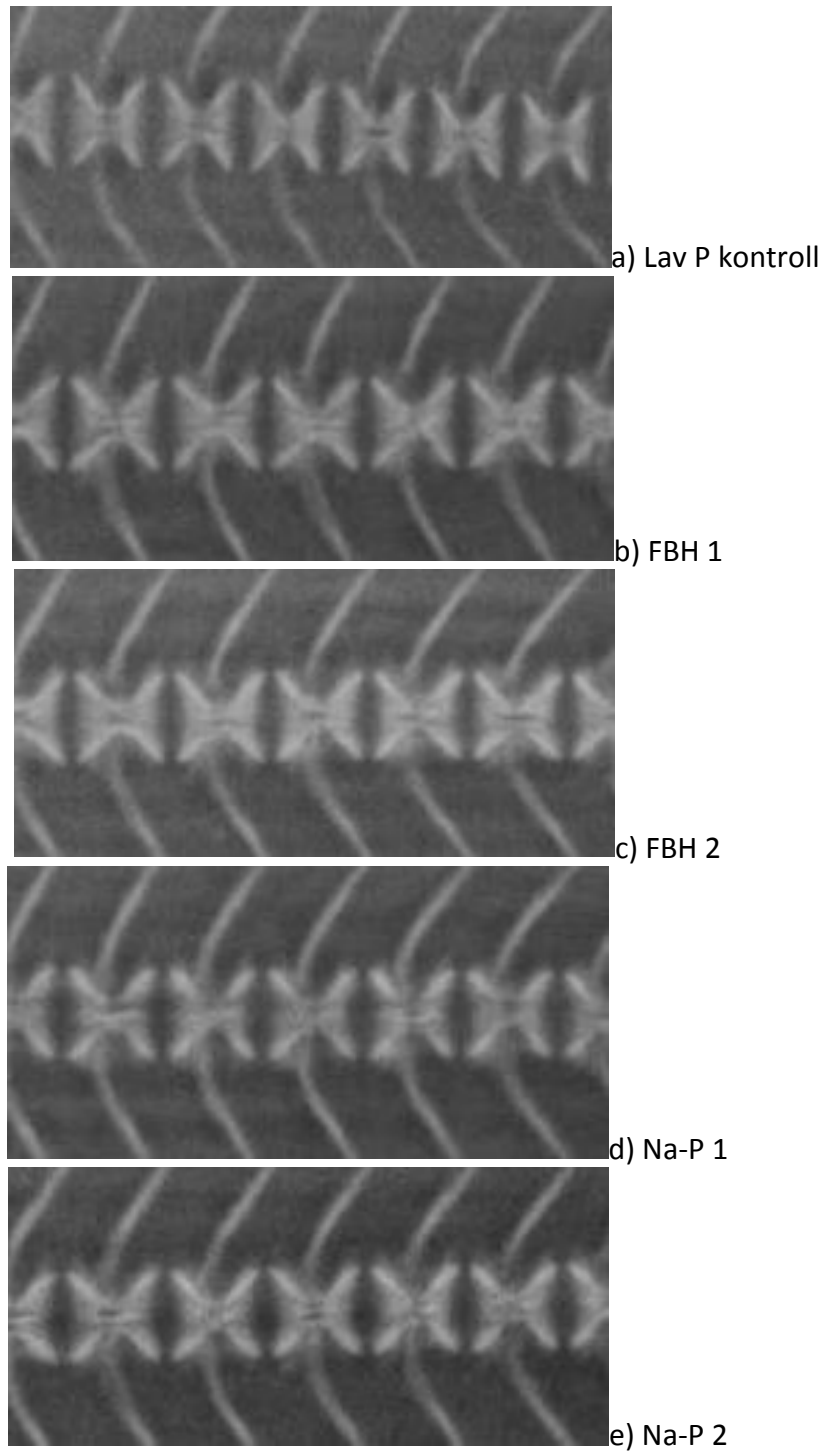
preget av undermineralisering i form av spinkle, smale virvler med forstørrede virvelmellomrom (Figur 4a). I tillegg ble det gjennomgående observert krøllete ribbein og virvelbuer. Bildekvaliteten var ikke god nok på alle bildene til at dette kunne registreres sikkert, men dette ble observert i alle bilder med tilstrekkelig kvalitet. Det var et lavt innslag av fisk med fusjoner i fôrgruppe FBH 1 og 2 og Na-P 1 og 2, men ingen i fôrgruppe Lav P kontroll.

Ved 30g størrelse (avslutning, etter utsortering av undermåls fisk ved 15g) var antall fisk med avvik økt til 59 % i fôrgruppe Lav P kontroll. 31 % av fisken hadde HD-virvler, og 32 % hadde avvik i ganebuen. På samme måte som ved 15g ble det observert spinkle og smale virvler (all fisk), og krøllete ribbein og virvelbuer (der bildekvaliteten var tilstrekkelig til at det kunne bedømmes). Ved dette uttaket ble det registrert forekomst av HD-virvler også i fôrgruppe FBH 2 (1 %) og NA-P 1 (2 %). Innslaget av fusjoner var, som tidligere, lavt og fordelt på fôrgruppene.

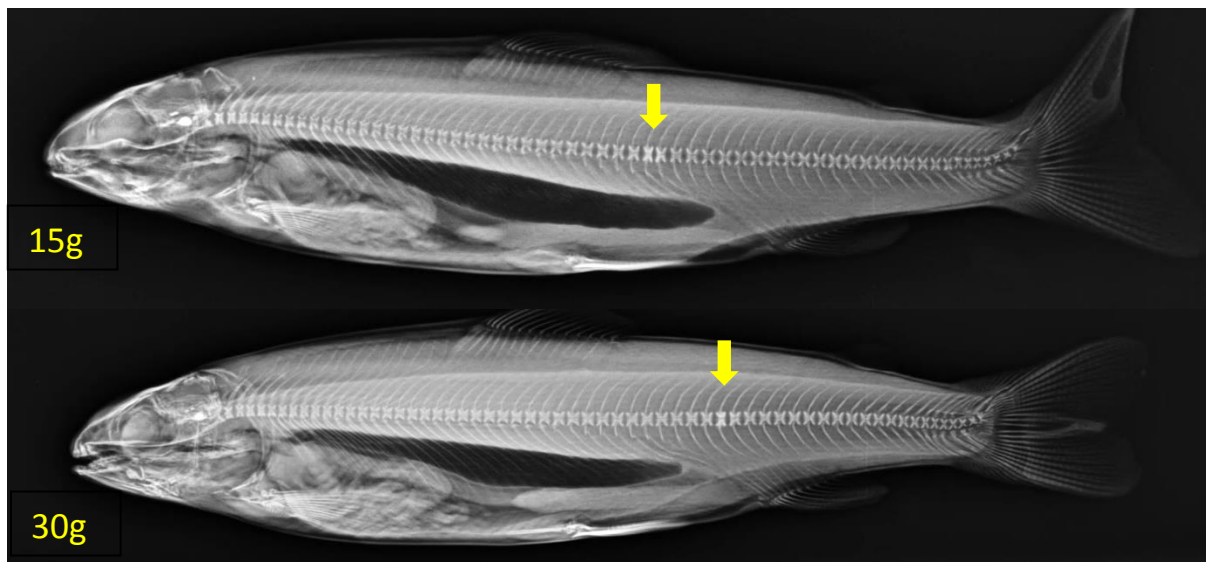
I sum viste røntgenanalysene tydelige tegn på undermineralisering hos fisk i fôrgruppe Lav P kontroll (uten tilsetning av P). De første symptomene var registrerbare ved 6g størrelse, og innslaget var økende ved 15g og 30g størrelse. Det var noen få enkeltindivider med HD-virvler i fôrgruppe FBH 2 og Na-P 1 ved 30g størrelse. Ut over dette ble det ikke registrert forskjeller mellom de øvrige diettgruppene, og det var ingen spesielle funn knyttet til fisk fôret med beinhydrolysat (fôrgruppe FBH 1 og FBH 2). Forekomsten av fusjoner var lavt, og tilsynelatende tilfeldig fordelt mellom fôrgruppene.



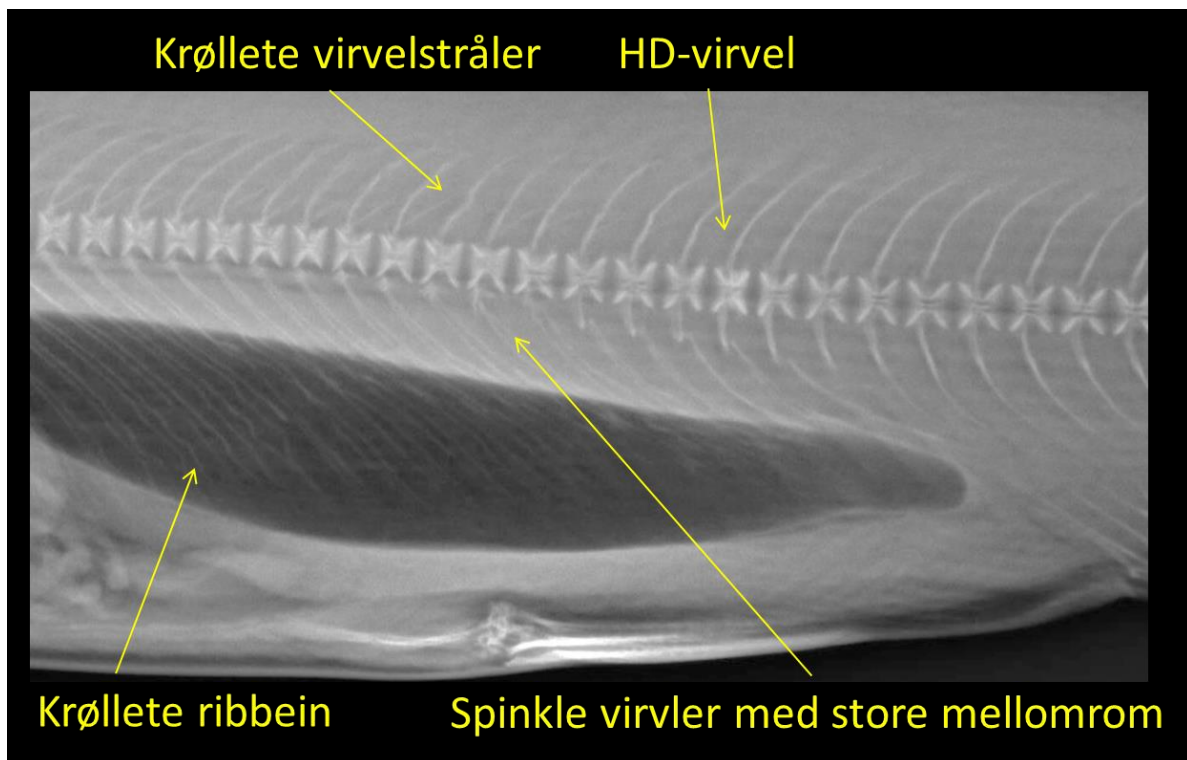
Figur 3 Fusjoner i fremre del av ryggspylen hos laks fra fôrgruppe Lav P kontroll (venstre, en enkel fusjon) og fôrgruppe FBH 2 (høyre, flere fusjoner i rekke). Fusjoner er merket med stjerne.



