

# **Nefrokalsinose:**

Utvikling av sykdom under høyt og lavt CO<sub>2</sub> nivå med fokus på histopatologiske forandringer og mineralnivå i nyren

Erik Jiro Barman Michelsen



Masteroppgave i fiskehelse

Universitetet i Bergen

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

1. September 2021



# Forord

Forsøksfisken og prøvedata i denne masteroppgaven er en del av prosjektet «Stonehunt» som inngår i et samarbeid mellom Havforskningsinstituttet (HI), Høgskolen på Vestlandet (HVL) og Veterinærinstituttet (VI). Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering AS (FHF).

Jeg vil takke alle som har vært med å bidra til dette prosjektet. Først og fremst ønsker jeg å gi en stor takk til mine veiledere, som støttet meg og hjalp meg gjennom det siste året. Sofie Remø (Fôr og ernæring, HI), Ingunn Sommerset (Fagansvarlig fiskehelse- Havbruk, villfisk og velferd, VI) og Rune Waagbø (Prof/Doktor, UIB). Deres hjelp har vært uvurderlig.

Videre vil jeg takke de ansatte ved Ilab, som holdt fisken i live og sørget for at parameterne for prosjektet ble opprettholdt i tankene. Jeg ønsker også å takke alle som har assistert med laboratoriet-arbeidet mitt. Tusen takk til Anne Berit Olsen (Veterinær / Forsker – Forskning akvatisk biosikkerhet, VI) for hjelp med histologianalyser. Tusen takk til Kari Marit Sandnes (Avdelingsingeniør/KS-ansvarlig – Forskning akvatisk biosikkerhet, VI), Merete Gåsvær Sture (Avdelingsingeniør – Forskning akvatisk biosikkerhet, VI) Torill Thoreby Jensen (Overingeniør – Forskning akvatisk biosikkerhet, VI), og Ewa Harasimczuk (Havbruk, villfisk og velferd, VI) for støtte med sampling av fisk ved uttak og for undervisning i snitting for histologi.

Jeg vil også gi en stor takk til Nina Margrethe Steinsvik (Uorganisk kjemilab, HI) for all hjelpen med mineralanalyser, med UltraClave og UltraWave.

En stor takk også til Sveinung Fivelstad (Professor – Institutt for sikkerhet, kjemi- og bioingeniørfag, HVL) og Anne-Camilla Diesen Hosfeld (Førsteamanuensis – Institutt for sikkerhet, kjemi- og bioingeniørfag, HVL) for all hjelp med utførelse av forsøket og hjelp med prøvetaking under uttak.

Til slutt vil jeg takke familien min, alle vennene mine og mine medstudenter, for å ha støttet meg gjennom denne perioden. Dette har betydd utrolig mye for meg.



## Abstrakt

Denne masteroppgaven er en del av et større prosjekt som blant annet studerer årsakene nefrokalsinose, (NK) hos oppdrettslaks (STONEHUNT, FHF#901588).

Hvilke faktorer som ligger til grunn for utvikling av nefrokalsinose, er fortsatt ikke helt kartlagt, men langvarig forhøyet CO<sub>2</sub> er vist i flere studier å være en risikofaktor (Fivelstad et al. 2018; Fivelstad et al., 2003; Hosfeld et al., 2008).

Det ble gjennomført to ulike forsøk i dette prosjektet. I forsøk 1, ble det brukt fisk fra to ulike grupper hvor den ene bestod av fisk brukt til forskning (gruppe A), og den andre gruppen kom fra et kommersielt settefiskanlegg med kjent nefrokalsinosehistorikk (gruppe B). Disse fiskene ble fordelt på 8 tanker, hvorav 2 tanker per gruppe var kontrolltanker, og 2 tanker per gruppe ble tilsatt 11,8-15,6mg/L CO<sub>2</sub>.

Forsøk 2 involverte kun fisk fra gruppen med nefrokalsinosehistorikk. I dette forsøket ble det benyttet 6 tanker, hvorav 2 tanker var kontroll, 2 tanker ble tilsatt 20-25mg/L CO<sub>2</sub>, og 2 tanker ble tilsatt 20-25mg/L CO<sub>2</sub> i tillegg til en oksygenmetning på 125%.

Det ble ikke observert en signifikant forskjell i utvikling av nefrokalsinose i fiskene i forsøk 1. Mellom fiskene i CO<sub>2</sub> tankene og kontrolltankene, og mellom fiskene CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene og kontrolltankene i forsøk 2 var det en signifikant økning i NK (p<0,05). Prevalensen av NK i forsøket var 27.9%. I de ulike tankene var prevalensen 0,02% (kontroll), 36,3% (CO<sub>2</sub>), og 50% (CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>).

Videre ble det observert at CSI i CO<sub>2</sub> A fiskene var signifikant høyere enn alle de andre fiskene i forsøk 1 (p<0,05), og at VSI var signifikant høyere i fiskene fra gruppe A sammenlignet med gruppe B (p<0,05). K faktor for CO<sub>2</sub> B var også signifikant høyere enn k faktor i alle de andre fiskene i forsøk 1 (p<0,05). Det ble også funnet en signifikant forskjell i kalsiuminnhold mellom fiskene fra de to ulike gruppene i forsøk 1 (p<0,05), men ikke mellom fisken innad i gruppene.

I forsøk 2 ble det observert en signifikant nedgang i vekstrate og k faktor mellom fiskene i kontrolltankene og fiskene i CO<sub>2</sub> tankene (p<0,05), og en tilsvarende nedgang i vekstrate mellom fiskene i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene og fiskene i kontrolltankene (p<0,05). Det ble ikke funnet en signifikant forskjell i mineralinnhold mellom fisk som hadde nefrokalsinose, og fisk som ikke hadde nefrokalsinose. Det ble heller ikke funnet en signifikant forskjell i mineralinnhold eller i organindekser mellom fiskene i forsøk 2.

# Innholdsfortegnelse

Forkortelser .....	8
1 Introduksjon .....	9
1.1 Fiskens nyre .....	12
1.2 Blodet .....	13
1.3 Smoltifisering .....	14
1.4 Nefrokalsinose .....	15
1.5 Karbondioksid .....	18
1.6 Målsetning .....	20
2 Metoder .....	21
2.1 Forsøk .....	21
2.1.1 Forsøk 1: Høy CO <sub>2</sub> – Eksperimentelt oppsett .....	22
2.1.2 Forsøk 2: Høy CO <sub>2</sub> og høy O <sub>2</sub> – Eksperimentelt oppsett .....	23
2.2 Prøveuttak .....	24
2.3 Klargjøring av prøver til mineralanalyse .....	25
2.3.1 Materialer .....	25
2.3.2 Instrumenter .....	25
2.3.3 Prosedyre .....	26
2.3.4 Oppslutning med UltraWave (UW) .....	26
2.3.5 Oppslutning med UltraClave (UC) .....	27
2.3.6 Vasking av prøverør .....	27
2.4 Analyse av makromineraler i nyrevev .....	27
2.4.1 Instrumenter og utstyr .....	28
2.4.2 Sekvens-oppsett .....	28
2.4.3 Prosedyre .....	28
2.5 Histologi .....	29
2.5.1 Prosessering av vev for histologi .....	29
2.5.2 Prosesser .....	30
2.6 Utrengninger .....	32
2.7 Statistikk .....	32
3 Resultater .....	33
3.1 Forsøk 1 .....	33
3.1.1 Vekst .....	33
3.1.2 Nefrokalsinose .....	35
3.1.3 Mineralsammensetning i nyre .....	35

3.1.4 Organindekser .....	39
3.2 Forsøk 2 .....	41
3.2.1 Vekst .....	41
3.2.2 Nefrokalsinose.....	43
3.2.3 Mineralsammensetning i nyre .....	46
3.2.4 Organindekser .....	52
4 Diskusjon .....	54
4.1 Vekst .....	54
4.2 Kondisjonsfaktor .....	56
4.3 Organindekser.....	57
4.4 Nefrokalsinose .....	57
4.5 Mineral .....	59
5 Konklusjon .....	62
6 Referanser .....	63
7 Appendix .....	67
7.1 Tabell med tidligere forsøk.....	67
7.2 Statistikk forsøk 1 .....	69
7.2.1 Statistikk for vekst .....	69
7.2.2 Statistikk for organindekser .....	72
7.2.3 Statistikk for mineralanalyser .....	81
7.2.4 Statistikk for k faktor .....	92
7.3 Statistikk forsøk 2.....	95
7.3.1 Statistikk for prevalens av NK.....	95
7.3.2 Statistikk for vekst .....	96
7.3.3 Statistikk for organindekser .....	97
7.3.4 Statistikk for mineralanalyser .....	100
7.3.5 Statistikk for k faktor .....	110