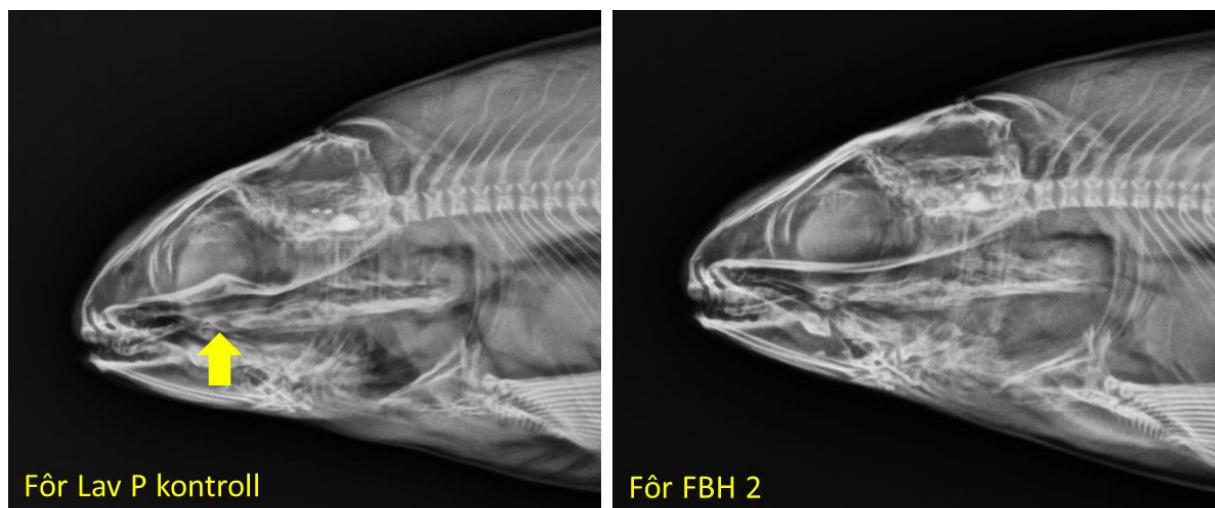
Figur 4 *Detalj av virvler fra gattområdet fra de fem fôrgruppene, fra fisk tatt ut ved 15g størrelse. Virvlene fra fisk a) er mindre av størrelse, smalere, og har større virvelmellomrom. Virvlene fra b-e framstår som normalt mineralisert og ganske like.*



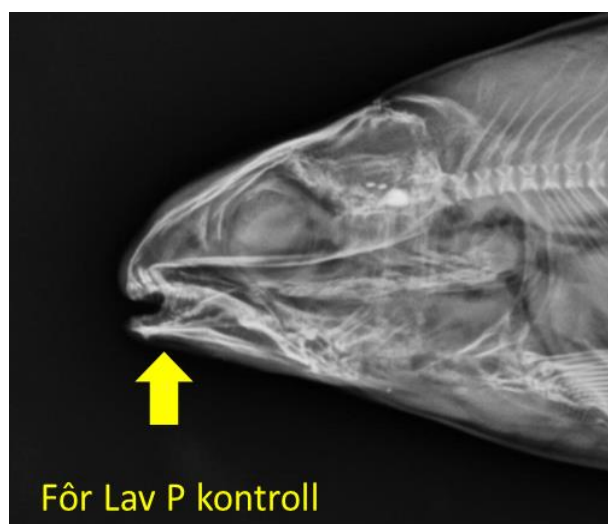
Figur 5 HD-virvler i fisk fra fôrgruppe Lav P kontroll. HD-virvlene er merket med piler.



Figur 6 Morfologiske observasjoner i lakseyngel som følge av nedsatt mineralisering i fisk fôret med Lav P kontroll diett – bildet illustrerer klassiske P mangel symptomer.



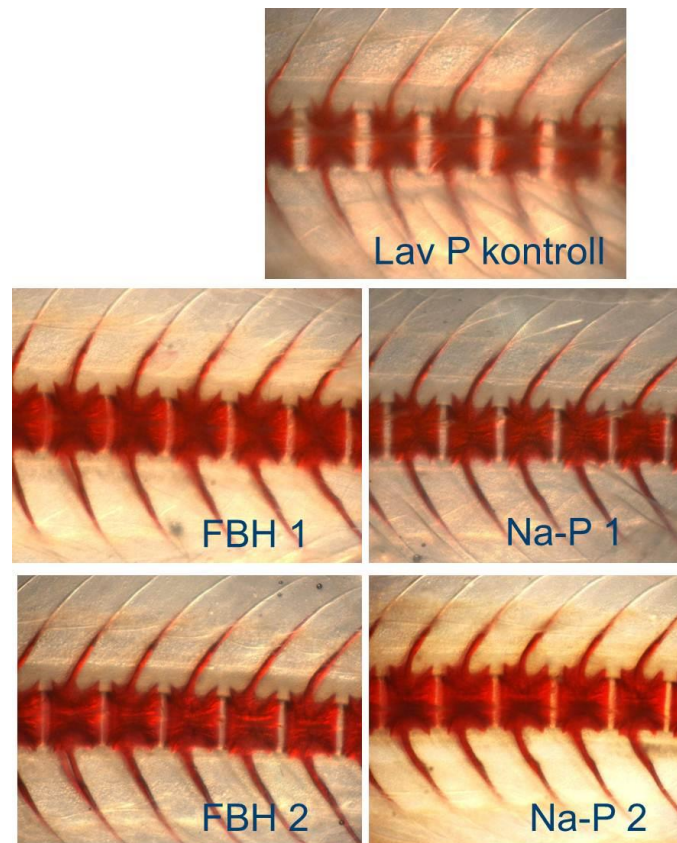
Figur 7 Avvik i ganebeinets bue hos fisk fra fôrgruppe Lav kontroll P, 15 g (venstre). Normal fisk fra fôrgruppe FBH 2 til høyre.



Figur 8 Feil vinkel på underkjeven hos fisk fra fôrgruppe Lav P kontroll (30g). Dette er sannsynligvis et forstadium til hakeslepp hos større fisk. Sammenlikn med normal kurve på underkjeven hos de to individene i Figur 7.

5.3 Helkroppsfarging med Alizarin rød og Alcian blå

Beininnfarget fisk fôret med Lav P diett viste klare symptomer på undermineralisering ved 15 ukers uttaket (6 g fisk), med mindre ryggvirvelstørrelse og større distanse mellom virvlene (Figur 9). I tillegg var lengden på de mineraliserte neural- og hemalbuene kortere (Figur 9). De øvrige fôrgruppene framsto som like, og tilsynelatende normalt utviklet og mineralisert. Det ble ikke påvist forskjeller i mineralisering basert på ulike P kilder (FBH vs Na-P) og P nivå. Det ble heller ikke funnet klare dietteffekter av P nivå eller P kilder for bruskinnfargede fisk ved 6 ukers uttaket (1 g fisk).



Figur 9 Detaljer av ryggstøyle over analfinnen hos Atlantisk laks innfarget spesifikt for mineralisert beinvev.

5.4 Ytre velferdsindikatorer

En relativt stor andel av fisken hadde en eller flere avvik eller skader, først og fremst i finner og gjellelokk, men de fleste skadene var av moderat grad og ga lav score verdi (Tabell 6).

Tabell 6 Registrering av ytre velferdsindikatorer. «Fisk med anmerkninger» omfatter fisk som har en eller flere anmerkninger som gjelder finner, skinn og skjellkleddning eller øye. N=47-55 fisk per kar, 3 kar per fôrgruppe. Verdier er angitt som middeltall per fôrgruppe \pm standardfeil for middeltallet.

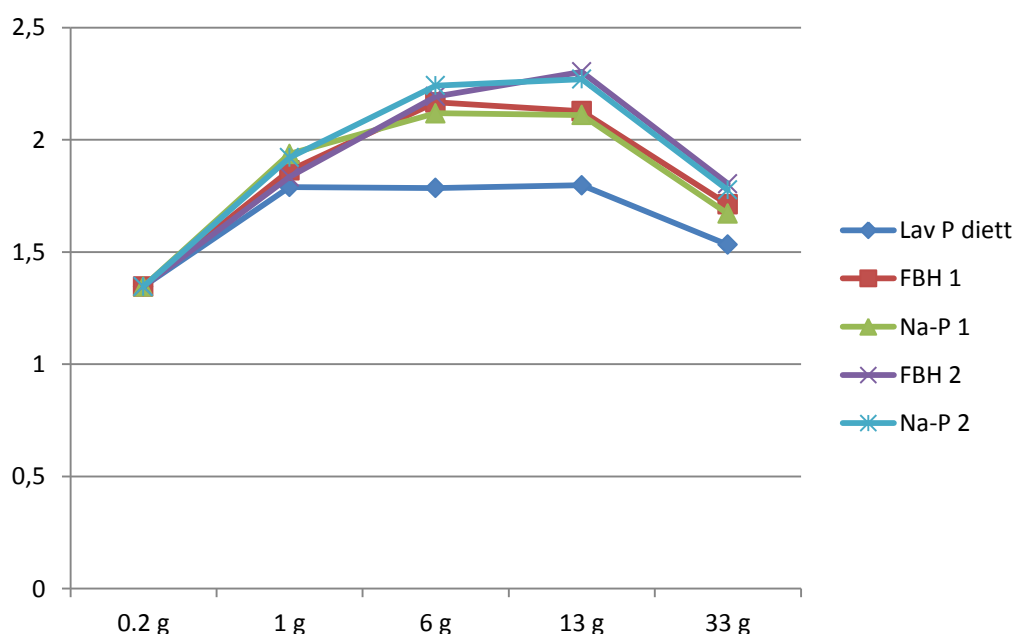
	Fisk med anm. (%)	Anm. gjellelokk (% av fisk)	Anm. gjellelokk (score)	Anm. ryggfinne (% av fisk)	Anm. ryggfinne (score)
Lav P kontroll	40 \pm 8,3	22 \pm 1,8	0,33 \pm 0,08	14 \pm 6,6	0,31 \pm 0,14
FBH 1	42 \pm 9,6	12 \pm 5,6	0,23 \pm 0,09	27 \pm 12,0	0,52 \pm 0,26
FBH 2	59 \pm 5,2	15 \pm 5,8	0,25 \pm 0,13	40 \pm 4,2	0,90 \pm 0,12
Na-P 1	50 \pm 4,7	17 \pm 5,6	0,38 \pm 0,15	17 \pm 7,2	0,56 \pm 0,14
Na-P 2	54 \pm 4,4	18 \pm 1,8	0,45 \pm 0,04	32 \pm 7,0	0,61 \pm 0,14

For bukfinner ble det gjort anmerkning for 0,7- 5,1 % av fisken i de ulike fôrgruppene, for brystfinner for 8,4-14 %. Det ble ikke observert andre skader eller misdannelser. Det var stor variasjon i verdiene, både antall fisk innen hver kategori og gjennomsnittlig score, men ingen signifikante forskjeller. Det var ikke noe klart mønster i verdiene knyttet til fôr, verken i forhold til Lav P kontroll eller de to fôrene med fiskebeinhydrolysat, FBH 1 og FBH 2.

5.5 Aske og mineraler i hel fisk og i bein

5.6 Aske i hel fisk

Askeinnholdet i hel fisk økte jevnt og var gjennomsnittlig 1.35, 1.87, 2.10 og 2.12 % for alle fiskegrupper ved start (0.17g), 1g, 6g og 13 g størrelse, mens det ble observert 20 % lavere askeinnhold, gjennomsnittlig 1.70 % aske, i 33 g fisk (Fig. 10, Tabell 7). Diettforskjellene mht P nivå i før begynte å etablere seg allerede i 1 g fisk, og fisk føret med lav P kontroll diett viste deretter klart lavest og signifikant forskjellig askenivå sammenlignet med alle andre dietter ved alle uttak ($p < 0.05$), Tabell 7. Diettforskjellene hos fisk som fikk tilført høyere P nivå var ikke så veldig tydelige for 6 g fisk, selv om det ble funnet signifikante forskjeller mellom Na-P 1 og Na-P 2 ($p < 0.05$). Ved uttaket for 13 g fisk ble det funnet signifikante diettforskjeller for P nivå ($p < 0.05$) men ingen forskjell mellom de to P kildene ($p > 0.05$). Ved avslutning av forsøket (33 g) ble det ikke påvist klare diettforskjeller verken med hensyn til P nivå eller P kilder ($p > 0.05$), selv om FBH 2 var signifikant forskjellig fra Na-P 1 ($p < 0.05$).



Figur 10 Aske (% vv) i lakseyngel ved start (0.2 g), og etter 6 uker (0.8 g), 15 uker (6 g), 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

Tabell 7 Aske i lakseyngel (%) oppgitt som gjennomsnitt for hver diett. Statistiske forskjeller er vist ved ulike bokstaver innen hver kolonne, og med signifikansverdi basert på ANOVA oneway analyse.

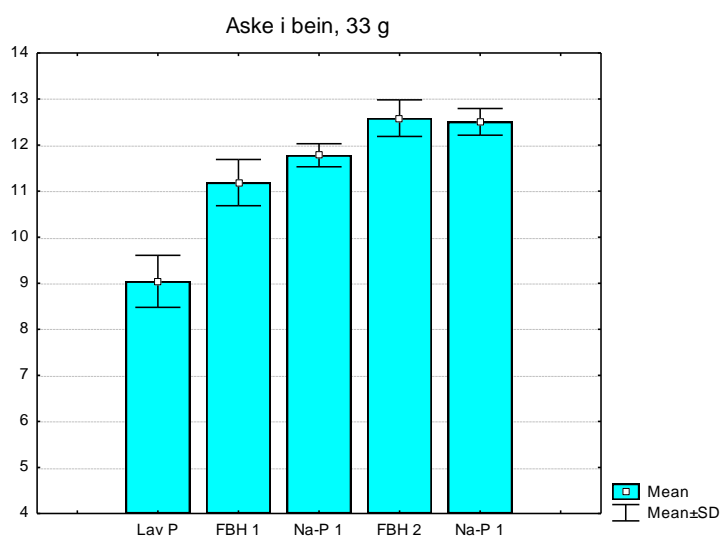
Fôr	Aske i hel fisk, %				
	0.2 g	1 g	6 g	13 g	33 g
Lav P diett	1,35	1,79*	1,78a	1,80a	1,53a
FBH 1	1,35	1,86	2,17bc	2,13b	1,71bc
FBH 2	1,35	1,83	2,19bc	2,30c	1,80c
Na-P 1	1,35	1,94	2,12b	2,11b	1,67b
Na-P 2	1,35	1,92	2,24c	2,27c	1,77bc
Anova P <		0,06	0,01	0,01	0,01

5.6.1 Aske i ryggbein

Askeinnholdet i ryggbein ble analysert for 13 og 33 g fisk, og var i snitt 10,3 og 12,0 % for alle grupper. Diettforskjellene mht P nivå i fôr begynte å etablere seg i 13 g fisk, men det var kun fisk fôret med lav P kontroll diett som var signifikant forskjellig fra de andre diettene ($p < 0.05$), Tabell 8. Ved avslutning av forsøket, etter at fisken var sortert (33 g fisk), ble det funnet signifikante P nivå forskjeller for FBH ($p < 0.05$), mens forskjellene var litt mindre uttalte for Na-P ($p > 0.05$), Tabell 8. Gjennomsnittlig ble det funnet omtrent 10 % mer aske i bein hos fisk fôret med det høyeste P nivået, selv om forskjellene ikke var signifikant for alle dietter (Figur 11). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom de to P kildene relativt til P nivå i fôr ved noen av uttakene ($p > 0.05$), Tabell 10.

Tabell 8 Aske i bein (%) oppgitt som gjennomsnitt for hver diett. Statistiske forskjeller er vist ved ulike bokstaver innen hver kolonne, og med signifikansverdi basert på ANOVA oneway analyse.

Fôr	Aske i bein, %	
	13 g	33 g
Lav P diett	7,17a	9,04a
FBH 1	9,67b	11,19b
FBH 2	10,57b	12,59c
Na-P 1	9,83b	11,78bc
Na-P 2	11,16b	12,51c
Anova P <	0,01	0,01



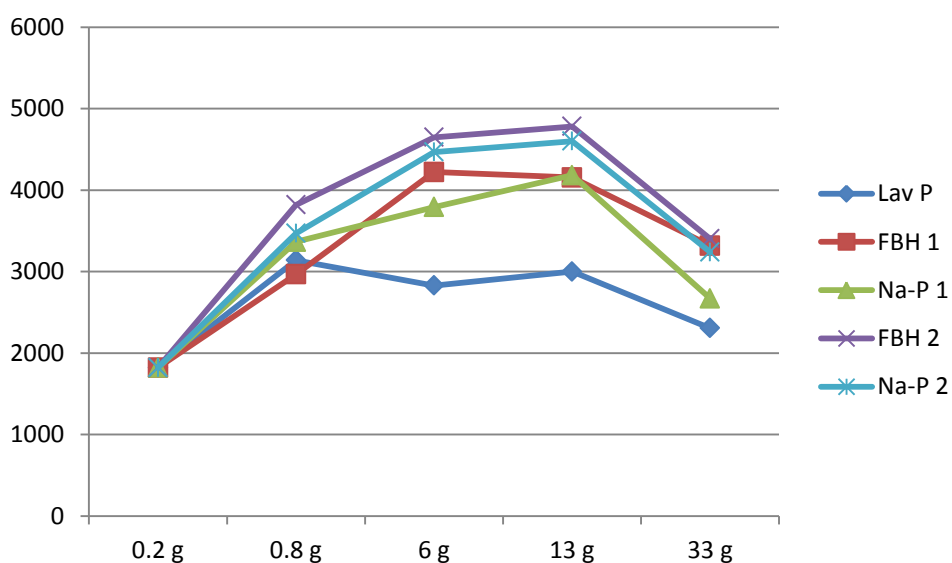
Figur 11 Aske (% vv) i bein oppgitt som gjennomsnitt for hver diett etter 24 ukers fôring (33 g uttak). Resultatene er organisert etter økende P nivå for henholdsvis FBH og Na-P.

5.6.2 Makromineraler og Ca:P ratio i lakseyngel

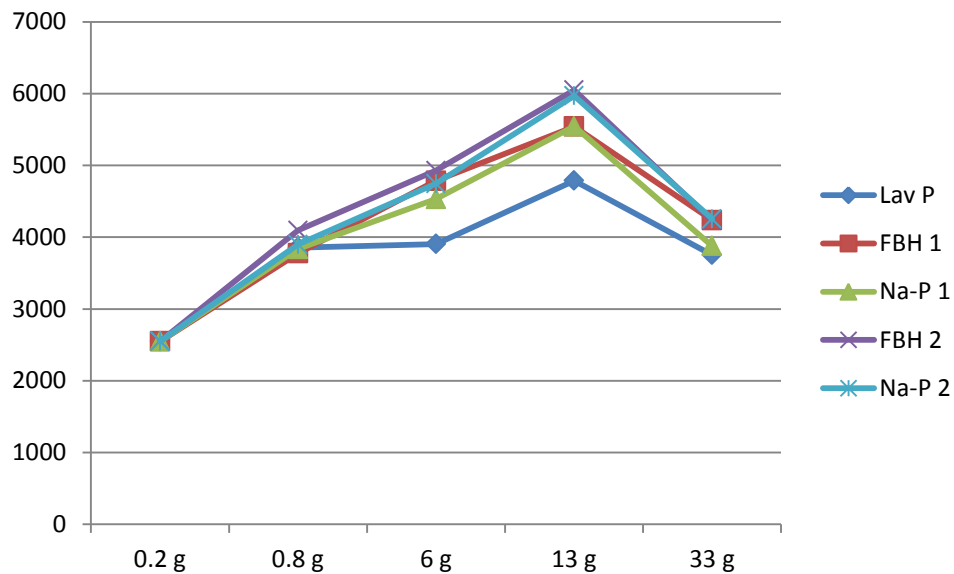
Alle resultat for aske, makro- og mikromineraler i hel fisk er presentert i Appendix A2 – A4 som gjennomsnitt for hver diett. Resultatene er behandlet med ANOVA P analyser, og statistiske forskjeller er angitt. De viktigste resultat og diettforskjeller knyttet til P nivå eller P kilde er beskrevet for utvalgte mineraler i dette kapittel.

Diettforskjellene mht P nivå i fôr begynte å etablere seg i 1 g fisk, og fisk fôret med lav P kontroll diett viste fra dette tidspunkt signifikant lavere nivå av makromineraler i hel fisk sammenlignet med alle andre dietter fram til 13 g størrelse ($p < 0.05$), Appendiks A2. Deponeringen av Ca og P i lakseyngel synes å følge ulike forløp. Ca deponeringen reflekterte variasjonen i aske bedre enn P, som i større grad viste et lineært forløp og en gradvis fosforylering av vevet fram til 13 g størrelse. Det ble funnet økt deponering av Ca og P i yngel fram til 13 g størrelse, med etablerte forskjeller i mineralnivå relativt til diett P nivå ($p < 0.05$) men ikke til P kilde ($p > 0.05$) for 13 g fisk (Fig. 12 og 13).

Innledningsvis, i vekstperioden fra 0.2 til 0.8 g, økte Ca nivået mest i hel fisk, gjennomsnittlig 84 %, mens P deponeringen var lavere (gjennomsnittlig 53 %). Ca deponeringen reflekterte variasjonen i diett P nivå best, med henholdsvis 74 og 100 % økt Ca nivå for de to gradert økte P nivå relativt til Ca nivået ved start, mens tilsvarende forskjell var 49 og 57 % for P. I perioden fra 0.8 til 6 g var opptaket av de to mineralene i hel fisk omtrent like, med henholdsvis 26 og 21 % økt nivå for Ca og P i snitt for begge P kildene. I perioden fra 6 til 13 g synes det å foregå en aktiv fosforylering av hel fisk (gjennomsnittlig 22 % økt P), mens det ble registrert små endringer i Ca deponering (gjennomsnittlig 4 %). Selv fisk fôret med Lav P diett økte P nivået med 23 % i denne perioden. I den siste vekstperioden fra 13 til 33 g, ble det registrert en fortynning av både Ca og P i hel fisk, i respons til økende muskelvekst i fisken (Fig. 12 og Figur 13). Ca og P nivå i lakseyngel ble redusert med gjennomsnittlig 28 og 27 % for alle fôrgrupper i denne perioden, hvilket medførte at Ca:P ratio ikke ble endret i denne perioden (Figur 14).

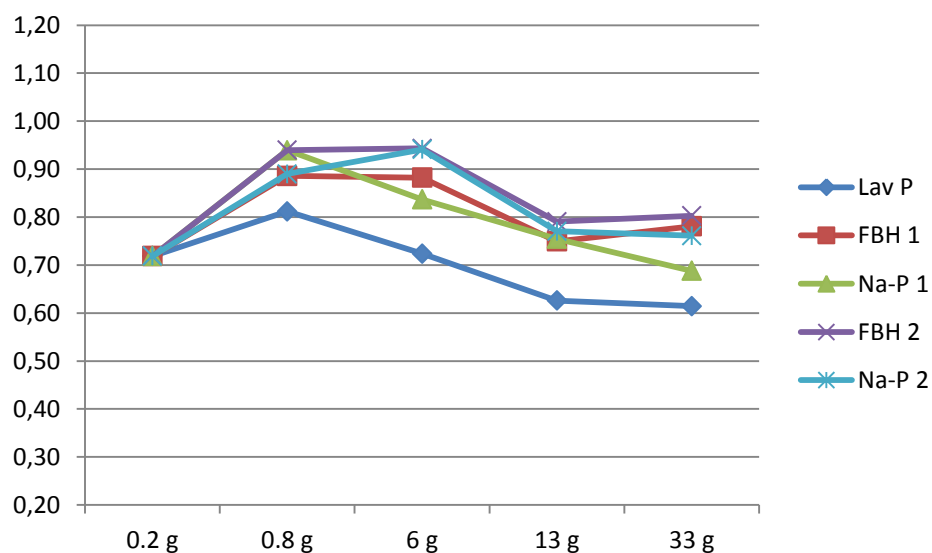


Figur 12 Ca (% vv) i lakseyngel ved start (0.2 g) og etter 6 uker (0.8 g), 15 uker (6 g), 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.



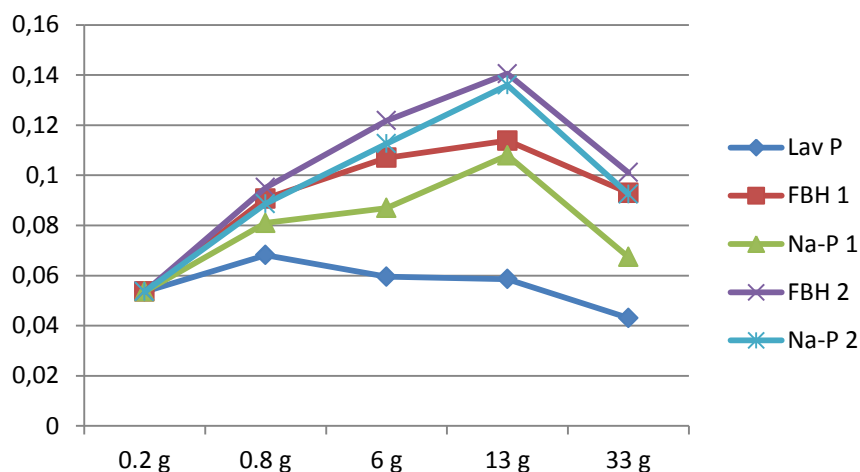
Figur 13 P (% vv) i lakseyngel ved start (0.2 g) og etter 6 uker (0.8 g), 15 uker (6 g), 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

Variasjonen i Ca og P opptak i hel fisk i de ulike vekstperiodene påvirket Ca:P ratio gjennom yngelperioden (Fig. 18). Ca:P ratio var signifikant lavest for Lav P diett ved 6, 13 og 33 g uttakene ($p < 0,05$). Fisk fra de øvrige diettene som fikk ekstra tilførsel av P uavhengig av P kilde (FBH eller Na-P), økte Ca:P ratio fra 0,72 ved start til gjennomsnittlig 0,91 og 0,92 ved 0,8 g og 6 g uttakene. Økt fosforylering i perioden fra 6 til 13 g, reduserte Ca:P ratio for 13 g fisk til et omtrent likt nivå uavhengig av P kilde ($P > 0,05$). Ved avslutning av forsøket (33 g uttak) ble det heller ikke påvist diettforskjeller i Ca:P ratio med hensyn til P nivå eller P kilder ($p > 0,05$), selv om Na-P 1 var lav og ikke forskjellig fra lav P kontroll diett for 33 g fisk ($p < 0,05$).