## Forkortelser

NK – Nefrokalsinose

GH – Growth hormone

RAS – Resirkulerende aquakultur system

ICP-MS – Induktivt koblet plasma-massespektrometri

UW - UltraWave

UC – UltraClave

SGR - Vekstrate

HSI – Hepato somatic index

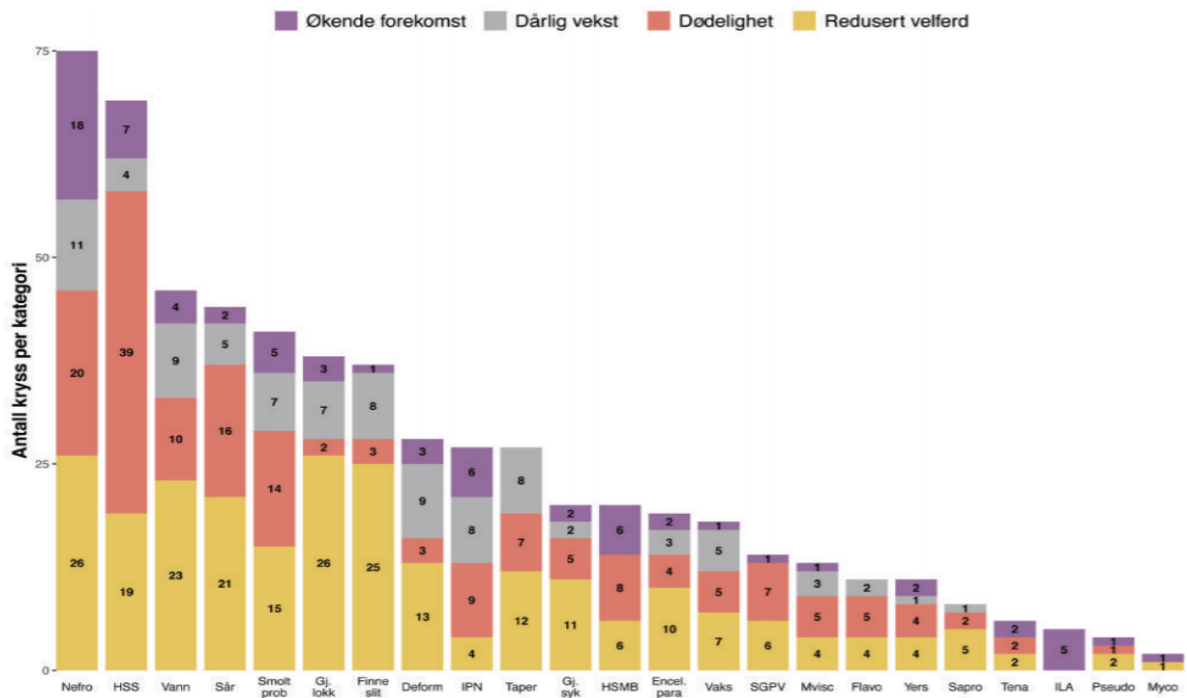
VSI – Visceral somatic index

CSI – Cardiac somatic index

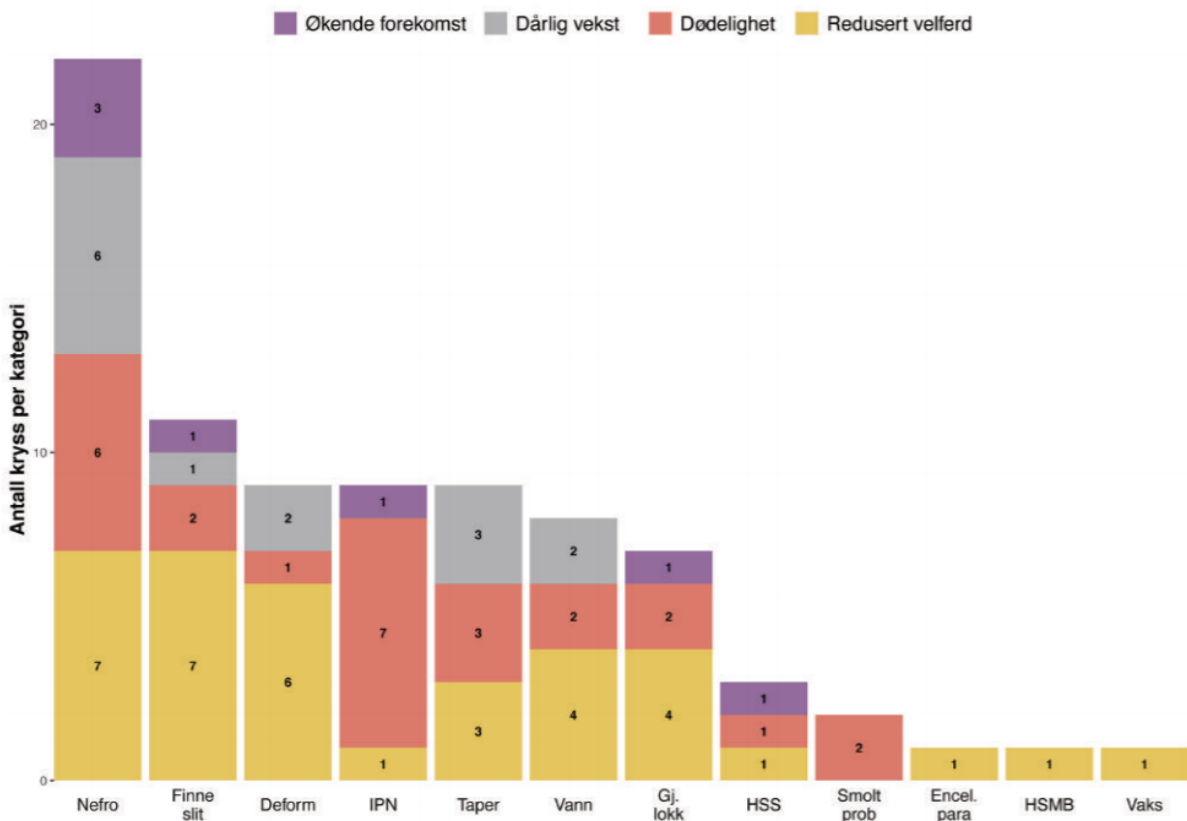


# 1 Introduksjon

Nefrokalsinose (NK), mineralutfellinger i nyrene er et av de største problemene i settefiskfasen av oppdrettsnæringen i dag, for både regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og laks (*Salmo salar*) (Sommerset et al., 2020). Dødeligheten etter sjøsetting av fisk med nefrokalsinose er ofte lav eller moderat (Dalum et al., 2019). Veterinærinstituttet (VI) har funnet en stigende trend for NK med unntak av 2019 og 2020. Antall påvisninger var 107 (2016), 126 (2017), 147 (2018), 118 (2019) (Sommerset et al., 2020) og i overkant av 110 (2020) (Sommerset et al., 2021). Disse tallene kommer fra prøver sendt inn til diagnose hos VI, og fra andre private laboratorier, der det er funnet NK. Til tross for en tilsynelatende nedgang i antall påvirkede anlegg, er det svært vanskelig å vite omfanget av denne sykdommen, da prøver ikke nødvendigvis blir sent inn til analyse med mindre en kan se makroskopiske utfellinger (Sommerset et al., 2020). Selv om antallet rapporterte påvisninger har gått ned de siste årene er nefrokalsinose ansett av fiskehelsepersonell som det største problemet hos settefisk-laks og er regnet som et av de 10 største komplikasjonene i forbindelse med matfisk-laks (Sommerset et al., 2021, 2020). Dette kom fram i en spørreundersøkelse gitt til 45 praktiserende fiskehelsebiologer som var på besøk på anlegg for helsekontroll. Respondentene ble bedt om å identifisere de fem viktigste helseproblemene fra en liste på 20. De satte kryss på om problemene ga økt dødelighet, dårlig vekst, redusert velferd, eller om det var oppfattet som et økende problem. Av de 45 respondentene svarte 20 at nefrokalsinose var et økende problem, 10 sa det ga dårlig vekst, 12 sa at det økte dødeligheten, og 24 svarte at det reduserte velferden (figur 1 og 2).



Figur 1: Grafen viser helseproblemer hos laks i settefiskanlegg slik fiskehelsebiologene hos oppdretterne oppfatter det. Grafen er tatt fra fiskehelse rapporten 2020 (Sommerset et al., 2021).



Figur 2: Grafen viser helseproblemer hos regnbueørret i settefiskanlegg. Grafen er tatt fra fiskehelse rapporten 2020 (Sommerset et al., 2021).

NK er en sykdom som kan være utfordrende. Det er fortsatt ikke funnet et svar på hva som er årsaken til nefrokalsinose, men tidligere forskning tyder på at høy CO<sub>2</sub> kan være en svært viktig faktor (Fivelstad et al., 2018, 2003; Fivelstad et al., 1999; Khan et al., 2018) Sykdommen oppstår når det skjer en opphopning av kalkholdig materiale i nyren. Dette kan skade nyren, forstyrre dens funksjoner, og nedsette fiskens velferd. I uttalte tilfeller kan utfellingene sees makroskopisk som en hvit utfelling i urinlederne til fisken (figur 3). I mindre uttalte tilfeller kan sykdommen sees mikroskopisk i nyrevevet.



*Figur 3: Bildet viser en fisk som har forkalkninger i nyren (svart pil). Bildet ble tatt under sluttuttaket. Foto: Erik Michelsen*

## 1.1 Fiskens nyre

Fiskens nyrer er posisjonert dorsalt langs fiskens ryggstøyle og har en mørk farge da dette er et svært blodrikt organ. Nyren deles inn i tre ulike deler; bloddannende (hematopoietisk), urin utskillende (ekskretorisk) og hormonproduserende (endokrin). Den bloddannende delen er hovedsakelig posisjonert i hodenyren, men det er også spredte ansamlinger av bloddannende celler i andre deler av nyren. Den ekskretoriske delen av nyren skiller ut avfallsstoffer, og omfatter en stor andel av nyrevevet. Denne delen består hovedsakelig av nefroner, som produserer urinen. Hvert nefron består av glomerulus og tubulus. Glomerulus er et nøste av kapillærslynger som er presset ned i en blære (Bowmans kapsel). Glomerulus skiller ut avfallsstoffer som vann, salter, og nitrogen fra blodet via denne kapselen. Her blir plasma presset gjennom et filter som består av celler kalt podocytter, og dette danner filtratet preurin. Preurin går via tubulus til urinlederne, som er plassert på hver sin side av nyren, og følger nyren på langs til de munnene i urinblæren (*vesica urinaria*) (Kryvi & Poppe, 2016). I ferskvann vil nyren beholde saltene og kvitte seg med vannet, slik at ionebalansen i fisken opprettholdes. I saltvann er det motsatt, da fisken drikker saltvann og får i seg store mengder av natrium og klor. Her vil nyren absorbere så mye vann som overhodet mulig, mens den skiller ut saltene i urinen. Dette gjør at det blir en lavere mengde urin, men med høy konsentrasjon av ioner. Siden andre organer, som gjeller, og tarm også er viktige i saltbalansen til fisken, kan sykdomsprosesser i nyrene foregå lenge uten at homeostasen blir påvirket (Kryvi & Poppe, 2016).

Den endokrine delen av nyren består av interrenalceller, suprarenallegemer og stanniuslegemet. Interrenalceller ligger spredt i hodenyren og er homologe til binyrebarken hos pattedyr. Disse cellene produserer steroidehormoner, der cortisol er særlig viktig. Dette hormonet frigjøres når fisken blir stresset, og er svært viktig i stresstilpasningen og stressresponsen til fisk (Mommsen, Vijayan, & Moon, 1999).

Suprarenallegemene er homologe med binyremargen hos pattedyr, og kan finnes i hodenyren hos fisk. Disse legemene kalles kromaffine celler da hormonene de produserer kan oksidere med kromat, noe som danner reaksjonsprodukter som er brun i fargen. De produserer adrenalin og noradrenalin, som er svært viktige i «fight or flight» responsen til dyr. Denne responsen fører til økt blodtrykk, hjertefrekvens, slagvolum og blodsukknivå. Disse hormonene fører

også til at blodgjennomstrømningen i sekunderlamellene i gjellene øker, og at fisken begynner å hyperventilere (Kryvi & Poppe, 2016).

Stanniuslegeme finnes kun i beinfisk. Mengden stanniuslegemer i en fisk kan variere fra noen få til et par hundre, utfra arten (hos laks er det relativt få). Dette legemet produserer et hormon; stannicalcin, som fjerner  $\text{Ca}^{2+}$  i blodet (Kryvi & Poppe, 2016).

## 1.2 Blodet

Sirkulasjonssystemet til fisk inkluderer hjertet, arterier, vener og kapillærer som frakter respirasjonsgasser, avfall, ekskretoriske metabolitter, mineraler og næringsmidler. Blodet består hovedsakelig av plasma og blodceller, der blodceller videre kan deles opp i erythrocytter (røde blodceller) og leukocytter (hvite blodceller).

De røde blodcellene frakter oksygen og i noen grad  $\text{CO}_2$  mellom gjellene og kroppen til fisken. Erythrocyttene står vanligvis for 20-40% av fiskens totale blodvolum (hematokrit) og blir hovedsakelig produsert i hodenyren. Hemoglobin er et protein i de røde blodcellene som binder oksygen og frakter dette rundt i kroppen. Bloddannende vev, nyre, milt og thymus kalles hematopoietiske vev. I motsetning til mennesker har ikke fisk verken benmarg eller lymfeknuter, som er hematopoietiske vev i pattedyr (Kryvi & Poppe, 2016).

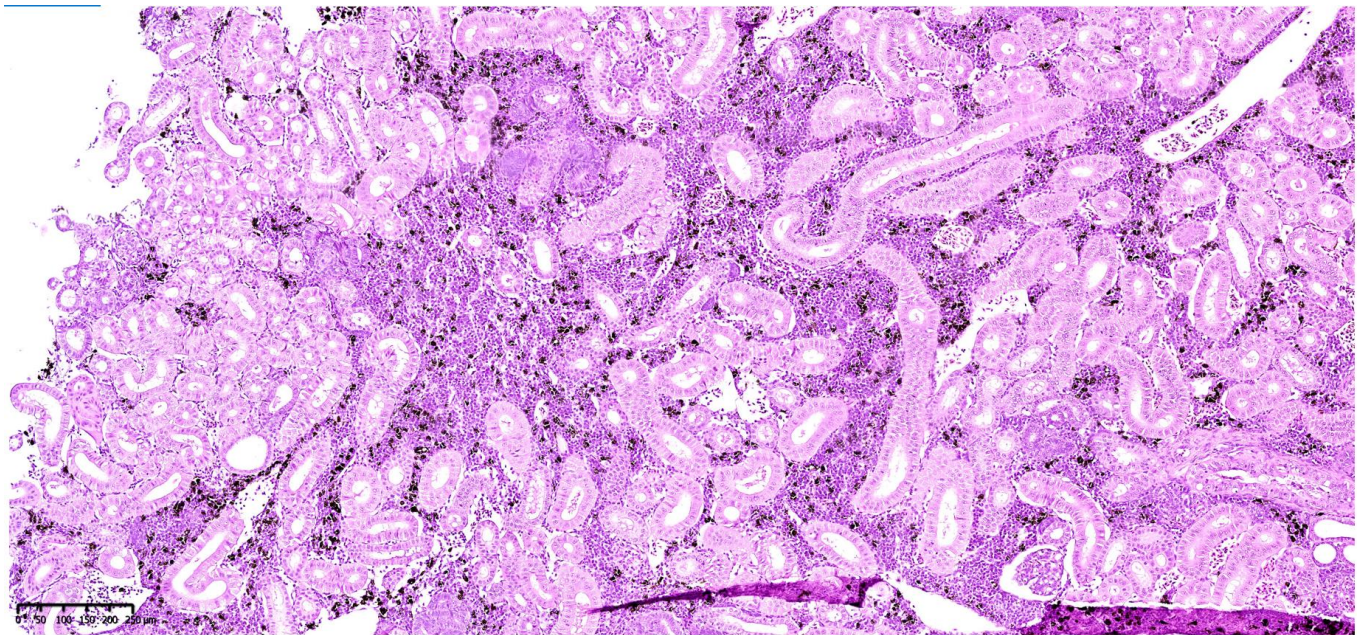
### 1.3 Smoltifisering

Alle salmonider begynner livet sitt i ferskvann, og de anadrome artene som laks, røye og ørret, vil migrere til sjøvann når de har gjennomført smoltifiseringen (Björnsson et al., 2011). Under smoltifiseringen skjer en rekke endringer i fisken for å forberede den på det kommende livet i sjøvann. Disse endringene strekker seg fra forandringer i farge, til komplekse tilpasninger i fiskens blod, respirasjon, samt hormonbalanse. Denne prosessen iverksettes etter fisken får miljøsignaler om at det er tid for å smoltifisere, noe som kalles et smoltifiseringsvindu (Handeland et al., 2004). I våre farvann er smoltifiseringsvinduet om våren, men det er også laks i for eksempel England og Nord-Amerika som migrerer til havet om høsten. I løpet av denne prosessen, vil fisken gjennomgå viktige utseendemessige forandringer. Før smoltifiseringen har fisken mørke tverrgående flekker, også kalt parrmerker, som er gunstig for kamuflasje i elvene. Etter smoltifiseringen vil fisken få en sølvfarge som egner seg bedre som kamuflasje i havet. I tillegg vil fisken få en slankere, mer strømlinjet form (Helfman et al. 2009). Man vil også kunne se en nedgang i kondisjonsfaktor som et resultat av denne slankere strømlinjete formen (McCormick & Saunders, 1987).