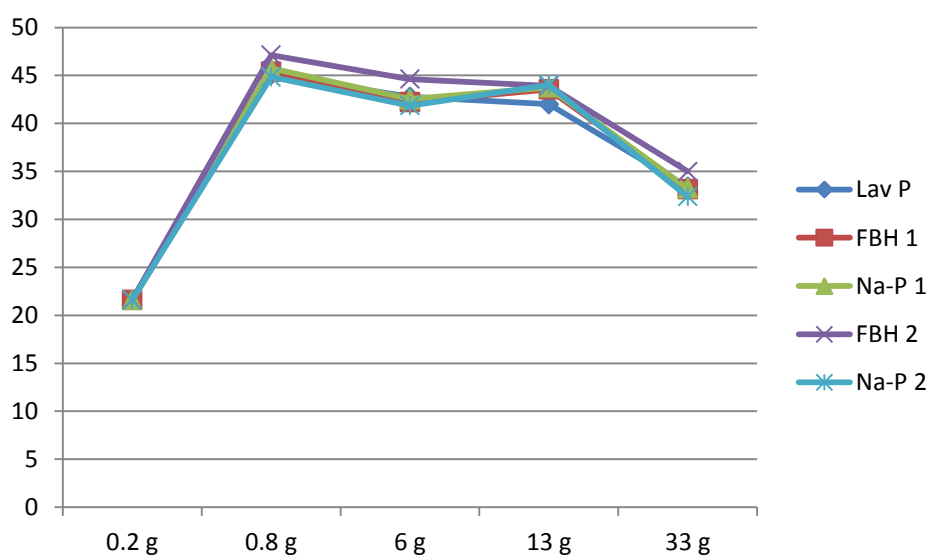
Figur 14 Ca:P ratio i lakseyngel fra start (0.2 g) og etter 6 uker (0.8 g), 15 uker (6 g), 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

Aske innhold, Ca:P ratio og makromineralene Ca, P, Mg og Sr korrelerer sterkt i lakseyngel ($p < 0.05$), og det ble også funnet en signifikant positiv korrelasjon for mikromineralene Mn, Fe, Co og Ba relativt til aske og makromineraler ved uttak for 6g, 13 g og 33 g fisk. Det sporelement som klarest reflekterte variasjonen i diett P nivå uavhengig av P kilde var Ba, som vist i Fig 15.



Figur 15 Ba (mg/kg) i lakseyngel ved start (0.2 g) og etter 6 uker (0.8 g), 15 uker (6 g), 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

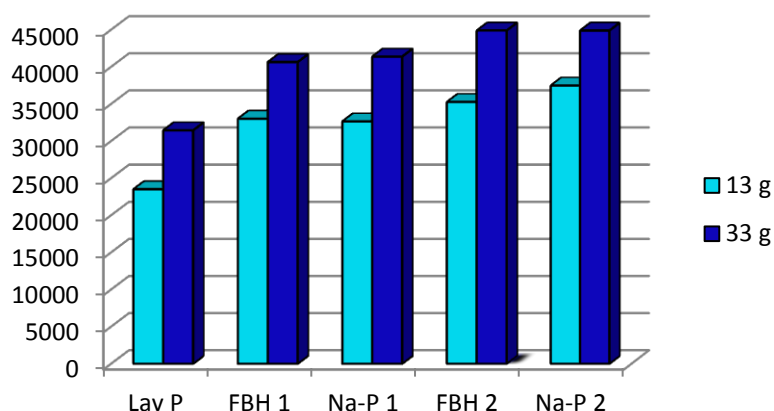
Det ble ikke funnet signifikante diettforskjeller for andre sentrale mikromineraler som Zn, Cu og Se ved 6g, 13g og 33 g uttak. Zn er et sentralt element i skjelettutvikling, og variasjonen for Zn i hel fisk gjennom forsøket er derfor vist i Figur 16. I den første vekstperioden fra 0.2 g til 0.8 g skjer det et aktivt opptak og mer enn en dobling av Zn innhold i lakseyngel. Zn nivået holder seg deretter relativt stabilt og likt for alle fôrgrupper fram til 13 g størrelse, og blir så fortynnet med 23 % i den neste perioden fram til 33 g størrelse i likhet med makromineralene - uavhengig av diett P nivå og P kilde.



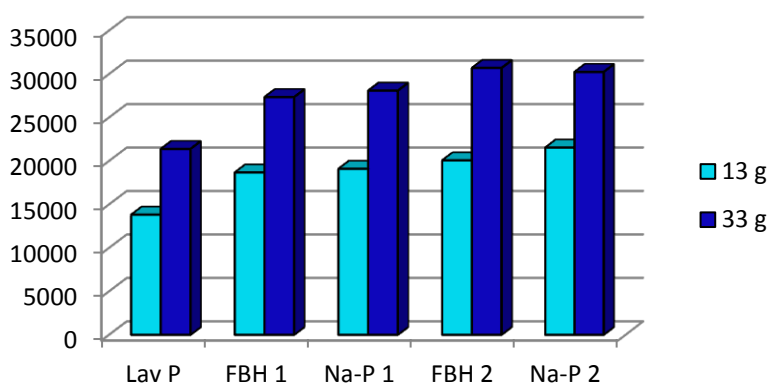
Figur 16 Zn (mg/kg) i lakseyngel ved start (0.2 g) og etter 6 uker (0.8 g), 15 uker (6 g), 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

5.6.3 Makromineraler og Ca:P ratio i ryggbein

Alle resultat for makro- og mikromineraler i ryggbein (13 g og 33 g fisk) er presentert i Appendix A5 og A6 som gjennomsnitt for hver diett. De viktigste resultat og diettforskjeller knyttet til P nivå eller P kilde er beskrevet for utvalgte mineraler i dette kapittel. Ca og P nivå i laksebein ved uttak for 13 og 33 g fisk er vist i Fig 17 og 18. Det ble funnet forskjeller i mineralisering av ryggbein relativt til P nivå i fôr ($p < 0.05$), men ikke til ulike P kilder ($p > 0.05$). Mineraliseringen av Ca og P i bein økte fra 13 til 33 g med gjennomsnittlig 26 og 48 % for Ca og P i alle fôrgrupper, og økningen var størst hos fisk fôret med Lav P diett, henholdsvis 34 og 55 %. Makromineraler i bein viste at fisk fôret med Lav P diett likevel hadde signifikant lavere nivå av aske, Ca, Mg og P ($p < 0,05$), og for mikromineralene Mn, Fe, Co, Sr og Ba ($p < 0,05$) ved uttak for 13 og 33 g fisk. Det ble ikke funnet signifikante diettforskjeller relativt til P nivå for makromineraler i 13 g fisk, med unntak av Mg i fisk fôret med Na-P ($p < 0,05$), men det var tydelige indikasjoner på nivåforskjeller ($p > 0,05$). Ved avslutning av forsøket (33 g) ble det funnet signifikante forskjeller relativt til diett P nivå for aske, P og Mg i fisk fôret med FBH ($p < 0,05$) mens nivåforskjeller ikke var signifikant i fisk fôret med Na-P ($p > 0,05$). Sr og Ba var de to elementene som mest tydelig reflekterte makromineralnivå i bein, og som viste signifikante diettforskjeller relativt til P nivå ($p < 0,05$) men ikke til P kilde ($p > 0,05$).

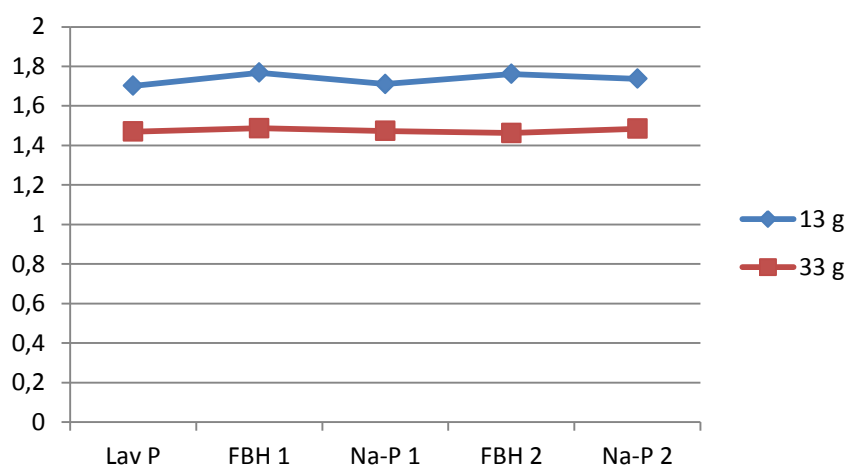


Figur 17 Ca (mg/kg) i ryggbein etter 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.



Figur 18 P (mg/kg) i ryggbein etter 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

Den høyere deponeringen av P relativt til Ca i vekstperioden fra 13 til 33 g reduserte Ca:P ratio i bein med 15 % fra gjennomsnittlig 1.74 (13 g) til 1.48 (33 g), Fig. 19. Det ble ikke påvist noen diettforskjeller i Ca:P ratio i bein ved uttak for 13 g og 33 g fisk ($p > 0.05$).



Figur 19 Ca:P ratio i ryggbein etter 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk.

Nivået av aske i ryggbein økte med 18 %, samtidig som mineralene Ca, P, Mg, Mn, Fe, Co, Sr og Mo i ryggbein økte med 25–85 % i perioden fra 13 til 33 g størrelse (175 % for Fe), Appendiks A5. Økningen var moderat for Cu og Ba (10 %), mens det ble funnet svakt redusert nivå av Zn og As (6 %) og Se (30 %). Elementer som ikke viste diettvariasjon relativt til P nivå eller P kilder ved 13 og 33 g uttak for bein var Zn, Cu, As, Se, og tungmetallene Hg, Pb og Cd (Appendiks A6). Zn i bein korrelerte positivt til aske, Ca, Mg, P, Mn, Fe, Co, Sr og Ba ved 13 g uttak ($p < 0,05$) og til aske, Mg og Sr ved 33 g uttak ($p < 0,05$). Sporelementet V økte signifikant med økende Na-P nivå i fôret ($p < 0,05$), mens tilsvarende ikke ble funnet for FBH, noe som tyder på at V bidraget kommer fra Na-P ingrediensen.

5.6.4 Na og K i bein

Det ble ikke funnet diettforskjeller for Na og K i ryggbein ved 13 g uttak ($p < 0.05$), mens for 33 g fisk ble det funnet gradert økt Na nivå i bein med økende P nivå i fôret. Diettforskjellene var signifikante mellom lav P diett og de to diettene som fikk høyest P nivå fra FBH og Na-P ($p < 0.05$). Det ble ikke påvist forskjeller i respons mellom de to ulike P kildene.

5.6.5 Tungmetaller:

Nivået av Cd ($< 0,01$ mg/kg), Hg ($< 0,01$ mg/kg) og Pb ($< 0,10$ mg/kg) i ryggbein var generelt lave og viste ingen diettforskjeller ved uttak for 13 g og 33 g fisk ($p > 0.05$). Pb i bein viste en negativ korrelasjon til aske og makromineraler i bein ved 13 g uttaket ($p < 0.05$). As i ryggbein var gjennomsnittlig 0,62 mg/kg (13 g) og 0,58 mg/kg (33 g) og viste ingen diettforskjeller relativt til P nivå eller P kilder ($p > 0,05$).