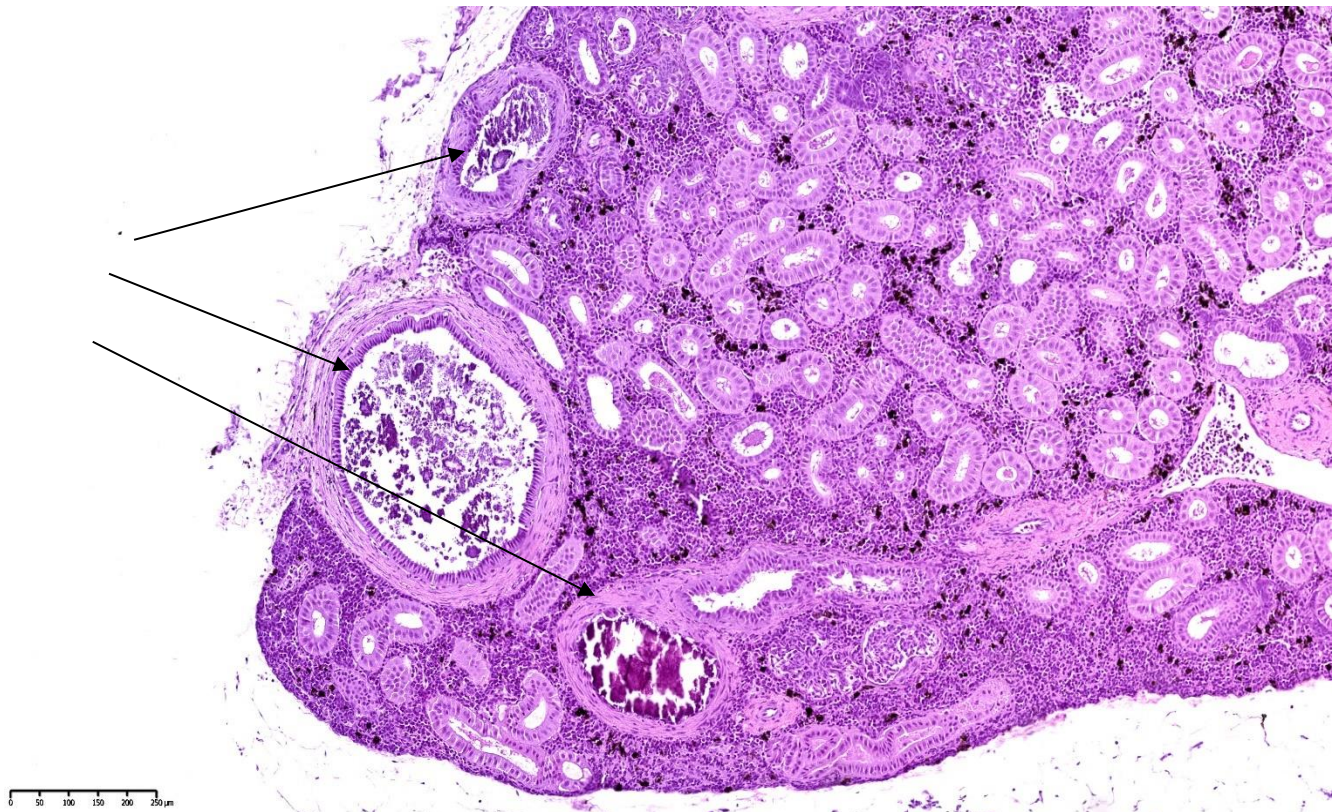
Hemoglobinet i blodet blir mer komplekst ved smoltifiseringen, noe som endrer affiniteten for  $O_2$ . Denne endringen er gunstig for å gjøre fisken klar til et miljø som kan ha lavere oksygentilgang enn det man finner i elvene. Det skjer også endringer i gjellene for å motvirke de hyperosmotiske effektene i sjøvann. Disse endringene inkluderer økt antall saltvannskloridceller, og en endring i ione-permeabilitet (Helfman et al. 2009). Utviklingen av kloridcellene blir stimulert av en økt mengde growth hormone (GH) og cortisol i fisken, som fører til en endring i tarmens osmoregulerende funksjon. Dette gjør at fisken kan kompensere for den hyperosmotiske effekten ved å drikke sjøvann, for så å absorbere ioner i tarmen (Wilson, Wilson, & Grosell, 2002), skille ut overflødige enverdige ioner over gjellene, og flerverdige ioner gjennom nyrene (Björnsson et al., 2011).  $Na^+/K^+$  ATPase aktiviteten vil øke, som vist i analysen til Borgatti et al. (1992). De referer til forsøk som viser en økning av  $Na^+/K^+$  ATPase i regnbueørret fra 2.9 ( $\mu\text{mol } P_i/\text{mg protein/time}$ ) til 12.6, og en økning i atlantisk laks fra 2.1 ( $\mu\text{mol } P_i/\text{mg protein/time}$ ) til 11.0 (Borgatti et al., 1992). De hormonelle endringene inkluderer en økning i corticosteroider, prolactin og vekst hormoner, noe som påvirker metabolismen, ione-balansen og osmoreguleringen (Helfman et al. 2009).

## 1.4 Nefrokalsinose

Nefrokalsinose beskriver en deponering av kalsium i nyren (Shavit et al., 2015). Dette er forkalkninger som oppstår i nyretubuli, og kan hos laksefisk ødelegge nyrens funksjon og fører til nedsatt kondisjon, vekst, og i ytterste konsekvens død (Fivelstad et al., 2018, 1999). Granulomer i mucosa og muskellesjoner har blitt observert i alvorlige tilfeller der nyren er svært skadet (Hicks et al. 1984). Sykdom kan sees makroskopisk etter hvert i sykdomsforløpet, og kan bli diagnostisert både makroskopisk eller mikroskopisk (figur 4 og 5).



*Figur 4: Det øverste bildet er tatt fra baknyren til fisk nr. 315 tatt ut i sluttuttaket og viser hvordan vanlig histologi av en frisk nyre ser ut. Denne fisken kom fra en av kontrolltankene. Foto: Erik Michelsen.*



*Figur 5: Bildet viser et tverrsnitt av baknyren til fisk nr. 366 ved sluttuttaket. Denne fisken ble tatt fra tanken som hadde høy CO<sub>2</sub> kombinert med høy O<sub>2</sub>. Utfellingene av nefrokalsinose er markert med svarte piler. Foto: Erik Michelsen.*

Tidligere forskning tyder på at økt CO<sub>2</sub> konsentrasjon kan føre til utvikling av nefrokalsinose, noe som har blitt gjenskapt i flere ulike forsøk (Fivelstad et al., 2018, 2003, 1999; Khan et al., 2018), men nefrokalsinose oppstår trolig som et utfall av flere ulike faktorer (se appendix 7.1). Flere studier har blitt publisert der høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon (Smart et al. 1979), og mangler eller overskudd i fiskens diett, som svært høyt innhold av selen (Hicks et al. 1984) eller mangel på magnesium (Cowey et al., 1977), har resultert i nefrokalsinose. Det ble gjort forsøk på diett hos kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) som viste at laksen som fikk fôr med høye ratioer av kalsium eller fosfor i forhold til magnesium, utviklet nefrokalsinose (Richardson et al., 1985). Det er også blitt funnet nefrokalsinose i anlegg som har tilsynelatende helt normale CO<sub>2</sub>-nivåer, noe som forsterker teorien om at det er flere faktorer som ligger i bunn for utviklingen av denne sykdommen (Marinhelse, 2019).



Fiskehelsetjenesten Marinhelse har laget en oversikt over faktorer de mener fører til utvikling av nefrokalsinose. Følgende parametere er antatt å forårsake nyreforkalkningene (Marinhelse, 2019):

Når det gjelder vannkvalitet er det høye CO<sub>2</sub>-nivåer, hurtige endringer av CO<sub>2</sub>-nivåer, lave O<sub>2</sub>-nivåer, lav pH, og hurtige endringer i pH, høy tetthet av fisk, høy alkalitet og stort innhold av kalsium i driftsvann (Hardhet). På ernæringsiden er det stor tilgang på fosfor, lavt nivå av magnesium, toksiske nivåer av selen og arsen, og helsefôr med høyt nivå av antioksidanter. Av de indre biologiske rytmene som forstyrres, nevnes osmoreguleringen. Dette fører til problemer med sjøvannstilpasningen og smoltifiseringsprosessen (Marinhelse, 2019).

Ifølge Skov (Skov, 2019) kan samtidig hyperkapnia og hyperoksia føre til økt forekomst av nefrokalsinose. Hyperkapnia er en oppbygning av CO<sub>2</sub> i blodet, og hyperoksia er når blod og vev får tilført for mye oksygen på grunn av høy oksygenmetning (Brauner et al., 2000; McArley et al., 2021). Grunnen kan være at begge faktorene påvirker fiskens syre-base regulering som kan føre til forandret nyrefunksjon (bl.a. forhøyet bikarbonat og pH i urinen som kan føre til utfelling). I tillegg fungerer fiskens syre-base regulering dårligere ved lav temperatur.

I en fordypningsoppgave studerte Thomsen (2019) makroskopisk nefro-score, samt en egenutviklet score i håp om å lage en bedre scoringsmodell for nefrokalsinose. Analyser ble gjennomført av utfellingene i nyren, der studien viste at utfellingene ikke bare varierer morfologisk, men også varierer i sammensetning. Det vanligste var 2 ulike varianter av Dahlitt (fosfatmineral), og 3 andre mineraler, der to av utfellingene kun ble funnet i regnbueørret (Thomsen, 2019).

Et tidligere forsøk fra Canada analyserte også utfellingene i nyren ved å skille utfellingene fra nyrevevet ved omrøring i destillert vann, deretter ble utfellingene vasket med 95% etanol, og lufttørket. Disse utfellingene ble så utsatt for 0.1 n HCl, 1 n HCl, 1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 n NaOH, samt flere løsemidler (etanol, aceton og eter). Noen av utfellingene ble tatt ut ved å koke vevet i 10% NaOH. Utfellingene som ble tatt ut ved røring inneholdt 19,3% Ca, 2,3% Mg, 13,1% P, og 4,9% karbonater. De som ble tatt ut ved koking i NaOH bestod av 30,3% Ca, 2,5% Mg, 15,3% P, og 2,5% CO<sub>3</sub>. Forfatterne mener at Ca:P ratioen samsvarer med ratioen for Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Gillespie & Evans, 1979).

Selv med disse forskningsprosjektene som er beskrevet, har det vært vanskelig å gjenta resultatene og det er derfor svært lite kunnskap om hvilke faktorer som konsistent fører til utvikling av nefrokalsinose, samt hvordan og hvorfor avleiringen i nyren skjer.

## 1.5 Karbondioksid

Karbondioksid er et av avfallsproduktene som dannes gjennom en aerob metabolisme, og er en svak syre som kan endre syre-base balansen i dyr. På grunn av dette har organismer dannet et system som sørger for at dette blir skilt ut til miljøet (Brauner et al., 2019). Fisk er svært sensitiv for miljøendringer i vannet fordi gjellene er eksterne strukturer og brukes til oksygen opptak og frigjøring av karbondioksid (Lefevre, 2019). På grunn av den lave løseligheten av  $O_2$  i vannet må gjellene være ytterst permeable for å plukke opp så mye oksygen som mulig fra omgivelsene, og kan nesten sammenlignes med en pose fylt med blod (Bone & Moore, 2008).  $CO_2$  hydreres i blodet til  $HCO_3^-$ , som er transportformen til  $CO_2$ .  $H^+$  og  $HCO_3^-$  overføres over gjellene i bytte mot  $Na^+$  og  $Cl^-$  (Gilmour & Perry, 2009). Forhøyet  $CO_2$  kan påvirke fisken på mange måter. Først vil det skje en primær stressrespons, som involverer frigjøring av stresshormoner. Etter hvert vil det skje en sekundær stressrespons. Disse inkluderer metabolske, og osmoregulatoriske endringer, og hvis vannkvaliteten ikke forbedres vil de tertiære stressresponsene slå inn, som kan føre til redusert vekst og sykdomsmotstand samt økt dødelighet. Andre effekter av utsettelse for forhøyde  $CO_2$  nivåer kan være forstyrrelser i homeostasen, respirasjonen, blod sirkuleringen og nerveaktiviteten (Ishimatsu et al., 2004). Store mengder  $CO_2$  i vannet (hyperkapnia) kan også føre til en acidisering av kroppsvæsker, blant annet blodet (Hayashi et al., 2004; Helfman et al. 2009). Forsuring av blodet endrer hemoglobins (Hb) evne til å binde og frakte oksygen rundt i kroppen, da hemoglobins evne til å binde oksygen blir svekket i sure omgivelser (Helfman et al. 2009).  $CO_2$  gjør at Hbs affinitet for  $O_2$  svekkes via Bohr effekten, men kan også svekke Hbs evne til å binde oksygenet via Root effekten. Bohr effekten beskriver hvordan Hbs affinitet for oksygen endres fra høy i respirasjonsorganene for å plukke opp  $O_2$ , til lav i andre deler av kroppen for å levere oksygenet til vevene som trenger det mest (Patel & Cooper, 2018).

Root effekten er noe som skjer spesifikt i fisk og er mest vanlig i teleoster. Den er et fenomen der hemoglobins affinitet og evne til å binde  $O_2$  synker når konsentrasjonen av karbondioksid stiger (Brittain, 1987). Dette fenomenet har utviklet seg for å tilføre oksygen mot høye oksygengradienter, som for eksempel i svømmeblæren og i retina (Verde et al., 2007). Root effekten kan fungere som en stressor for fisken da oksygentilførselen til organer senkes (Brauner et al., 2019). I motsetning til hos landbaserte dyr kan ikke fisk kompensere for høy

intern  $\text{CO}_2$  ved hyperventilering (Evans et al., 2005). En slik forsurenning av kroppsvæskene kan være svært skadelig, da mesteparten av de interne prosessene i fisk er svært pH sensitive (Brauner et al., 2019). Endringene i pH vil utjevne seg og gå tilbake til vanlige nivåer etter 2-7 dager da bikarbonat nivået i vannet vil øke med tid (Eddy et al., 1977). Nyrene er også med på å regulere syre-base balansen i fisken, i noe mindre grad (bare ca. 5% av syre-base balansen) (Brauner et al., 2019). Nyren står for en stor grad av reabsorpsjon av  $\text{HCO}_3^-$  som «går tapt» i filtreringen i glomerulus.

I RAS anlegg vil  $\text{CO}_2$  nivåer måtte kontrolleres nøye, da  $\text{CO}_2$  hele tiden tilføres vannet gjennom respirasjonen til fiskene. Dessuten blir vannet resirkulert, noe som betyr at uten ordentlig avgassing/utlufting vil  $\text{CO}_2$  nivået stige over tid. I denne sammenhengen er andre faktorer som pH og temperatur i vannet også viktig å kontrollere da vannet har forskjellig metningsgrad for  $\text{CO}_2$  om det er varmt, kaldt, surt eller basisk. På grunn av disse faktorene er det svært viktig å ha velfungerende avgassing systemer i RAS anlegg (Aslam et al., 2019). For hver 10mg/L med oksygen som brukes av fisken i respirasjonen blir 13-14 mg/L  $\text{CO}_2$  utskilt fra gjellene (Hu et al., 2011). Det er ikke blitt definert en konkret grenseverdi på hva som regnes som helt trygge  $\text{CO}_2$  konsentrasjoner, men undersøkelser av vannkvalitet tyder på at fisken kan få problemer ved konsentrasjoner høyere enn 15mg/L (Rosten et al., 2004).

## 1.6 Målsetning

Hovedformålet med prosjektet var å undersøke om forhøyet CO<sub>2</sub> påvirket vekst, kondisjonsfaktor, organindekser, mineralinnhold i nyre, og utvikling av nefrokalsinose i to ulike forsøk med laks under smoltifisering.

Dette inkluderte å undersøke om CO<sub>2</sub> eksponering påvirker:

- vekst, kondisjonsfaktor og organindekser
- sammensetning av mineral i nyre
- forekomst av nefrokalsinose

Det ble også undersøkt om opphavet til fisken påvirket:

- vekst, kondisjonsfaktor og organindekser
- sammensetning av mineral i nyre

0-Hypotese: CO<sub>2</sub> påvirker ikke vekst, kondisjonsfaktor, organindekser, mineralsammensetning eller forekomst av nefrokalsinose.

Hypotese 1: CO<sub>2</sub> eksponering påvirker mineralsammensetning i nyre, vekst, kondisjonsfaktor, organindekser og øker forekomst av nefrokalsinose.

Hypotese 2: Eksponering for høye O<sub>2</sub> konsentrasjoner kombinert med høye CO<sub>2</sub> konsentrasjoner påvirker mineralsammensetning i nyre, vekst, kondisjonsfaktor, organindekser og øker forekomst av nefrokalsinose.

Hypotese 3: Fisk fra intensiv drift er mer mottakelig for NK

## 2 Metoder

### 2.1 Forsøk

To forsøk ble utført med laks i smoltifiseringsstadiet, som ble utsatt for forhøyet CO<sub>2</sub> nivå ved ulike parametere (se tabell 1 for mer info).

Analysen av CO<sub>2</sub> innholdet i vann ble analysert av Høgskolen på Vestlandet.

Tabell 1: Parametere for forsøk 1 og 2.

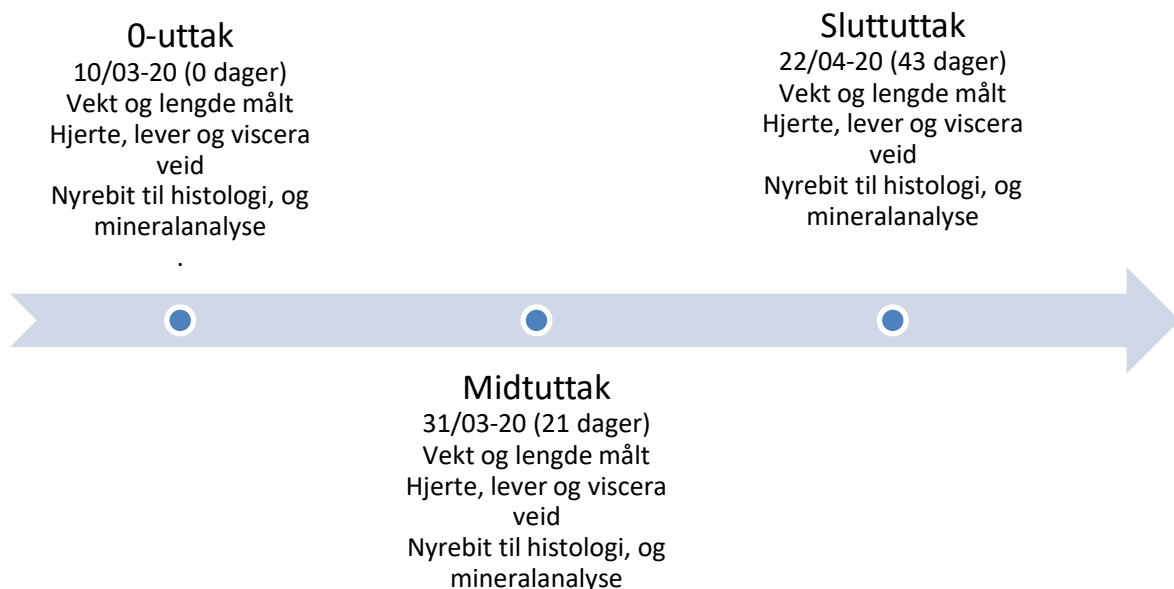
Miljøparameter i forsøkene	Forsøk 1	Forsøk 2
Vekt	Gruppe A: 73 ±10g Gruppe B: 105 ±16g	110±17g
CO <sub>2</sub> (mg/L)	11,8-15,6	20-25
Oksygenmetning	100%	Ca.100%, og 125%
Temperatur	9	5
pH	7-8	6,5
Lysperiode	Kontinuerlig lys (24:0)	Kontinuerlig lys (24:0)
Buffring	Saltvann (8‰)	Natrium Bikarbonat
Varighet	43 dager (387 døgngrader)	78 dager (390 døgngrader)
Fôr	Skretting Nutra Olympic	Skretting Nutra Olympic
Tankstørrelse	1x1m	1x1m
Salinitet	8‰	0‰

### 2.1.1 Forsøk 1: Høy CO<sub>2</sub> – Eksperimentelt oppsett

Forsøk 1 ble utført ved Matre Havbruksstasjonen i perioden 10.03.20 til 22.04.20. I prosjektet ble fisk fra to ulike grupper undersøkt, der den ene historisk sett hadde en kjent nefrokalsinosehistorikk. Gruppen uten NK-historikk ble kalt «Gruppe A» og var fra en forsøksstasjon, og den andre gruppen med NK-historikk ble kalt «Gruppe B» og var fra et kommersielt settefiskanlegg. Fisken ble fordelt på fire kar hver, der det i to av karene ble holdt ved standard produksjonsbetingelser (kontroll). Fisken i to av de andre karene ble eksponert for høy CO<sub>2</sub>. Fisken ble eksponert for forhøyet CO<sub>2</sub> og normal CO<sub>2</sub> i 43 dager (387 døgngrader) under smoltifisering.

Fisk fra gruppe A hadde ved start av forsøket en snittvekt på 73±10g og fisken fra gruppe B hadde en snittvekt på 105±16g.

Det ble brukt Skretting Nutra Olympic som fôr, og en temperatur på 9°C. I dette forsøket ble karene som var tilsatt CO<sub>2</sub> buffret med saltvann (8 promille) for å unngå forsuring av vannet. I forkant av forsøket hadde fisken fått vintersignal (lysperiode 12:12), mens den i forsøket fikk kontinuerlig lys (24:0) for å smoltifisere.



Figur 6. Oppsett for prøveuttak, med de ulike prøvene som ble tatt ved hvert uttak i forsøk 1. I 0-uttaket ble det tatt ut 8 fisk fra hver gruppe fra CO<sub>2</sub> tankene, og 4 fisk fra hver gruppe fra kontrolltankene. I midt- og sluttuttaket ble det tatt ut 16 fisk per gruppe fra CO<sub>2</sub> tankene og 16 fisk per gruppe fra kontrolltankene.

### 2.1.2 Forsøk 2: Høy CO<sub>2</sub> og høy O<sub>2</sub> – Eksperimentelt oppsett

Fisken i forsøk 2 var fra samme kommersielle anlegg som fisken i gruppe B i forsøk 1, og hadde en snitt vekt på 110±17g. I dette forsøket ble fisken utsatt for enten høy CO<sub>2</sub>, eller høy CO<sub>2</sub> i kombinasjon med høy O<sub>2</sub> i 11 uker (390 døgngrader) under smoltifiseringen, fra 7. januar – 26. mars. Forholdene i tankene med hensyn på lys, temperatur, og varighet var identiske i alle tankene, men CO<sub>2</sub>, og O<sub>2</sub> var forskjellig. CO<sub>2</sub> nivåene ble jevnlig målt ved hjelp av en Oxyguard CO<sub>2</sub> analyser. Fisken hadde stått på 24t lys fra de ble overført til Industrielaboratoriet (Ilab) og vanntemperaturen var like over 5C° for å hindre at fisken gjennomgikk smoltifiseringen for tidlig. I dette oppsettet var det to kontrolltanker, som ikke ble tilført noe, to tanker som ble tilført 20-25mg/L CO<sub>2</sub>, og to tanker der det ble tilført 20-25mg/L CO<sub>2</sub> i tillegg til at vannet hadde en oksygenmetning på 125%. I dette forsøket ble bikarbonat brukt som buffer for å forhindre forsuring av vannet. Det ble brukt vanlig Skretting Nutra Olympic som fôr. Fiskene ble fordelt i kar på 1x1m, med en vanntemperatur på 5°C.

Prøveuttak: Det ble gjort et 0-uttak, et midtuttak og et sluttuttak (figur 7).



Figur 7. Oppsett for prøveuttak, med de ulike prøvene som ble tatt ved hvert uttak. Ved 0-uttaket ble det tatt ut 6 fisk per behandling. Ved midt- og sluttuttaket ble det tatt ut 20 fisk per behandling.