5.7 Vevsanalyser

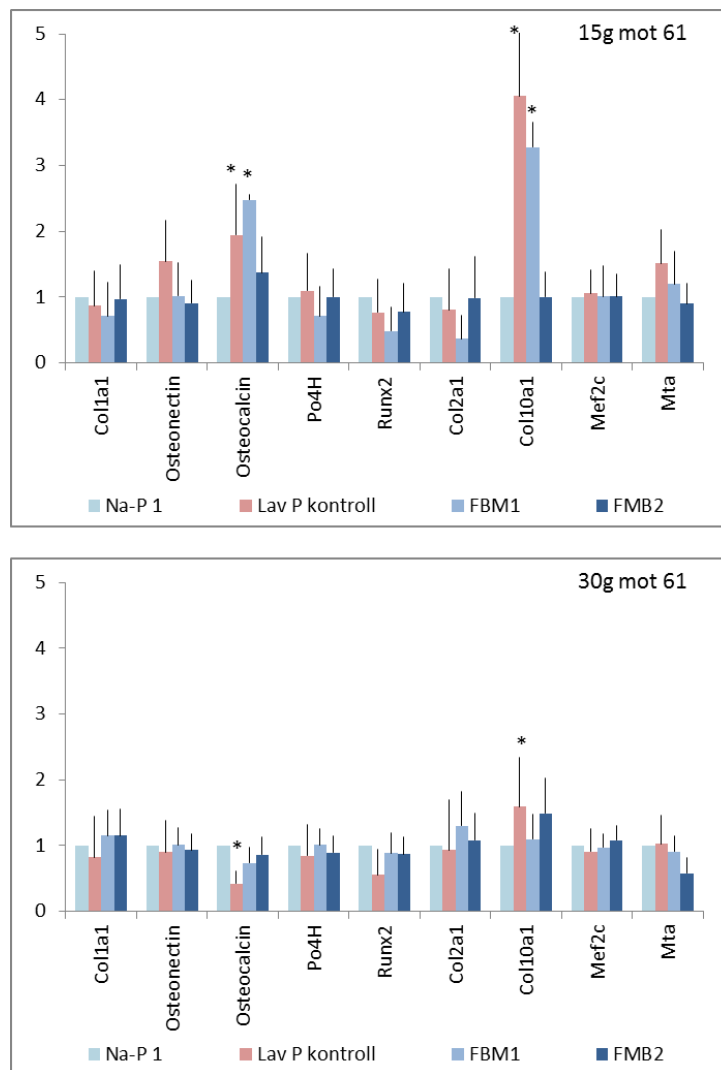
Lav P dietten viste klare symptomer på undermineralisering og bekreftet at P-nivået i denne gruppen ikke gav behovsdekning. Denne gruppen fungerte derfor godt som negativ P kontroll. Røntgen viste

at fisk fra de to gruppene som fikk diettene Na-P 1 og Na-P 2 begge hadde normal beinutvikling og derfor var gode positive kontroller. Na-P 1 ble brukt som positiv kontroll til videre vevsanalyser fordi denne dietten hadde et P nivå tilsvarende FBH 1 og representerte et mellomnivå av P.

5.7.1 Real time qPCR med markører for beindannelse og mineralisering i virvlene

Fra transkripsjonsanalysene så vi at *osteocalcin* (markør for mineralisering) og *col10a* (markør for modning av bruskceller) viste signifikante forskjeller ved uttak av 15g fisk. Det ble funnet oppregulering for disse markørene både i Lav P kontroll (D1) og i FBH 1 (Figur 20), til tross for at sistnevnte inneholdt tilsvarende nivå av løselig P (0,65 %) som den positive kontroll dietten Na-P 1 (0,66 %). FBH 2, som inneholdt et høyere P nivå (0,81 %), viste en transkripsjonsprofil som var mer lik den positive kontrollen Na-P 1.

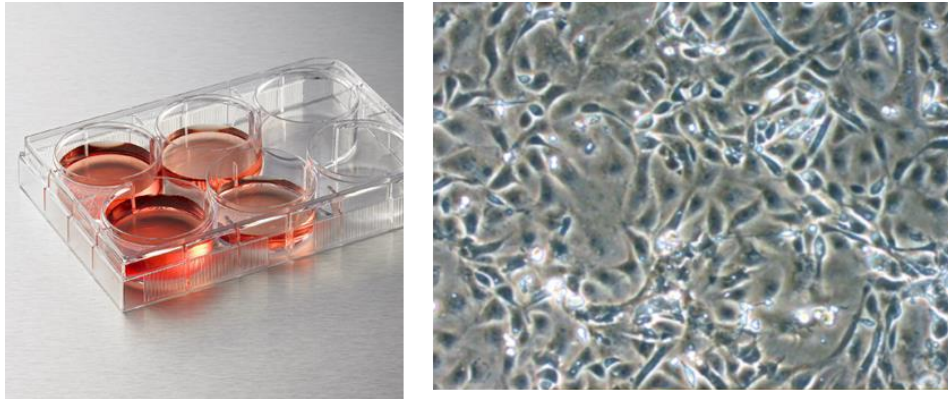
Vi kunne ikke finne noen signifikante forskjeller i transkripsjonsnivåer for bein og bruskmarkører på 30g størrelse. Dette kan tyde på at de direkte og kompensatoriske responsene på de ulike førtypene er stabilisert ved 30g.



Figur 20 Resultater fra real time qPCR. På 15g stadiet var *osteocalcin* og *col10a1* oppregulert i lav P kontrollgruppen og FBM1. Disse effektene var ikke tilstede på 30g stadiet i FBM1 gruppen. Signifikante transkripsjonsreguleringer er vist med *, 61=NaP1.

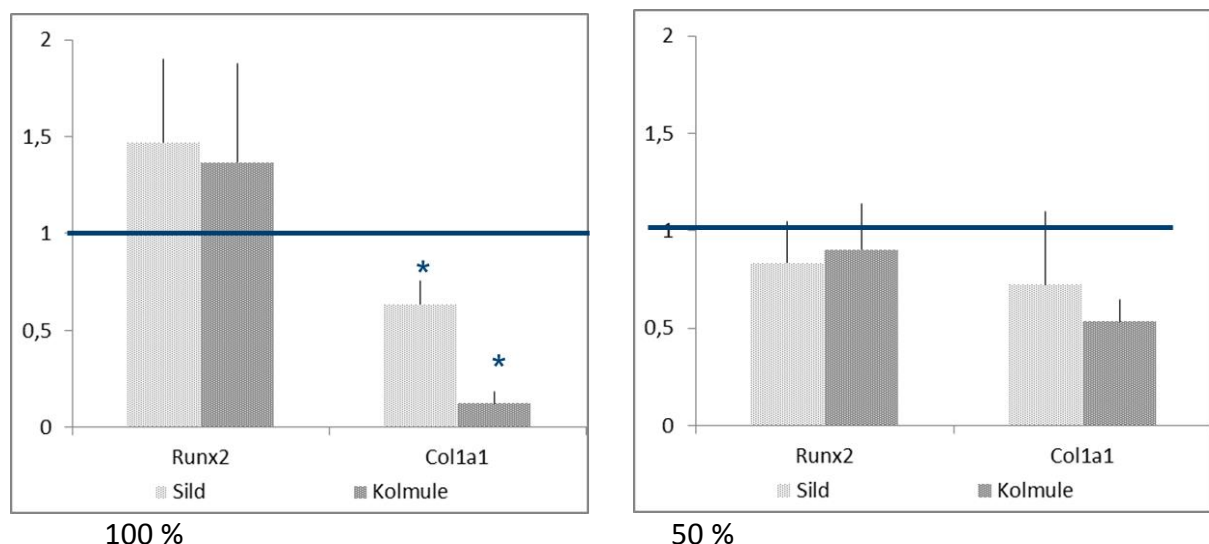
5.7.2 In vitro forsøk med beinceller

Resultatene våre fra *in vivo* forsøket sammenfaller med *in vitro* forsøket på beinceller. Cellene som var tilsatt P fra FBH prolifererte noe dårligere og nådde konfluens senere enn cellene som hadde fått tilsatt β -glycerophosphate (Figur 21). Denne effekten var tydeligere hos cellene som fikk 100 % P fra beinhydrolysat sammenlignet med de som fikk 50 % FBH/ β -glycerophosphate.



Figur 21 Bildet til venstre viser dyrkningsskåler med celler og medium. Til høyre bilde av konfluente beinceller før mineralisering.

I tillegg viste beincellene tilsatt P fra FBH en forsinket modning i form av høyere uttrykk av runx2 (tidlig markør for beinceller) og et lavere uttrykk av col1a (sen markør for produksjon av beinmatriks) sammenlignet med kontrollkulturer (Figur 22). Resultat fra *in vitro* forsøket kan tyde på at modningsprosessen tok noe lengere tid for celler som fikk P fra FBH. Denne effekten var også større i cellene som ble tilsatt P kun fra FBH sammenlignet med de som fikk en 50:50 blanding av P fra FBH og fra β -glycerophosphate. Forskjell i tilgjengelighet av P fra de ulike P kildene kan være en viktig faktor i mineraliseringsprosessen. Resultatet kan også skyldes andre faktorer i FBH som kan påvirke cellene og gi en sekundær P respons, f.eks. høyt innhold av sulfater (Østby *et al.*, 2014).



Figur 22 Real time qPCR på osteoblaster i kultur. I 100 %-løsningen hadde cellene et høyere runx2 uttrykk, men dette var ikke signifikant. Col1a1 transkripsjon var derimot signifikant nedregulert. På 50 % var begge genene nedregulert, men resultatene var ikke signifikante.

FTIR analyser i virvlene og FTIR analyser av beinstruktur bekreftet at mineraliseringen av Lav P kontroll er signifikant dårligere i vertebrale endeplateområdet sammenliknet med Na-P-gruppene (Na-P 1 og 2), tabell 9. Mineraliseringsverdier for de to fôrgruppene som fikk P fra FBH var litt høyere enn for Lav P kontroll, og høyest for FBH 2, men disse forskjellene var ikke signifikante.

Av annen matriksstruktur ser vi at mengde kollagen kryssbindinger i FBH 1 er lik Lav P kontrollgruppen mens FBH 2 er signifikant lavere enn Lav P kontroll og mer lik den positive kontrollen (Na-P 1). Det ble imidlertid funnet økt dannelse av kryssbindinger også for Na-P 2, noe som kan bety at resultatene ikke er helt konsistente.

Krystallinitet er en annen beinstrukturparameter målt ved FTIR, og er proporsjonal med størrelsen på krystallene. Våre data viser at både FBH 1, FBH 2 og Na-P 1 er signifikant lavere sammenliknet med Lav P kontroll når det gjelder krystallinitet. Resultat for Na-P 2 er lik Na-P 1 selv om Na-P 2 ikke er signifikant forskjellig fra Lav P kontroll.

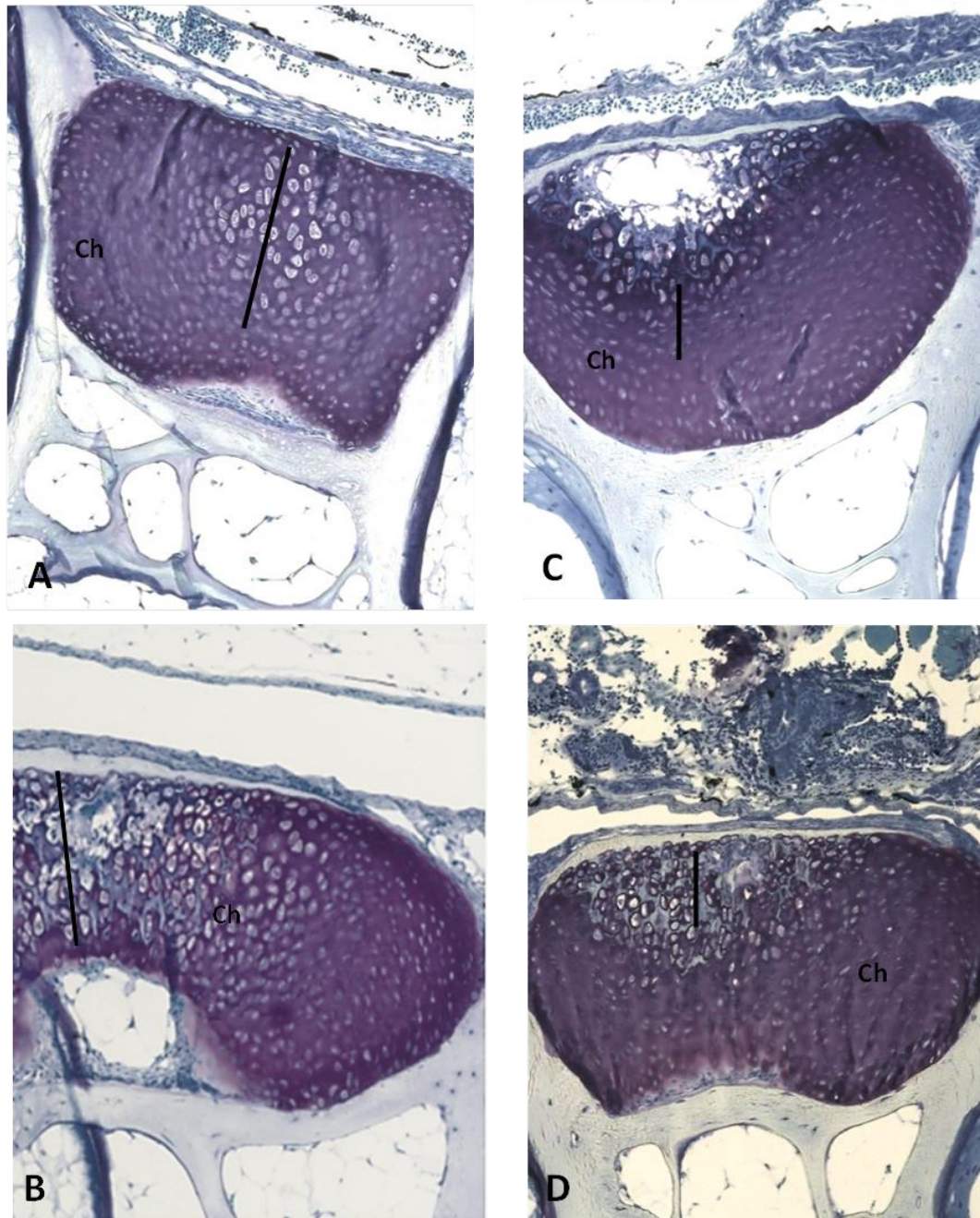
Tabell 9 FTIR analyser av endebein i ryggspytle fra de ulike fôrgruppene