## 2.2 Prøveuttak

Forsøk 1: som vist i figur 6 ble det i 0-uttaket tatt ut og dissekert 8 fisk per gruppe fra CO<sub>2</sub> tankene, og 4 fisk per gruppe fra kontrolltankene. I midt- og sluttuttak et ble det tatt ut 16 fisk per gruppe fra CO<sub>2</sub> tankene og 16 fisk per gruppe fra kontrolltankene. Hjertet og leveren ble veid individuelt, og viscera ble så veid før videre prøver ble tatt. Etter veiing ble det tatt ut prøver av halve hjertet, halve baknyren, leveren, og hvit muskulatur som ble flashfrost i flytende nitrogen. Disse prøvene ble deretter analysert for mineralinnhold på laboratoriet ved Havforskningsinstituttet i Bergen. Histologisk vurdering av nyresnitt ble gjort på alle fiskene, ved Veterinærinstituttet i Bergen.

Forsøk 2: På Ilab ble det gjennomført tre uttak (figur 7). Det ble tatt ut og dissekert 6 fisk per behandling ved 0-uttaket, og 20 fisk per behandling i midt- og sluttuttaket. I forsøk 2 ble det tatt samme prøver som i forsøk 1. Analyser av mineralinnhold ble gjort på et utvalg av 25 fisk fra forsøk 1, og 32 fisk fra forsøk 2.



## 2.3 Klargjøring av prøver til mineralanalyse

For å kunne analysere sporelementene i fiskens nyre ved hjelp av induktivt koblet plasma-massespektrometri (ICP-MS) må vevet føres over til væskeform med lav viskositet. Det brukes konsentrerte syrer som frigjør sporelementene i form av ioner ved å bryte ned organiske forbindelser i molekylerne. For å gjennomføre denne prosessen fortere brukes varme i form av en slags mikrobølgeovn. Det er forskjeller i hvordan stoffer vil oppta mikrobølgene, derfor brukes vann da dette absorberer energien godt. Oppvarmingen blir jevn i hele mediet istedenfor å bli konsentrert i ulike punkter.

Metoden innebærer arbeid med syrer som  $\text{HNO}_3$  og  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Det brukes derfor hansker i vinyl, og alt arbeidet foregår i avtrekk for å unngå inhalering av gasser fra syrene.

### 2.3.1 Materialer

- Nitrogengass
- Konsentrert salpetersyre, >69% suprapure ( $\text{HNO}_3$ ), eller egendestilert syre av tilsvarende kvalitet
- Hydrogenperoksid, 30% p.a ISO
- «Milli-Q vann» som er deionisert og filtrert

### 2.3.2 Instrumenter

- Milestone UltraWave og UltraClave Microwave Digestion System med styringsenhet
- Analysevekt med fire desimaler for veiing i gram
- Prøverør/holdere beregnet til bruk med UltraWave oppslutningssystem: 15ml prøverør av teflon, korker av teflon, og et 15 posisjons prøvestativ
- 25ml målekolbe
- 50ml polyetylen sentrifugerør, eventuelt andre plastrør for oppbevaring av prøveløsningen
- Labsystems Finnpietter med tip

Prøvene ble sluttet opp på UW ved hjelp av ett program som øker temperaturen trinnvis opptil  $255^\circ\text{C}$  (tabell 2).

### 2.3.3 Prosedyre

Prøvene fra forsøkene ble rørt og blandet godt slik at det var en mest mulig representativ del av prøven når den ble veid inn.

Prøvene ble veid inn i en analysevekt, og ble så tilsatt 2ml konsentrert salpetersyre ( $\text{HNO}_3$ ).

### 2.3.4 Oppslutning med UltraWave (UW)

Den store teflonbeholderen (baseload) som ble plassert i oppslutningsenheten ble fylt med 130ml deionisert vann og 5ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

*Tabell 2: Programmet som ble brukt med UW fulgte denne tabellen som viser intervaller i tid der det skjer temperaturendringer.*

<b>Tidsintervall (min)</b>	<b>Temperaturendring</b>
10	Øker til 80°C
2	Holder 80°C
5	Øker til 105°C
5	Holder 105°C
5	Øker til 255°C
10	Holder 255°C

### 2.3.5 Oppslutning med UltraClave (UC)

Baseloaden for UltraCave ble fylt med 300ml vann, og 10ml hydrogenperoksid, programmet kjørt for UC kan en se i tabell 3.

Tabell 3: Programmet som ble brukt med UC fulgte denne tabellen, som viser intervaller i tid der det skjer temperaturendringer.

Tidsintervall (min):	Temperaturendringer:
10	Øker til 80°C
5	Holder 80°C
5	Øker til 105°C
10	Holder 105°C
15	Øker til 255°C
20	Holder 255°C

### 2.3.6 Vasking av prøverør

Før og etter oppslutningen måtte det sørges for at prøverørene ikke var kontaminert fra tidligere oppslutninger. Derfor ble det brukt en «TraceClean». Dette er en syrevaskemaskin som vasker rørene med HNO<sub>3</sub> ved høy temperatur. Etter vaskingen ble rørene skylt med deionisert vann og lufttørket.

## 2.4 Analyse av makromineraler i nyrevev

For å analysere prøvene må det benyttes et induktivt koblet plasmamassespektrometer (ICP-MS). Her blir det målt for kalsium, kalium, natrium, magnesium og fosfor. UW og UC brukes for å gjøre prøvene klar til å analyseres kvantitativt med ICP-MS. Prøveløsningen ble forstøvet og ført inn i plasma dannet av oppvarmet argongass (Ca. 7000°C). I plasma ble løsemiddelet fordampet, og elementene ble ionisert og ført videre frem til en massesensitiv detektor som registrerer de valgte massene som antall treff pr. sek. Elementkonsentrasjonene ble beregnet

ved hjelp av en ekstern standardkurve. Scandium brukes som en intern standard for korreksjon av drift (unøyaktigheter etter gjentatt bruk). Scandium er valgt til formålet fordi det ikke finnes naturlig i prøvematerialet, har lite eller ingen interferens, og er i samme masseområde som analyttene.

#### 2.4.1 Instrumenter og utstyr

- Analysevekt med 4 desimaler
- UC eller UW for oppslutning med syre og mikrobølger med ulike prøvebeholdere
- Vannrenseanlegg: Millipore RiOs oppkoblet mot Millipore Milli-Q Academic
- Sentrifugerør av polyetylen med skrukork: 50ml
- Finnpipetter med tips
- ICP-MS iCAP Q (ThermoFisher) med kollisjonscelle og FAST SC-4DX autosampler  
Programvare Qtegra iCAP Q
- Argon Ultraren (99.999%)
- Helium ultra pluss 6.0

#### 2.4.2 Sekvens-oppsett

Prøveserien ble satt opp med en ekstern kalibreringskurve, etterfulgt av 5 blindtester og to ulike kontrollmaterialer. I dette forsøket ble det brukt Melkepulver og lever fra oksedyr.

Anbefalt mengde som skal analyseres burde ikke overstige 100 prøver, inkludert standarder og kontrollprøver. I dette forsøket ble det gjennomført 54 prøver.

#### 2.4.3 Prosedyre

Først må prøvene opparbeides som tidligere forklart i 2.3-2.5. Deretter ble det laget standardløsninger. For løsningene ble det brukt Spectrascan multistandard som har et fastsatt innhold av Na, Mg, K, Ca og P. Væsken ble så fortynnet med 5% salpetersyre som vist i tabell 4.

Tabell 4: Tabellen viser blandingsforhold brukt for standardløsningen. Dette blir gjort for å teste at maskinens målinger er nøyaktige.

Standard	Uttak av stam standard (ml)	Tilsetning av 5% HNO <sub>3</sub> (ml)	Konsentrasjon (mg/L)
1	0.10	9.90	Mg, Ca: 2,5 Na, K, P: 5,0
2	0.25	9.75	Mg, Ca: 6,25 Na, K, P: 12,5
3	0.50	9.50	Mg, Ca: 12,5 Na, K, P: 25
4	1	9.0	Mg, Ca: 25 Na, K, P: 50

Analysen av blindprøvene og kontrollprøvene ble så gjort, og resultatene ble sammenlignet med akseptable standarder for å forsikre at maskinen var nøyaktig i målingene. Blindprøven med den mest gjennomsnittlige responsen ble så valgt som prøveblank.

## 2.5 Histologi

For å kunne gjennomføre histopatologisk undersøkelse måtte prøvene fra uttaket fikseres i fosfatbufret formalin. Disse organprøvene ble deretter lagt i voks og snittet i tynne skiver som senere ble farget og undersøkt i mikroskop.

### 2.5.1 Prosessering av vev for histologi

Prinsipp: Målet med fremføringen er å få støpt inn vevet i et fast medium (parafin), slik at de kan snittes uten å skade vevsstrukturen. Fremføringen består av ytterligere fiksering, dehydrering, klaring og parafinimpregnering. Blokkene med vevsprøver legges i en holder, og settes i fremføringsmaskinen.

## 2.5.2 Prosesser

**Fiksering:** Vevsbitene fikses i formalin (4%) for å hindre autolytiske prosesser som kan ødelegge vevets struktur.

**Dehydrering:** Definerert som utskiftning av vann fra vevet med hydrofobe stoffer. Dehydreringen utføres ved bruk av alkohol i økende konsentrasjoner, fra 70% og opp til 100%. Tiden brukt på dette bør være så kort som mulig for å unngå at vevet skrumper.

**Klaring:** Alkohol erstattes med et klaringsmiddel som er løselig i parafin. Klaringsmiddelet brukt i dette forsøket var Xylen, som har samme brytningsindeks som vevsproteinene. Xylen fungerer som et bindeledd mellom alkohol og parafin, da Xylen er løselig i begge midlene. Xylen penetrerer vevet raskt og gir dermed en hurtig klaring for neste steg.

**Parafinimpregnering:** Det siste steget er parafinimpregnering der Xylen erstatter med flytende parafin, og gjøres klar til støpning.

For en mer detaljert beskrivelse av metoden, se tabell 5.

Tabell 5: Tabellen viser programmet som blir benyttet for parafinimpregnering av rutinesnitt.

Trinn	Medium	Tid	Temperatur
1	Fosfatbufret formalin	30 min	Romtemperatur
2	Fosfatbufret formalin	30 min	Romtemperatur
3-8	6 bad med økende alkoholprosent fra 70%-100%	1 time i hvert bad	Romtemperatur
9	Xylen	1 time	Romtemperatur
10	Xylen	1 time	Romtemperatur
11	Xylen	1 time	Romtemperatur
12	Parafin	1 time og 20 min	60,0 ±1,5°C
13	Parafin	1 time og 20 min	60,0 ±1,5°C
14	Parafin	1 time og 20 min	60,0 ±1,5°C

Etter prøvene er ferdig impregnert legges de i en skål slik en vil at de skal snittes. Denne skålen ble så fylt med flytende voks som kjøles ned for å fikse prøvene. På denne måten ender en opp med en «blokk» av voks med prøvene inni, som videre kan snittes i tynne skiver, legges på objektivglass og farges.

**Snitting:** For å snitte prøvene ble det benyttet en mikrotom, en skjæremaskin som benytter et veldig skarpt blad for å snitte svært tynne skiver av voksblokken. Kassetten med voks ble plassert i en klype som fører kassetten opp og ned, mens den også beveger seg nærmere bladet. I dette tilfellet ble mikrotomen stilt inn til å kutte snitt som var 3 $\mu$  tykke. Disse skivene ble så ført ned på en plate med vannstrømming som fører til et vannbad. I vannbadet kan en bruke et objektivglass til å «plukke opp» snittene. Når objektivglasset med snittet hadde tørket ble det markert med prøvenummer og prosjektnummer.

**Rehydrering:** I dette steget må snittet rehydreres før det blir farget, dette steget følger motsatt rekkefølge som dehydreringssteget. Rehydreringen utføres ved bruk av alkohol i synkende konsentrasjoner, fra 100% og ned til 70%. Snittene ble rehydrert fordi HE fargen er vannbasert.

**Farging:** Fargingen ble gjennomført med en Sakura tissue-tek maskin. Objektivglassene ble plassert i maskinen som gjennomførte fargingen. For disse snittene ble det benyttet Hematoxylin-Eosin (HE) farging. Hematoxylinet vil farge cellekjernene lilla/mørkeblå, og eosin vil farge cytoplasma og den ekstracellulære matriksen rosa. Etter dette blir snittene dehydrert igjen, som forklart tidligere. Til slutt ble det benyttet en Tissue-tek film for å dekke objektivglasset og snittet med en tynn film for å forhindre skader som kan forekomme ved transport og håndtering av glassene.

## 2.6 Utregninger

SGR: Formelen for å regne ut SGR var  $SGR = \frac{\ln(\text{vekt slutt}) - \ln(\text{vekt start})}{\text{Antall dager} * 100}$

CF: Formelen brukt for å regne ut k faktor var  $CF = \left( \frac{\text{Vekt (g)}}{\text{Lengde (cm)}^3} \right) * 100$

HSI: Formelen brukt for å regne ut HSI var  $HSI = \left( \frac{\text{Vekt lever (g)}}{\text{Fiskens vekt (g)}} \right) * 100$

VSI: Formelen brukt for å regne ut VSI var  $VSI = \left( \frac{\text{Vekt viscera (g)}}{\text{Fiskens vekt (g)}} \right) * 100$

CSI: Formelen brukt for å regne ut CSI var  $CSI = \left( \frac{\text{Vekt hjerte (g)}}{\text{Fiskens vekt (g)}} \right) * 100$

## 2.7 Statistikk

Det ble brukt Chi-square test, med  $p=0,05$  for å regne ut forskjeller i prevalens av NK (Fivelstad et al., 2018) (appendix 7.3.1). Det ble også brukt en enveis ANOVA med  $p=0,05$  og Tukey HSD post hoc test for å regne ut forskjeller i vekstrate, kondisjonsfaktor, organindekser, og mineralinnhold, se appendix 7.2 og 7.3. Kalsium innholdet i forsøk 1 og k faktor i forsøk 2 var ikke normalfordelt. Disse ble transformert til normalfordeling ved å bruke log10 funksjon i Excel, deretter ble de testet med enveis ANOVA. For de andre testene som ikke var normalfordelt ble Kruskal-Wallis test benyttet. Det ble også gjort toveis ANOVA for å sammenligne fiskene fra de to ulike gruppene. For enveis ANOVA, toveis ANOVA, Kruskal-Wallis og Tukey tester ble Statistica (version 13, TIBCO Software Inc. (2017) brukt. Chi-square testen ble gjennomført i Excel (versjon 2107) ved hjelp av statistikkfunksjonen.



## 3 Resultater

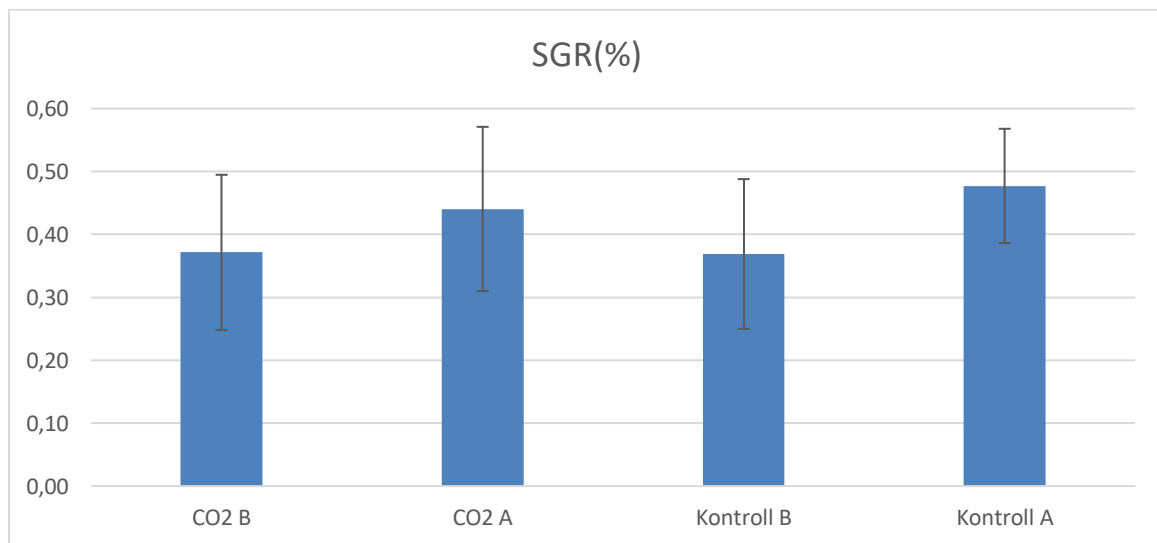
### 3.1 Forsøk 1

#### 3.1.1 Vekst

I forsøk 1 var det litt forskjell mellom CO<sub>2</sub> fisken og kontrollfisken innad i gruppene, og spesielt mye forskjell mellom de to ulike gruppene. Ved avslutning av forsøket var gjennomsnittsvektene i de ulike tankene 132±23g for CO<sub>2</sub> B, 99±17g for CO<sub>2</sub> A, 127±22 for kontroll B, og 98±12g for kontroll A.

Vekstrate ble regnet ut på et individuelt nivå fra start av forsøket til sluttuttaket. Den prøvetatte fisken fra gruppe B hadde samme vekstrate i CO<sub>2</sub> tankene (0,37±0,12%) som i kontrolltankene (0,37±0,12%). Fisken fra gruppe A hadde en høyere vekstrate i kontrolltankene (0,48±0,09%) enn i CO<sub>2</sub> tankene (0,44±0,13%) (figur8). Fiskene fra gruppe A hadde høyere vekstrate enn fiskene fra gruppe B ( $p < 0,05$ ).

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i vekst ved denne CO<sub>2</sub> konsentrasjonen ( $p > 0,05$ ,  $n = 16$ ).

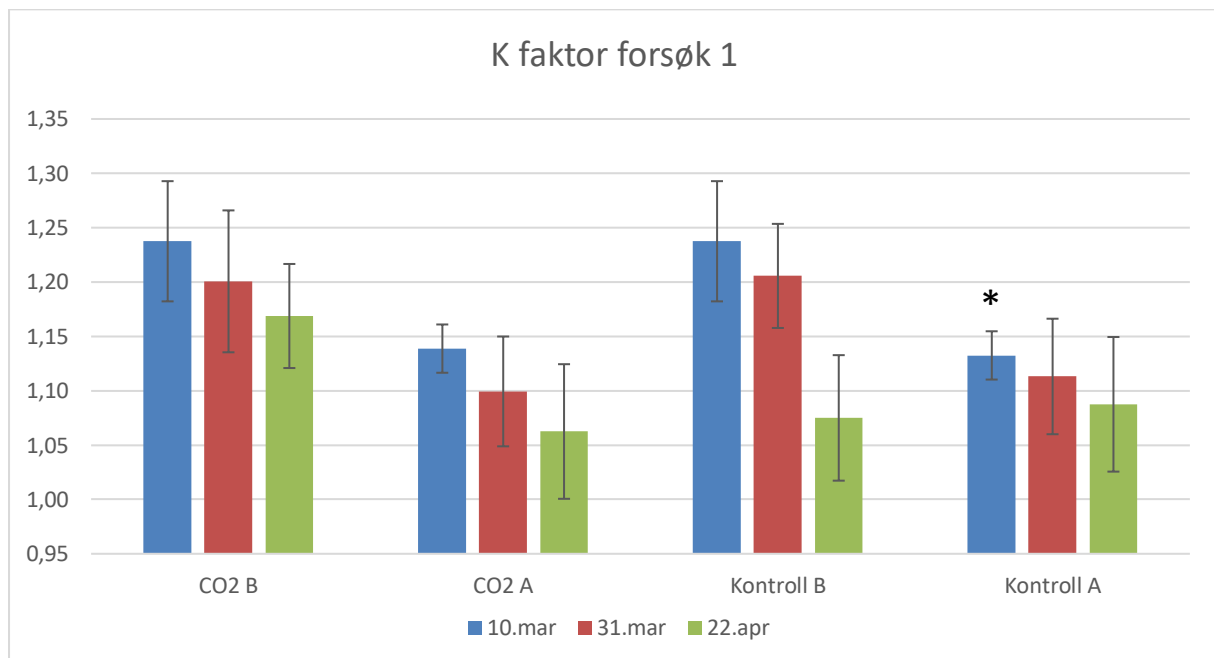


Figur 8: I grafen over kan en se verdiene for SGR (specific growth rate) for prøvetatt fisk fra sluttuttaket i FW, gjennomsnitt±SD.

Det ble observert en generell nedgang i kondisjonsfaktoren til fiskene i alle tankene fra 0-uttak til sluttuttak (figur 9 og tabell 6). Det ble observert en stor forskjell i kondisjonsfaktor mellom fisken i CO<sub>2</sub> B og fisken i de andre tankene ved sluttuttaket ( $p < 0,05$ ), dette var ikke en interaksjonseffekt. Fiskene i CO<sub>2</sub> tankene fra gruppe B hadde en høyere kondisjonsfaktor enn fiskene i alle de andre tankene ved sluttuttaket, og denne forskjellen var signifikant ( $p < 0,05$ ). Det ble ikke oppdaget noen signifikante forskjeller mellom noen av de andre tankene ( $p > 0,05$ ).

Tabell 6: Tabellen viser gjennomsnitt av kondisjonsfaktor med standardavvik for de ulike tankene ved de tre uttakene som ble gjort. For CO<sub>2</sub> B i kronologisk rekkefølge er  $n=12, 16, 16$ . For CO<sub>2</sub> A er  $n=12, 16, 16$ . For kontroll B er  $n=12, 16, 16$ . For kontroll A er  $n=12, 16, 16$ .

Behandling	10. mars	31. mars	22. april
CO <sub>2</sub> B	1,24±0,06	1,20±0,07	1,17±0,05
CO <sub>2</sub> A	1,13±0,02	1,10±0,05	1,07±0,06
Kontroll B	1,24±0,06	1,21±0,05	1,09±0,06
Kontroll A	1,13±0,02	1,11±0,05	1,09±0,06



Figur 9: Grafen viser en oversikt over k faktoren for de tre uttakene som ble gjort, gjennomsnitt±SD. «\*» betyr at det ble funnet en signifikant forskjell i denne fiskegruppen.

### 3.1.2 Nefrokalsinose

I forsøk 1 ble det totalt funnet fem fisk med NK. Av disse fem ble fire funnet ved 0-uttaket, altså før forsøket begynte. Av disse fire fiskene var tre fra gruppe B og 1 fra gruppe A. Den siste fisken med NK ble funnet under sluttuttaket og var fra gruppe B.

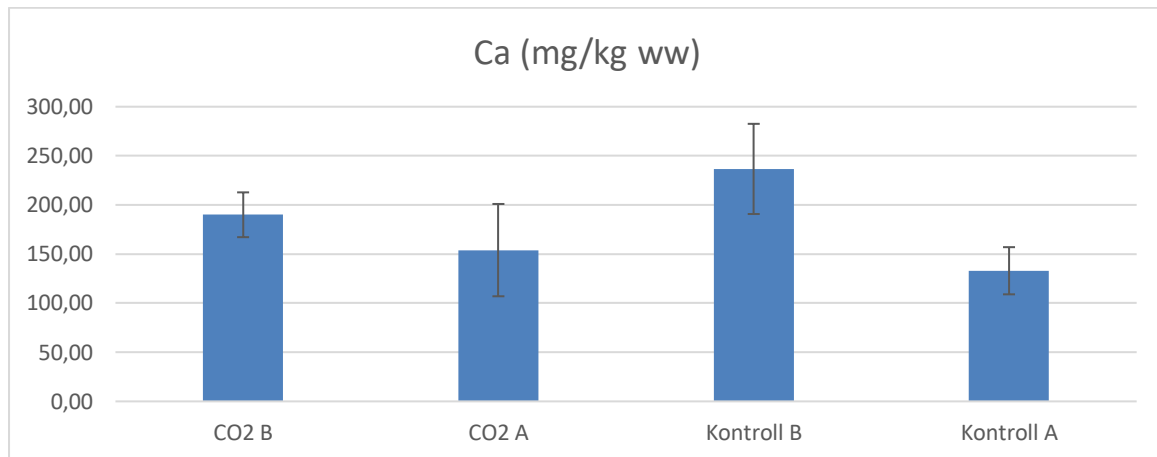
### 3.1.3 Mineralsammensetning i nyre

Mineralsammensetningen i nyrene som ble testet var svært variabel. Det ble funnet signifikant forskjeller mellom fiskene fra de to ulike gruppene, men ikke mellom fiskene som var fra samme gruppe (tabell 7).

Tabell 7: Tabellen viser gjennomsnittresultater av mineralanalysen for Ca, Na, K, Mg, og P fra sluttuttaket med benevnningen mg/kg ww (wet weight), gjennomsnitt $\pm$ SD,  $n(\text{CO}_2 \text{ B})=6$ ,  $n(\text{Kontroll B})=6$ ,  $n(\text{CO}_2 \text{ A})=6$ ,  $n(\text{Kontroll A})=6$ .