	Mineral/matriks	Kryssbindinger	Krystallinitet
Lav P kontroll	3,15 ±0,08	2,24 ±0,02	1,30 ±0,02
FBH 1	3,19 ±0,08	2,36 ±0,08	1,20 ±0,03*
FBH 2	3,31 ±0,11	2,01 ±0,05*	1,13 ±0,03*
Na-P 1	3,41 ± 0,06 *	2,03 ±0,03*	1,23 ±0,007*
Na-P 2	3,48 ±0,03*	2,27 ±0,01	1,24 ±0,01

* P<0.05 sammenliknet med Lav P kontroll

5.7.3 Histologi av brusk og beinområder i virvlene

Histologisk ble det funnet endel celleforandringer i bruskområdene (vekstsone for ribbein) på 15g fisk fôret med Lav P kontroll diett (Figur 23). Det var generelt mer hypertrofe bruskceller i Lav P kontroll enn i Na-P 1, som ble brukt som positiv kontroll. Dette stemmer godt med det økte nivået av col10 som ble funnet i transkripsjonsanalysen. Col10 er en markør for hypertrofe chondrocytter (bruskceller). Resultatene tyder på mer chondrocytt proliferasjon ved lav P tilførsel. Det samme ble også detektert i FBH 1, dvs. halvparten av fisken som fikk FBH 1 hadde en fenotype som lignet den positive kontrollen (Na-P 1), mens den andre halvparten var fenotypisk mer lik den negative kontrollen (lav P diett). En økning i hypertrofe bruskceller kan medføre mer endochondral beindannelse i ribbeinsbuen og være forløperen til hypertette virvler på senere stadier. I tillegg så vi at de modne bruskcellene hadde forstørrede og tomme lacunaer, noe som kan både svekke brusks styrke og føre til lavere mineraliseringsrate. Dette har tidligere vært vist i bruskområdene til mus som har blitt fôret med dietter der mineraler har vært i mangel. Resultatene våre er komparative til andre arter og viser viktigheten av å ha kontroll på hvor mye P fôret inneholder.



Figur 23 Toulidinfargede snitt av brusk og beinområde i ryggstøyle fra fôrgruppe Lav P (A), FBH1 (B), FBH1 (C) og Na-P1 (D). Det ble observert morfologisk forandring i form av økt område med hypertrofe chondrocytter (markert med strek) hos både lav P kontrollgruppe og FBH 1. FBH 2 var histologisk lik Na-P1 med et normalt, avgrenset hypertroft chondrocyttområde. Ch = bruskområde.

5.7.4 ALP og TRAP aktivitet i fiskebein og vitamin D metabolitter i plasma

Det ble gjort analyser av enzymet ALP, som er en markør for osteoblaster, og enzymet TRACP, som er en markør for osteoklaster. Det ble ikke funnet diettforskjeller mellom ALP og TRACP aktivitet i bein eller vitamin D metabolitter i plasma ved 30 g størrelse ($P > 0,05$), Tabell 10. Nivåene av vitamin D hormonene ligger innenfor normale verdier for laks og viste heller ikke signifikante diettforskjeller.

Tabell 10 ALP og TRACP aktivitet i bein og vitamin D metabolittene 1,25 OH₂ D₃ og 25 OH₂ D₃ i plasma i 30 g fisk oppgitt som gjennomsnitt for hver diett (n=3).

Fôr		ALP	TRACP	1,25 OH ₂ D ₃	25 OH ₂ D ₃
Lav P diett	D58	1,04 ± 0,02	1,3 ± 0,1	0,35 ± 0,07	0,60 ± 0,14
FBH 1	D59	1,09 ± 0,14	1,7 ± 0,3	0,53 ± 0,12	0,37 ± 0,06
FBH 2	D60	1,21 ± 0,20	1,6 ± 0,3	0,47 ± 0,12	0,37 ± 0,06
Na-P 1	D61	1,19 ± 0,07	1,9 ± 0,2	0,57 ± 0,06	0,33 ± 0,12
Na-P 2	D62	1,07 ± 0,31	1,7 ± 0,2	0,60 ± 0,17	0,53 ± 0,12
Anova P < 0,05		ns	ns	ns	ns

6 Diskusjon

Fosfor innholdet i de fem forsøksfôrene varierte fra P underdekning til nær behovsdekning basert på analyse av løselig P i fôret, noe som gir et godt utgangspunkt for å vurdere effekter av P på vekst, mineralisering og beinutvikling i lakseyngel. I tillegg gir det et godt grunnlag for å evaluere om tilgjengelighet av P frigjort fra fiskebein ved syrehydrolyse er en tilsvarende god P kilde som andre lett løselig kommersielle P salter.

Vi fant ingen forskjeller i sluttvekt mellom de ulike diettgruppene til tross for at Lav P gruppen hadde tydelige tegn på P mangel. Bæverfjord *et. al* (1998) fant at lakseyngel gitt en diett med lav P (0,35 total P) innledningsvis kunne holde tritt med yngel gitt en høy P diett (0,9 % total P), men det ble funnet forskjeller i vekst etter seks ukers fôring. Det er mulig at selv om Lav P gruppen i dette studiet (0,55 % løselig P) gav en tydelig P mangel, var det likevel tilstrekkelig P i dietten til å opprettholde en normal tilvekst som var sammenlignbar med de øvrige gruppene. I den første fôringsperioden fram til 0,8 g størrelse var det høyest dødelighet i FBH 1 gruppen. Dette skyldtes i hovedsak høy dødelighet i ett av karene i denne gruppen, noe som indikerer en kareffekt og ikke forskjeller relatert til diett. Dødeligheten totalt sett var mellom 3,8 og 10,7 % for hele forsøksperioden, med høyest dødelighet i Lav P kontroll (D1). Dette kan regnes som en normal dødelighet i et startfôringsforsøk (Fjelldal *et al.*, upubliserte data). Innledningsvis i forsøket var tilveksten god, men uten at vi oppnådde maksimale vekstbetingelser. Veksten tilsvarte likevel det som ble oppnådd i kommersiell produksjon vår 2012 for dette fiskematerialet. Fisken vokste bedre seinere i forsøket, og dette ga et godt grunnlag for konklusjoner basert på molekylærbiologiske analyser av fisk.

Det ble funnet at fôring med FBH innledningsvis fra startfôring ga svakt redusert tilvekst av fisken fram til 6 g størrelse (uke 15). I perioden fra 6 til 15 g ble det funnet et svært godt vekstresultat for FBH, enten kompensatorisk, eller ved at fisken er større, har et mer utviklet tarmsystem og er mer robust til å takle lav pH i fôr som følge av syrebehandling, eller andre komponenter som de nye ingrediensene bidrar med. Prosesseringen medfører bruk av ammoniakk-N for å justere pH etter syrehydrolyse, noe som ga høye nivå av ikke-protein N i fôret. I smoltforsøk (Albrektsen *et al.*, 2014) er det utført en stressresponstest (Kolarevic *et al.*, 2013) ved å analysere N innhold i blod hos fisk fôret med FBH nøytralisert med NH_3 løsning. Det ble ikke funnet økt NH_3 nivå i blod, noe som indikerer at laksesmolt ikke har problem med N-regulering når eksponering skjer via tarm. Det er foreløpig uvisst om det høye N innholdet i fôret under startfôring kan ha vært en medvirkende årsak til at vekstresultatet innledningsvis i FBH gruppen ble litt lavere enn for Na-P, eller om det er andre forhold ved den nye ingrediensen som kan ha vært uheldig for liten fisk, f. eks høyt sulfatinnhold. Det er gjennomført *in vitro* forsøk med leverceller for å evaluere om ulike nøytraliseringsmidler i FBH kan påvirke cellene forskjellig, og resultatene er oppsummert i Østby *et al.*, 2014. FBH ingrediensen i seg selv synes ikke å være negativ for fisk når den blir litt større, da fôring med et høyt P nivå (FBH 2) gav normal vekst, mineralisering og beinutvikling i lakseyngel i perioden fra 15 til 30 g størrelse.

Røntgenundersøkelsene viste tydelige tegn på undermineralisering i fôrgruppe Lav P kontroll, mens det ikke ble påvist spesielle morfologiske avvik i fôrgruppene FBH 1 og FBH 2 som inneholdt P fra FBH eller i fôrgruppene Na-P 1 og Na-P 2 som var fôret med et mono-Na salt av P. Resultatene for beinfarging av 6g fisk med Alizarin rød samsvarte med røntgenobservasjonene og viste undermineralisering kun for fisk fra lav P kontroll gruppen. Resultatene for brusfarging av 1 g fisk viste ingen diettforskjeller for noen grupper. Gjennom røntgenanalysene ble det funnet et visst innslag av fisk med fusjoner, men dette kunne ikke relateres til ulike P kilder eller P nivå. Det er kjent

at fusjoner kan være en indikasjon på for høy temperatur i ferskvannsfasen (Ytteborg *et al.*, 2010), men et lavt innslag av fusjoner er vanlig også hos fisk som ikke har vært utsatt for temperaturstress (Fjelldal *et al.*, 2007) og kan betraktes som en relativt uspesifikk reaksjon. Både røntgen og farging av hel fisk viste at lav P dietten var en god negativ kontroll i forhold til å gi tydelige tegn på underdekning av P.

Det relativt høye innslaget av fisk med høytetthetsvirvler (HD-virvler, Helland *et al.*, 2006) og avvik i ganebeinets bue synes primært å være knyttet til Lav P kontroll dietten. Det ble funnet noen få individer med HD virvler også fra de andre grupper ved 30g, men dette kunne ikke relateres verken til P nivå eller til P kilde. Det antas at utvikling av HD-virvler er knyttet til nedsatt mineralisering av virvlene (Helland *et al.*, 2006), og spesielt til P-mangel. Både HD-virvler og avvik i ganebeinet som også ble påvist for Lav P kontroll diett, er symptomer som forsvinner ved overgang til sjø, men som likevel er klare indikatorer på nedsatt mineralisering i ferskvann, som tidligere observert i forsøk der fisken har vært dårlig mineralisert (Bæverfjord m. fl., upubliserte data). Det er videre kjent at evnen til å utnytte P fra fôret viser variasjon, både mellom genetiske familier (Thodesen *et al.*, 2001) og mellom enkeltindivider (Rydland *et al.*, 1999). Dette kan forklare at enkelte fisk utvikler et slikt avvik, men basert på det lave antallet observerte funn i dette forsøket er det ikke grunnlag for å si at de ulike P kildene påvirket dette.

Gjennom fôring med lav P dietten har vi sett klare negative effekter av for lite løselig P i fôret på beinutvikling, noe som har bidratt til å definere tidlige symptomer og tegn til P mangel i avgrensede soner av ryggvirvel. Histologisk ser vi at virvler som får begrenset tilgang av P fra fôret får klare uregelmessigheter i bruskutviklingen, der en forstyrret vekstzone, opphopning av modne bruskceller og ujevn mineraliseringskant er tydelige tegn. De histologiske resultatene kan sees i sammenheng med funn på røntgen-nivå, der man kunne se krøllete ribbein og ujevn virvelstørrelse. Ujevnheter i beinproduksjon i tidlige livsfaser vil i mange tilfeller kunne repareres og forbedres, men ikke alltid forsvinne. På ribbein kan dette tydelig sees som krøller på de ellers jevne og rette ribbeina. Slike ujevnheter manifesterer seg ofte i overgangen mellom brusk og bein, i den endochondrale ossifiseringsfronten i ribbeinsbuene (Ytteborg *et al.*, 2010b og upublisert data). I disse områdene er det viktig at modning av bruskcellene foregår kontrollert. I Lav P kontroll diett var det klare uregelmessigheter i dette området, noe som også ble funnet for en del av fisken fôret med FBH 1. En økning i *osteocalcin* kan være knyttet til en økt endochondral beindannelse i disse ribbeinsbuene, men aktivering av dette genet kan også være en kompensasjon for å motvirke utvikling av undermineraliserte bein i tidlig livsfase.

Aske og mineralinnhold i hel fisk og i bein kan gi en god indikasjon på effektivitet i mineralisering og om det er tilstrekkelige mengder av P tilgjengelig for normal mineralisering (Lall *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2002). I dette forsøket ble det generelt funnet forskjeller i nivå av aske og mineraler i hel fisk og bein som reflekterte ulike P-nivå, men uten at det ble påvist signifikante forskjeller mellom ulike P-kilder. Innledningsvis i perioden fra 0,2 til 0,8 g, var det tendens til at fisk fôret med P fra FBH hadde svakt lavere mineralisering, med gjennomsnittlig 4 % lavere askeinnhold i hel fisk, noe som også ble funnet for ryggbein ved uttak av 13 g fisk. Disse forskjellene var små og ikke signifikante, men avvikene som ble påvist histologisk, og basert på FTIR og qPCR i ryggbein, reflekterte disse små forskjellene og bekrefter at tilgjengelighet av P fra FBH 1 i en avgrenset sone i ryggbeinet er litt svakere enn for Na-P når fôret inneholdt 0,65 % løselig P. På dette nivå av løselig P ble det funnet at beinutviklingen i lakseyngelen ikke var helt optimal, men uten at det ble funnet morfologiske avvik av den karakter som ble funnet for Lav P kontrollgruppen. Ved tilførsel av 0,80 % løselig P i fôret (FBH 2

og Na-P 2), var P behovet for normal beinutvikling dekket, og det ble ikke detektert noen avvik eller forskjeller mellom de to P kildene. Resultatene totalt sett indikerer at vi har P behovsdekning på 0,8 % løselig P i fôr til lakseyngel, uavhengig av P kilde, under gode vekstbetingelser.

Vitamin D har en viktig funksjon knyttet til å opprettholde normal Ca og P balanse i kroppen bl.a. ved å øke tarm absorpsjon og beinresorpsjon av mineralene i perioder med mangel (Lock *et al.*, 2009). Det har tidligere vært vist at dietter med lave P nivå kan medføre en endring i konsentrasjonen av det aktive vitamin D hormonet $1,25 \text{ OH}_2\text{D}_3$ og en påfølgende økning av ALP aktivitet og reduksjon i TRACP aktivitet i bein (Fjelldal *et al.*, 2009). I dette studiet ble ikke denne sammenhengen påvist. I et tilsvarende studie av Fjelldal *et al.* (submitted) der lakseyngel fikk fôr med 0.5, 0.7 og 1.4 % løselig P fra startfôring til 50 g ble det vist en klar dose-respons for disse enzymene med høyest ALP og lavest TRACP aktivitet ved lavt P inntak. Det er uvisst hva som kan være årsaken til at vi ikke ser en slik dose respons i dette forsøket men forskjeller i fiskestørrelse mellom ulike forsøk kan være en mulig årsak.

FTIR analyser og molekyllære markører for brusk og beinutvikling indikerer at 0,65 % løselig P er utilstrekkelig og mer begrensende for normal beinutvikling basert på P fra FBH sild enn for Na-P, mens løselig P på 0,80 % i fôret ikke gir avvik for noen av P kildene. Dette indikerer at P ingrediensen i seg selv ikke er begrensende for normal beinutvikling, men at det kreves noe høyere tilførsel av P fra FBH for å oppnå et tilsvarende godt produksjonsresultat. Dette kan skyldes litt lavere P tilgjengelighet fra FBH, alternativt andre begrensende faktorer i FBH ettersom det innledningsvis i vekstperioden fra 0 til 6 g også ble observert begrensninger i tilvekst hos fisk fôret med FBH, særlig uttalt på det laveste P nivået (0,65 % løselig P). Det er mulig at de ulike P ingrediensene kan påvirke opptaket av P i tarmen på liten fisk (ikke analysert), eller at NH_3 -løsning brukt som nøytraliseringsmiddel etter syrehydrolyse kan ha vært uheldig for lakseyngel under startfôring. Begrenset næringsopptak ved startfôring kan forklare tendens til lavere vekst i fisk fôret med FBH de første ukene, og sekundært kan dette ha medført små forsinkelser i beinutvikling som observert i 15 g fisk. Det kan se ut til at P fra FBH kanskje ikke er egnet som P ingrediens til lakseyngel helt fra startfôring, men at den egner seg bedre til noe større fisk. Vi detekterte små forskjeller i gentranskripsjon i virvler på 15g stadiet, mens vi ikke fant slike funn på 30g stadiet. Forskjellene ble bekreftet gjennom de histologiske analysene av virvler fra 15g fisk. Resultatene for 15g fisk reflekterer resultatene *in vitro*, der det ser ut til at særlig FBH kolmule forsinket den tidlige modningen av beinceller, mens FBH sild ikke har en tilsvarende effekt. Forskjell i sulfatinhold basert på at askerike råstoff krever mer syre for effektiv hydrolyse, kan være en mulig årsak (Østby *et al.*, 2014). Det er tidligere vist at beincellene er svært følsomme for ytre stimuli (Ytteborg *et al.*, 2010) og videre analyser på *in vitro*-nivå vil kunne avdekke mulige årsaker til at fôret passer best til litt større fisk.

Konklusjon

Resultatene totalt sett viser at P hydrolysert fra beinfraksjonen i sildeavskjær kan utnyttes effektivt til å opprettholde normal vekst, mineralisering og skjelettutvikling i lakseyngel, men at tilgjengeligheten av P i FBH kan være litt lavere enn for Na -P i den innledende startfôringsfasen før fisken når 15g. Det er mulig at nøytraliseringsmiddel anvendt etter syrehydrolyse (NH_3 -løsning), lav P eller andre komponenter i FBH kan forklare problem på de tidligste utviklingstrinn, noe det er behov for å verifisere med hensyn til taroeffekter. Behovet for P til lakseyngel er dekket med 0,80 % løselig P i fôret, uavhengig av P kilde. Dette er i overensstemmelse med offentlige anbefalinger (NRC, 2011). Vi konkluderer med at P fra marine biprodukter er en fullgod P-kilde i fôr til lakseyngel.

7 Referanser

- Albrektsen, S., Lock, E.-J., Bæverfjord, G., Pedersen, M., Krasnov, A., Takle, H., Veiseth-Kent, E., Ørnsrud, R., Waagbø, R., Ytteborg, E. (2014). Utnyttelse av syrehydrolysert P fra sildeavskjær som alternativ P kilde i fôr til laksesmolt. Nofima rapport 08/2014.
- Albrektsen, S., Thorsen, K. og Nygaard, H. 2010. Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal.
- Albrektsen, Sissel; Thorsen, Kaspar Høye; Bæverfjord, Grete; Nygaard, Halvor (2013). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB) Third Meeting; 2013
- Albrektsen, Sissel (2013). Løselig fosfor i fôr - egnet som mål på tilgjengelig fosfor i laks? Norsk Fiskeoppdrett (11) p. 38-40
- Aksnes, A. (2002, revidert 2007a). Framgangsmåte for å forbedre den biologiske fordøybarheten til et fôrprodukt, samt produkt resulterende derav, samt anvendelse av produktet. Mineraler. Søknadsnr 20045728
- Aszodi, A., Bateman, J. F., Gustafsson, E., Boot-Handford, R. and Fässler, R. (2000). Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct. Funct.* 25, 73-84.
- Bæverfjord G, Åsgård T, Shearer KD. (1998). Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 4:1-11.
- Boskey, A.L., Boyan, B.D., Schwartz, Z. (1997). Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel. *Calcified Tissue International*, 60(3), 309-315.
- Boskey, A.L., Moore, D.J., Amling, M., Canalis, E., Delany, A.M. (2003). Infrared analysis of the mineral and matrix in bones of osteonectin-null mice and their wildtype controls. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(6), 1005-1011.
- Currey, JD. (2003) The many adaptations of bone. *Journal of Biomechanics* 36:1487-1495.
- Faibish, D., Gomes, A., Boivin, G., Boskey, A.L. (2005). Infrared imaging of calcified tissues in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone* 36, 6-12.
- Fjelldal PG, Lock E-J, Hansen T J, Waagbø R, Wargelius A, Martens L G, El-Mowafi A & Ørnsrud R. (2012). Continuous light induces bone resorption and affects vertebral morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a phosphorous deficient diet. *Aquaculture Nutrition* 18, (6) p. 610-619
- Fjelldal PG, Hansen T, Breck O, Sandvik R, Waagbø R, Berg A, Ørnsrud R. (2009) Supplementation of dietary minerals during the early seawater phase increase vertebral strength and reduce the prevalence of vertebral deformities in fast-growing under-yearling Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt *Aquaculture Nutrition*, 15 (4), 366-379
- Fjelldal G, Hansen TJ, Berg AE (2007) A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 273:721-728.
- Fjelldal PG, Lock EJ, Grotmol S, Totland GK, Nordgarden U, Flik G & Hansen T. (2006) Impact of smolt production strategy on vertebral growth and mineralisation during smoltification and the early seawater phase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 261: 715-728.
- Fontagné, S., Silva, N., Bazin, D., Ramos, A., Aguirre, P., Surget, A., Abrantes, A., Kaushik, S.J., Power, D.M., (2009). Effects of dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture* 297, 141–150."

- Helland, S., Refstie, S., Espmark, Å., Hjelde, K., Bæverfjord, G. (2013). Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. *Aquaculture* 03
- Helland S, Denstadli V, Witten PE, Hjelde K, Storebakken T, Skrede A, Asgard T, Bæverfjord G, (2006). Hyper dense vertebrae and mineral content in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of phytic acid. *Aquaculture*, 261:603-614.
- Helland, S. Diagnostics - Staining protocol of cartilage & bone. In: Control of malformations in fish aquaculture; Science and practice (2009) Bæverfjord, G., Helland, S., Hough, C. (Eds). Rapid Press, Luxemburg. Available from Federation of European Aquaculture Produces, Liege, Belgium. 149pp.
- Hoyle, I., Oidtmann, B., Ellis, T., Turnbull, J., North, B., Nikolaidis, J., Knowles, T.G. (2007). A validated macroscopic key to assess fin damage in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 270, 142-148.
- Hua, K., Liu, L., Bureau, D.P., (2005). Determination of phosphorus fractions in animal protein ingredients. *J. Agricult. Food Chem.* 53, 1571–1574. Ito, N., Fukumoto S., 2005. FGF23 and bone metabolism. *Clin. calcium* 15, 43-48.
- Hunter, G., Szigety, S.K. (1992). Effects of proteoglycan on hydroxyapatite formation under non steady-state and pseudosteady-state conditions. *Matrix*, 12, 362-68.
- Kolarevic, J., Selset, R., Felip, O., Good, C., Snekvik, K., Takle, H., Ytteborg, E., Bæverfjord, G., Åsgård, T., Terjesen, B.F., (2013). Influence of long term ammonia exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and welfare. *Aquaculture Research*. 44, 1649-1664.
- Lall SP, Lewis-McCrea LM: Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture* 2007, 267: 3-19.
- Lock E-J., Waagbø, R., Wendelaar Bonga, S., Flik, G. (2009). The significance of vitamin D for fish: a review *Aquaculture Nutrition* 12; 16(1):100 - 116.
- Pedersen M.E., Takle H., Ytteborg E., Veiseth E., Enersen G., Færgestad E., Bæverfjord G., Hannesson K. O. (2010). Matriline-1 in the vertebral column of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L) with skeletal deformities. *Fish Physiol Biochem.* 37(4):821-31.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30.
- Potthoff, T. (1984) Clearing and staining techniques. In: Moser, H.G. (Ed.), *Ontogeny and Systematics of Fishes*. Special Publication- American Society of Ichthyologists and Herpetologists, vol. 1. Allen Press, Lawrence, KS, USA, pp. 35–37.
- Refstie, S., Helland, S., Gjerde, B., Shearer, K.D. og Bæverfjord, G. (2005). Restricted dietary mineral supply in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - I growth and mineral dynamics.
- Roy PK, Witten PE, Hall BK, Lall SP. (2002). Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 27: 35-48.
- Ruban, V., López-Sánchez, J.F., Pardo, P., Rauret, G., Muntau, H., Quevauviller, P.(2001). Harmonized protocol and certified reference material for the determination of extractable contents of phosphorus in freshwater sediments – A synthesis of recent works. *Fresenius J. Anal. Chem.* 370, 224–228.
- Rydland, R. (1998) Digestibility of feed minerals with emphasize on phosphorus. MSc thesis (In Norwegian), Norges Landbrukshøgskole. 53pp.