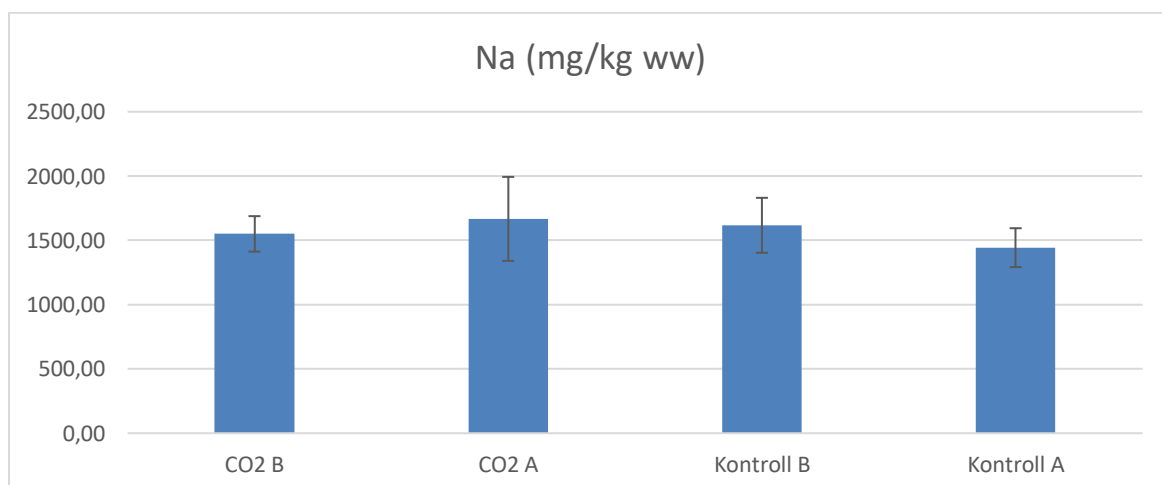
Lokalitet	Behandling	Ca (mg/kg ww)	Na (mg/kg ww)	K (mg/kg ww)	Mg (mg/kg ww)	P (mg/kg ww)
<b>B</b>	CO <sub>2</sub>	190 $\pm$ 23	1550 $\pm$ 137	3750 $\pm$ 83	226 $\pm$ 8	3400,0 $\pm$ 89
	Kontroll	236 $\pm$ 46	1616 $\pm$ 213	3683 $\pm$ 194	233 $\pm$ 12	3483 $\pm$ 116
<b>A</b>	CO <sub>2</sub>	154 $\pm$ 47	1666 $\pm$ 326	4283 $\pm$ 608	245 $\pm$ 32	3733 $\pm$ 516
	Kontroll	133 $\pm$ 24	1442 $\pm$ 151	4085 $\pm$ 389	238 $\pm$ 21	3657 $\pm$ 237

Kalsiuminnholdet i nyrene til fiskene fra gruppe B var høyere enn gruppe A ( $p < 0,05$ ), dette var en interaksjonseffekt. Kontrollfiskene fra gruppe B hadde høyere kalsiuminnhold i nyren enn CO<sub>2</sub> fiskene fra gruppe B ( $p < 0,05$ ), mens kontrollfiskene fra gruppe A hadde lavere kalsiuminnhold enn CO<sub>2</sub> fiskene fra gruppe A, men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ) (figur10).



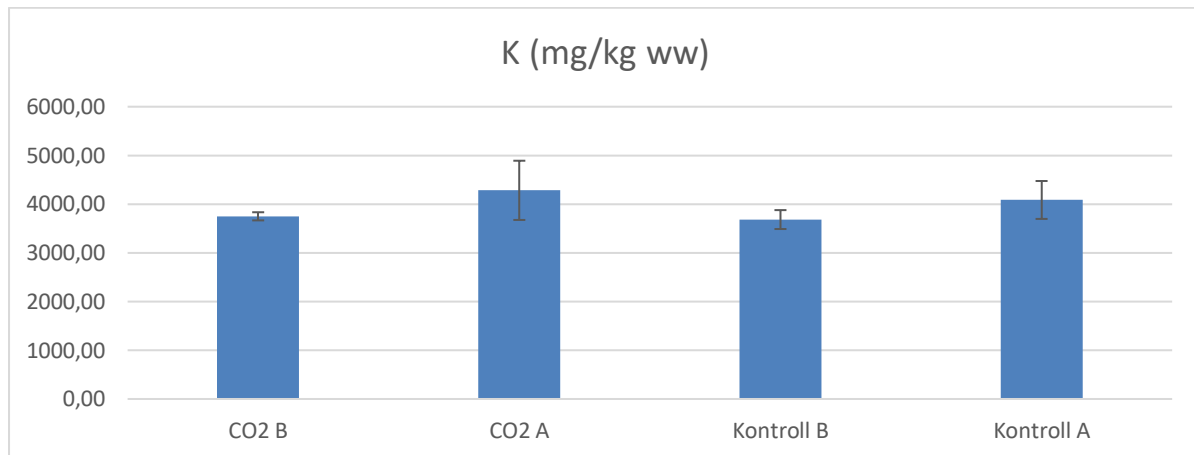
Figur 10: Grafen viser Ca innhold i nyren til fisk fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. CO<sub>2</sub> B: 190 $\pm$ 23mg/kg ww (n=6), CO<sub>2</sub> A: 154 $\pm$ 47mg/kg ww (n=6), Kontroll B: 237 $\pm$ 46mg/kg ww (n=6), Kontroll A: 133 $\pm$ 24mg/kg ww (n=6).

Det var ingen forskjell i konsentrasjon av natrium i nyre mellom fisk fra gruppe A og gruppe B ( $p < 0,05$ ). Kontrollfiskene fra gruppe B hadde høyere natriuminnhold (1616 $\pm$ 214mg/kg ww) enn CO<sub>2</sub> fiskene fra gruppe B (1550 $\pm$ 138mg/kg ww) (figur 11), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ). I fiskene fra gruppe A hadde CO<sub>2</sub> fiskene høyere kalsiuminnhold (1666 $\pm$ 326mg/kg ww) enn kontrollfiskene (1443 $\pm$ 151mg/kg ww) men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ).



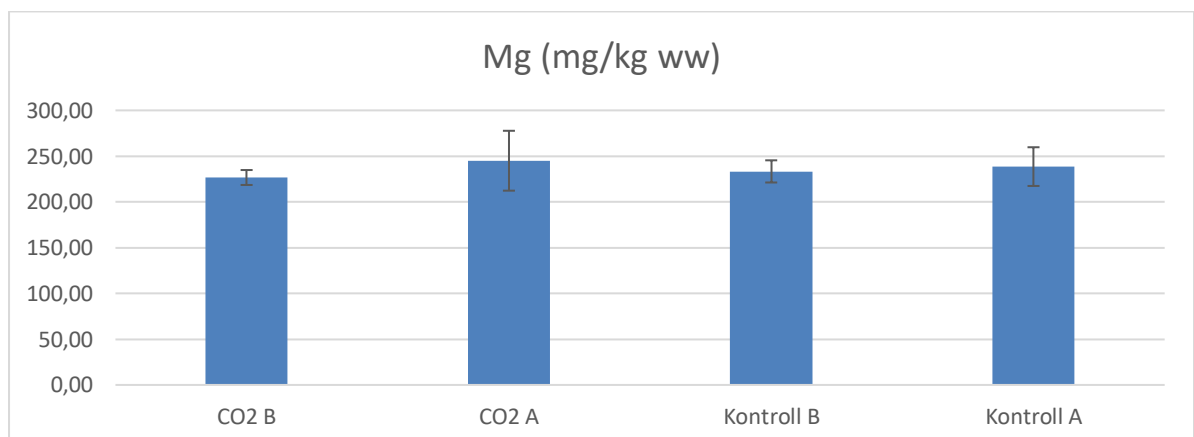
Figur 11: Grafen viser Na innhold i nyren til fisk fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. CO<sub>2</sub> B: 1550 $\pm$ 138mg/kg ww (n=6), CO<sub>2</sub> A: 1666 $\pm$ 326mg/kg ww (n=6), Kontroll B: 1616 $\pm$ 214mg/kg ww (n=6), Kontroll A: 1443 $\pm$ 151mg/kg ww (n=6).

Kaliuminnholdet var høyere i fiskene fra gruppe A sammenlignet med gruppe B ( $p > 0,05$ ) (figur 12). I fiskene fra gruppe A hadde CO<sub>2</sub> fiskene høyere kaliuminnhold ( $4283 \pm 608 \text{ mg/kg ww}$ ) enn kontrollfiskene ( $4068 \pm 389 \text{ mg/kg ww}$ ) men ikke signifikant ( $p > 0,05$ ). Fra gruppe B hadde fiskene fra CO<sub>2</sub> tankene høyere kaliuminnhold ( $3750 \pm 84 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene fra kontrolltankene ( $3683 \pm 194 \text{ mg/kg ww}$ ), men dette var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ).



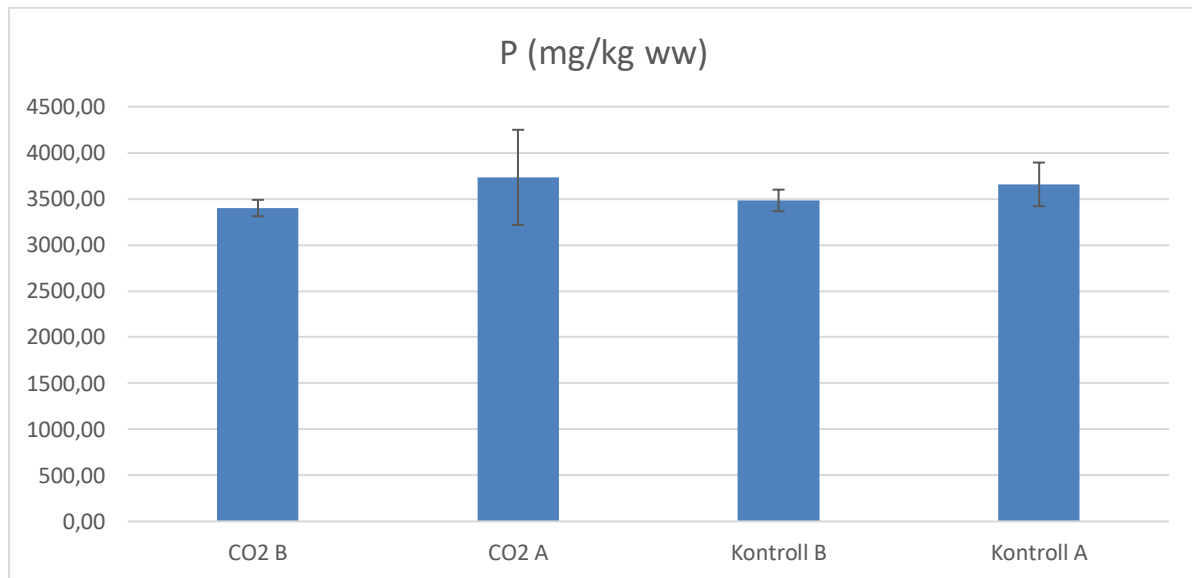
Figur 12: Grafen viser K innhold i nyren til fisk fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. CO<sub>2</sub> B:  $3750 \pm 84 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), CO<sub>2</sub> A:  $4283 \pm 608 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), Kontroll B:  $3683 \pm 194 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), Kontroll A:  $4068 \pm 389 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ).

Magnesiuminnholdet i nyren var noe høyere i fiskene fra gruppe A i forhold til fiskene fra gruppe B, men dette var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ) (figur 13). Det var ingen forskjell i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> sammenlignet med kontrollfiskene i noen av gruppene ( $p > 0,05$ ), med Mg innhold på ( $245 \pm 33 \text{ mg/kg ww}$ ) i fisk eksponert eksponert for CO<sub>2</sub> mot ( $238 \pm 21 \text{ mg/kg ww}$ ) i kontrollfisk fra gruppe A. Mg innhold ( $233 \pm 12 \text{ mg/kg ww}$ ) i CO<sub>2</sub> fiskene mot ( $226 \pm 8 \text{ mg/kg ww}$ ) i kontrollfiskene i gruppe B.



Figur 13: Grafen viser Mg innhold i nyren til fisk fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. CO<sub>2</sub> B:  $226 \pm 8 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), CO<sub>2</sub> A:  $245 \pm 33 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), Kontroll B:  $233 \pm 12 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), Kontroll A:  $238 \pm 21 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ).

Fosforinnholdet i fiskene fra gruppe A var generelt høyere enn i fiskene fra gruppe B ( $p < 0,05$ ) (figur 14). Fra gruppe A hadde CO<sub>2</sub> fiskene høyere fosforinnhold ( $3733 \pm 516 \text{ mg/kg ww}$ ) enn kontrollfiskene ( $3657 \pm 237 \text{ mg/kg ww}$ ) ( $p > 0,05$ ). Fra gruppe B hadde kontrollfiskene høyere fosforinnhold ( $3483 \pm 117 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene fra CO<sub>2</sub> tankene ( $3400 \pm 89 \text{ mg/kg ww}$ ) ( $p > 0,05$ ).