- Shearer, K.D., Åsgård, T., Andorsdóttir, G., Aas, G.H., (1994). Whole body elemental and proximate composition of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during the life cycle. J. Fish. Biol. 44, 785–797
- Thodesen, J., Storebakken, T., Shearer, K.D., Rye, M., Bjerkeng, B. & Gjerde, B. (2001b) Genetic variation in mineral absorption in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared of seawater. Aquaculture, 194, 263-271
- Ytteborg, E., Baeverfjord, G., Hjelde, K., Torgersen, J., Takle, H. (2010a). Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Physiology, 10:12.
- Ytteborg, E., Torgersen, J., Baeverfjord, G., Takle, H. (2010b). Morphological and molecular characterization of developing vertebral fusions using a teleost model. BMC Physiology, 10:13.
- Østbye, T.K., Ruyter, B., Kristiansen, I.Ø. og Albrektsen, S. (2014). Helseeffekter i lakseceller eksponert for fiskebeinhydrolysater fra torsk, sild og kolmule. Nofima rapport 10/2014.

Appendix

A1. Diett blandeseddel

DIET COMPOSITION P 21109 (FHF bein)					
Composition of diet					
Diet no	1	2	3	4	5
	%	%	%	%	%
LT FM 122/11	43,0	43,0	43,0	43,0	43,0
Beinhydrolysat fra sild (FBH Si-11)		1,65	3,30		
Betafin T50/11	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Inositol T14/06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Hvetegluten 159/10	21,7	21,4	21,0	21,9	22,0
Fiskeolje O5/10	14,1	14,1	14,2	14,1	14,1
Soya Lecithin 157/11	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hvete 115/11	15,2	13,9	12,5	14,4	13,6
l.Arg*HCL (Evonik) T53/11	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Vitamin mix (2 % tilsetn) T 46/10	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mineral mix uten P T53/11	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Mono sodium phosphate MSP T49/10				0,66	1,32
Lys (99%,19,41 %	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Caroph. Pink (10 %) T35/10	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
DL-Methionine (Degussa) T37/10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Yttriumoksid T43/11	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Threonine 98.5 % T27/07	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
sum	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Calculated chemical composition in the feed (% in diet)					
Protein	53,1	53,3	53,3	53,2	53,2
Lipid	20,82	20,80	20,88	20,80	20,79
Carbohydrate	13,9	13,0	12,0	13,3	12,8
Ash	6,6	7,1	7,6	7,2	7,9
Water	6,2	6,0	5,9	6,1	6,1
Sum	100,7	100,1	99,6	100,7	100,8
Energi MJ/kg	23,3	23,2	23,1	23,2	23,1
Kg per diet	100,0	80,0	80,0	80,0	80,0

Appendiks A2. Aske og makromineraler i hel fisk

Løselig P, %	Lav P 0,55	FBH 1 0,70	FBH 2 0,85	Na-P 1 0,70	Na-P 2 0,85	ANOVA p <
Aske						
0,2 g	1,35					
0,8 g	1,79	1,86	1,83	1,94	1,92	0,06
6,0 g	1,79 ^a	2,17 ^{bc}	2,19 ^{bc}	2,12 ^b	2,24 ^c	0,01
15 g	1,80a	2,13b	2,30c	2,08b	2,27c	0,01
30 g	1,53a	1,71bc	1,81c	1,67b	1,78bc	0,01
Ca						
0,2 g	1821					
0,8 g	3138	2966	3819	3599	3468	ns
6,0 g	2829a	4222bc	4648c	3791b	4466c	0,01
15 g	2999a	4154b	4781c	4181b	4600bc	0,01
30 g	2306a	3317b	3402b	2668b	3238b	0,01
P						
0,2 g	2550					
0,8 g	3855	3368	4094	3836	3898	ns
6,0 g	3905a	4785b	4927b	4531b	4745b	0,01
15 g	4786a	5541b	6050c	5542b	5969c1	0,01
30 g	3752	4237	4234	3878	4255	0,10
Mg						
0,2 g	202					
0,8 g	283	240	295	284	270	ns
6,0 g	252a	275b	279b	269b	270b	0,01
15 g	272a	284ab	322c	291ab	300bc	0,01
30 g	245a	267b	272b	265a1b	267b	0,05
Ca:P ratio						
0,2 g	0,72					
0,8 g	0,81	0,89	0,94	0,94	0,89	ns
6,0 g	0,72a	0,88bc	0,94c	0,84b	0,94c	0,01
15 g	0,63a	0,75b	0,79b	0,76b	0,77b	0,01
30 g	0,61a	0,78b	0,80b	0,69b	0,76b	0,01

Appendiks A3. Mikromineraler i hel fisk

Løselig P, %	Lav P 0,55	FBH 1 0,70	FBH 2 0,85	Na-P 1 0,70	Na-P 2 0,85	ANOVA p <
Zn						
0,2 g	21,6					
0,8 g	45,1	45,4	47,1	45,7	44,8	Ns
6,0 g	42,8	42,2	44,6	42,5	41,9	Ns
15 g	42,0	43,6	43,9	43,8	44,0	Ns
30 g	33,4	33,2	35,0	33,2	32,4	Ns
Mn						
0,2 g	0,54					
0,8 g	1,49	1,65	1,68	1,64	1,74	Ns
6,0 g	1,19a	1,41b	1,52b	1,35ab	1,36ab	0,01
15 g	1,14a	1,47b	1,58b	1,46b	1,53b	0,01
30 g	0,90	1,06	1,11	0,98	1,09	0,054
Fe						
0,2 g	24,2					
0,8 g	29,0	31,2	32,4	29,9	32,0	Ns
6,0 g	24,0a	31,0bc	32,5c	27,7ab	31,6bc	0,01
15 g	23,1a	30,2b	34,2b	30,4b	33,3b	0,01
30 g	19,3a	20,8a	26,1c	21,2ab	25,4c	0,01
Co						
0,2 g	0,02					
0,8 g	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	Ns
6,0 g	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	Ns
15 g	0,01a	0,02ab	0,02b	0,02ab	0,02b	0,05
30 g	0,01a	0,01ab	0,01bc	0,01a	0,01c	0,01
Sr						
0,2 g	4,31					
0,8 g	6,43a	7,63bc	8,68d	7,21b	8,05c	0,01
6,0 g	6,4a	10,7cd	12,4c	9,2bd	11,3c	0,01
15 g	6,7a	11,7b	14,0c	11,1b	13,4c	0,01
30 g	5,0a	9,2b	9,6b	6,7a	9,0b	0,01
Ba						
0,2 g	0,05					
0,8 g	0,07a	0,09bc	0,10c	0,08ab	0,09bc	0,01
6,0 g	0,06a	0,11bd	0,12cd	0,09b	0,11cd	0,01
15 g	0,06a	0,11b	0,14c	0,11b	0,14c	0,01
30 g	0,04a	0,09b	0,10b	0,07a	0,09b	0,01

Appendiks A4. Mikromineraler (mg/kg) og tungmetaller (mg/kg) i lakseyngel etter 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk. Verdiene er gitt som gjennomsnitt per diett og med tilhørende p verdi for hvert uttak.

	Lav P	FBH 1	FBH 2	Na-P 1	Na-P 2	ANOVA p <
Løselig P, %	0,55	0,70	0,85	0,70	0,85	
Cu						
0,2 g	0,61					
0,8 g	0,69	0,68	0,69	0,74	0,71	ns
6,0 g	0,73	0,70	0,77	0,70	0,74	ns
15 g	0,83	0,89	0,97	0,85	0,90	ns
30 g	0,85	1,11	1,00	0,96	1,00	ns
Se						
0,2 g	0,18					
0,8 g	0,29	0,28	0,27	0,27	0,28	ns
6,0 g	0,18	0,21	0,19	0,19	0,19	ns
15 g	0,24	0,22	0,22	0,21	0,22	ns
30 g	0,21	0,24	0,20	0,23	0,21	ns
As						
0,2 g	0,05					
0,8 g	0,59a	0,48b	0,48b	0,54ab	0,56a	0,01
6,0 g	0,74	0,70	0,67	0,68	0,69	ns
15 g	0,74	0,71	0,70	0,68	0,70	ns
30 g	0,68	0,68	0,66	0,66	0,66	ns
Tungmetaller						
Cd						
0,2 g	0,002					
0,8 g	0,008	0,006	0,006	0,006	0,007	ns
6,0 g	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	ns
15 g	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	ns
30 g	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	ns
Hg						
0,2 g	0,001					
0,8 g	0,009	0,008	0,008	0,008	0,008	ns
6,0 g	0,0135a	0,0126b	0,0119b	0,0124b	0,0122b	0,01
15 g	0,016	0,014	0,014	0,014	0,015	ns
30 g	0,015	0,013	0,014	0,014	0,014	ns
Pb						
0,2 g	0.007					
0,8 g						nd
6,0 g						nd
15 g						nd
30 g						nd

Appendiks A5. Aske (% vv) og makromineraler i ryggbein i lakseyngel etter 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk. Verdiene er gitt som gjennomsnitt per diett og med tilhørende p verdi for hvert uttak.

	Lav P	FBH 1	FBH 2	Na-P 1	Na-P 2	ANOVA p <
Løselig P, %	0,55	0,70	0,85	0,70	0,85	
Aske, %						
15 g	7,17a	9,67b	10,57b	9,83b	11,16b	0,01
30 g	9,04a	11,19b	12,58c	11,78bc	12,51c	0,01
Ca, mg/kg						
15 g	23508a	33011b	35266b	32652b	37478b	0,01
30 g	31451a	40638b	44889b	41378b	44888b	0,01
P, mg/kg						
15 g	13813a	18678b	20069b	19099b	21539b	0,01
30 g	21382a	27351b	30695c	28090bc	30240bc	0,01
Mg, mg/kg						
15 g	349a	492b	561bc	496b	592c	0,01
30 g	475a	680b	787c	695bd	772bd	0,01
Ca:P ratio						
15 g	1,70	1,77	1,76	1,71	1,74	ns
30 g	1,47	1,49	1,46	1,47	1,48	ns
Zn, mg/kg						
15 g	157	175	171	171	177	ns
30 g	152	167	165	163	165	ns
Mn, mg/kg						
15 g	4,91a	6,95b	7,08b	6,85b	7,43b	0,01
30 g	7,96a	10,35b	10,95b	10,12b	10,4b	0,10
Fe, mg/kg						
15 g	69,0a	86,8b	94,1b	90,0b	101,6b	0,01
30 g	190a	240b	273b	251b	265b	0,01
Co, mg/kg						
15 g	0,03a	0,04b	0,04b	0,04b	0,04b	0,01
30 g	0,06	0,06	0,08	0,07	0,07	ns
Sr, mg/kg						
15 g	44,7a	75,3b	87,1c	74,3b	91,0c	0,01
30 g	68,5a	120,5c	139d	108,7b	123c	0,01
Ba, mg/kg						
15 g	0,54a	0,91b	1,15c	0,96b	1,24c	0,01
30 g	0,61a	1,08b	1,43c	1,03b	1,17b	0,01

Appendiks A6. Mikromineraler og tungmetaller i ryggbein etter 19 uker (13 g) og 24 uker (33 g) i forsøk. Verdiene er gitt som gjennomsnitt per diett og med tilhørende p verdi for hvert uttak.

	Lav P	FBH 1	FBH 2	Na-P 1	Na-P 2	ANOVA p <
Løselig P, %	0,55	0,70	0,85	0,70	0,85	
Cu, %						
15 g	0,47	0,69	0,71	0,66	0,67	ns
30 g	0,66	0,69	0,75	0,69	0,85	ns
Se, mg/kg						
15 g	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	ns
30 g	0,19	0,17	0,17	0,17	0,15	ns
As, mg/kg						
15 g	0,61	0,61	0,65	0,61	0,62	ns
30 g	0,57	0,60	0,59	0,57	0,58	ns
Tungmetaller						
Cd, mg/kg						
15 g	0,002	0,002	0,005	0,002	nd	
30 g	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hg						
15 g	0,010	0,010	0,009	0,009	0,009	ns
30 g	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	ns
Pb, mg/kg						
15 g	0,082 ¹	0,031	0,038	0,029	0,032	ns
30 g	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	ns

1 n=2