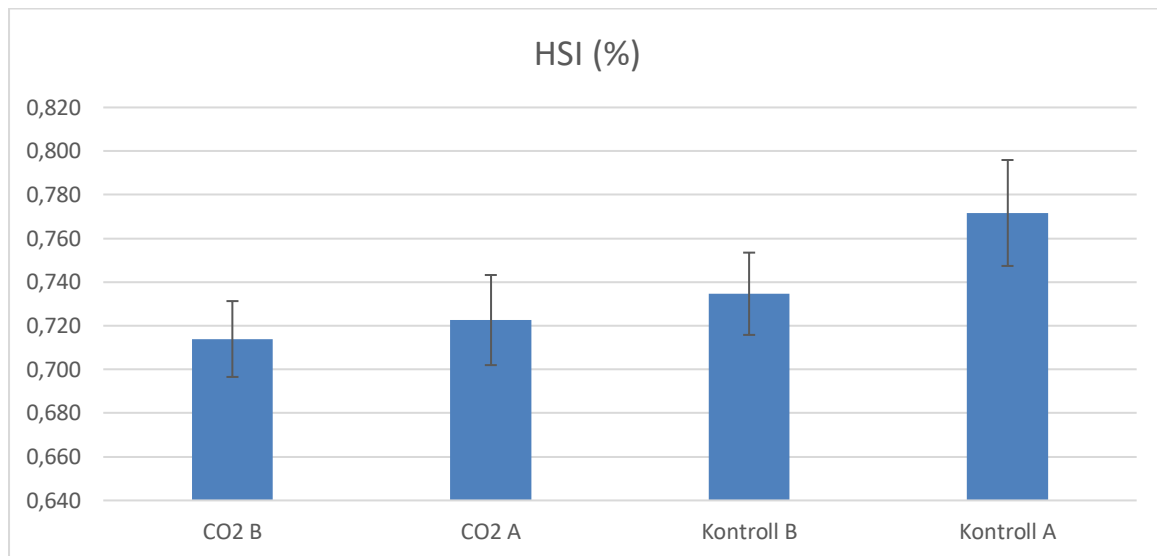


Figur 14: Grafen viser P innhold i nyren til fisk fra sluttuttaket, gjennomsnitt ± SD. CO<sub>2</sub> B:  $3400 \pm 89 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), CO<sub>2</sub> A:  $3733 \pm 516 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), Kontroll B:  $3483 \pm 117 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ), Kontroll A:  $3657 \pm 237 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=6$ ).

### 3.1.4 Organindekser

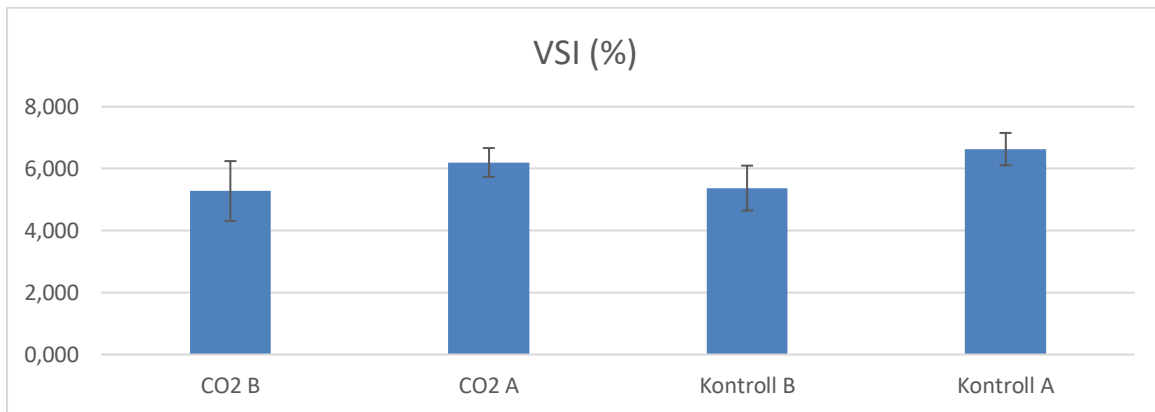
Organindeksene ble regnet ut for den prøvetatte fisken.

I forsøk 1 var HSI høyere i fiskene i kontrolltankene i forhold til CO<sub>2</sub> tankene for begge gruppene. Det ble målt at HSI var høyest i fiskene fra kontroll A tankene ( $0,8\pm 0,1\%$ ) og minst i fiskene fra CO<sub>2</sub> B tankene ( $0,7\pm 0,1\%$ ) (figur 15). Fiskene fra gruppe A hadde en høyere HSI enn fiskene fra gruppe B i både kontrolltankene og i CO<sub>2</sub> tankene (figur 15). Det ble ikke oppdaget en signifikant forskjell i HSI mellom fiskene i noen av tankene fra gruppe A eller gruppe B ( $p>0,05$ ).



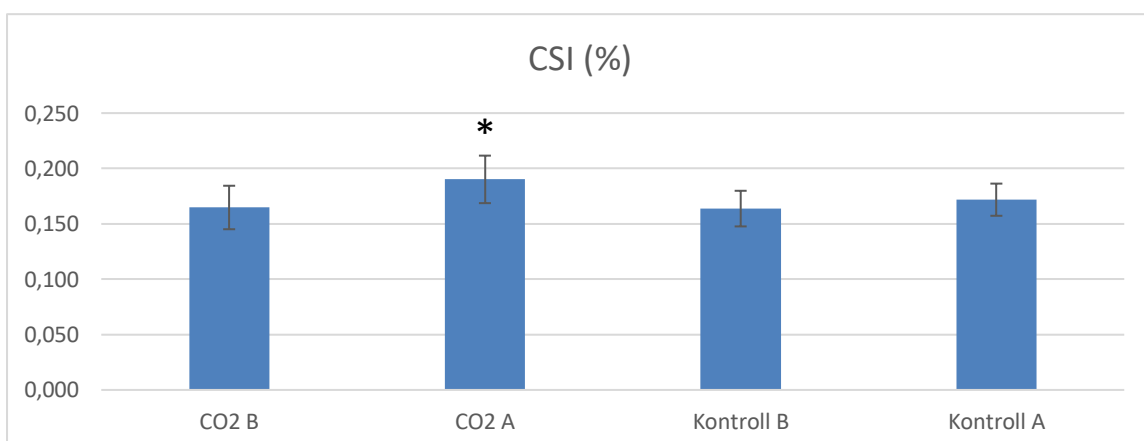
Figur 15: Grafen viser HSI (hepatosomatic index) for fisken tatt ut i sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD, n=16. Leveren ble veid før prøvetaking startet og HSI er prosentandelen av levervekt i forhold til kroppsvekt. HSI ble utregnet til å være følgende: CO<sub>2</sub> B:  $0,7\pm 0,1\%$ , CO<sub>2</sub> A:  $0,7\pm 0,1\%$ , Kontroll B:  $0,7\pm 0,1\%$ , og Kontroll A:  $0,8\pm 0,1\%$ .

VSI ble målt til å være høyere i fiskene fra gruppe A (CO<sub>2</sub>: 6,2±0,5%, kontroll: 6,6±0,5%) i forhold til fiskene fra gruppe B (CO<sub>2</sub>: 5,3±1,0%, kontroll: 5,4±0,7%) (p<0,05) (figur 16). Det ble ikke funnet en signifikant forskjell mellom fiskene fra CO<sub>2</sub> B tankene og kontroll B tankene (p>0,05) men fiskene fra CO<sub>2</sub> A tankene hadde lavere VSI sammenlignet med kontroll A tankene (p<0,05).



Figur 16: Grafen viser VSI (Visceral somatic index) for fisken tatt ut i sluttuttaket, gjennomsnitt±SD, n=16. Viscera ble veid før prøvetaking startet, og VSI er prosentandelen av visceravekt i forhold til kroppsvekt. VSI ble utregnet til å være følgende: CO<sub>2</sub> B: 5,3±1,0%, CO<sub>2</sub> A: 6,2±0,5%, Kontroll B: 5,4±0,7%, og Kontroll A: 6,6±0,5%.

Fiskene i CO<sub>2</sub> og kontrolltankene fra gruppe B hadde tilnærmet lik CSI (CO<sub>2</sub>: 0,17±0,0%, kontroll: 0,16±0,0%). Fiskene fra gruppe A hadde en høyere CSI enn fiskene fra gruppe B (p<0,05), og fra gruppe A hadde CO<sub>2</sub> fiskene høyere CSI (0,19±0,0%) enn kontrollfiskene (0,17±0,0%) (figur 17). Det var en signifikant høyere CSI i CO<sub>2</sub> fiskene fra gruppe A i forhold til kontrollfiskene fra gruppe A (p<0,05).



Figur 17: Grafen viser CSI (Cardiac somatic index) for fisken tatt ut i sluttuttaket, gjennomsnitt±SD, n=16. Hjertet ble veid før prøvetaking startet, og CSI er prosentandelen av hjertevekt i forhold til kroppsvekt. CSI ble utregnet til å være følgende: CO<sub>2</sub> B: 0,17±0,0%, CO<sub>2</sub> A: 0,19±0,0%, Kontroll B: 0,16±0,0%, og Kontroll A: 0,17±0,0%. «\*» betyr at det ble funnet en signifikant forskjell i denne fiskegruppen.

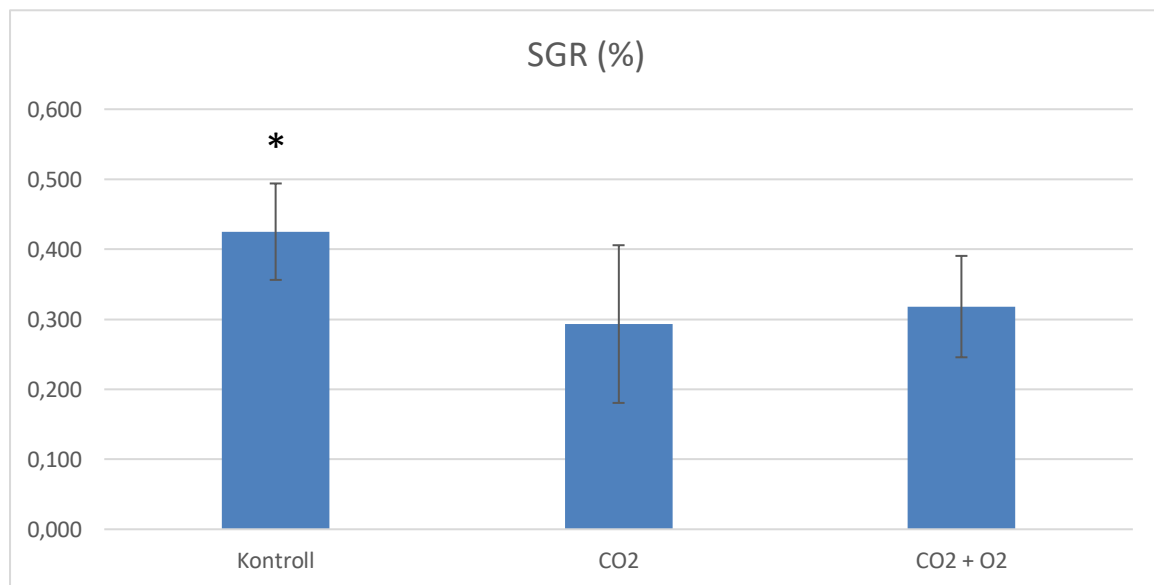


## 3.2 Forsøk 2

### 3.2.1 Vekst

Ved avslutting av forsøket var gjennomsnittsvektene i de ulike tankene  $141 \pm 15$  g i CO<sub>2</sub> tankene,  $160 \pm 32$  g i kontrolltankene, og  $153 \pm 25$  g CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>.

Kontrollfiskene hadde en vekstrate fra 0-uttak til sluttuttak på  $0,42 \pm 0,07$ , og fiskene som var utsatt for høyt CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub> hadde en vekstrate på  $0,32 \pm 0,07$ . Fiskene som kun ble utsatt for høyt CO<sub>2</sub> hadde en vekstrate på  $0,29 \pm 0,11$  (figur 18). Ved denne konsentrasjonen ble det vist at det var en signifikant forskjell i vekstrate mellom fiskene i CO<sub>2</sub> tanken og kontroll ( $p < 0,05$ ), og mellom CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene og kontroll ( $p < 0,05$ ).

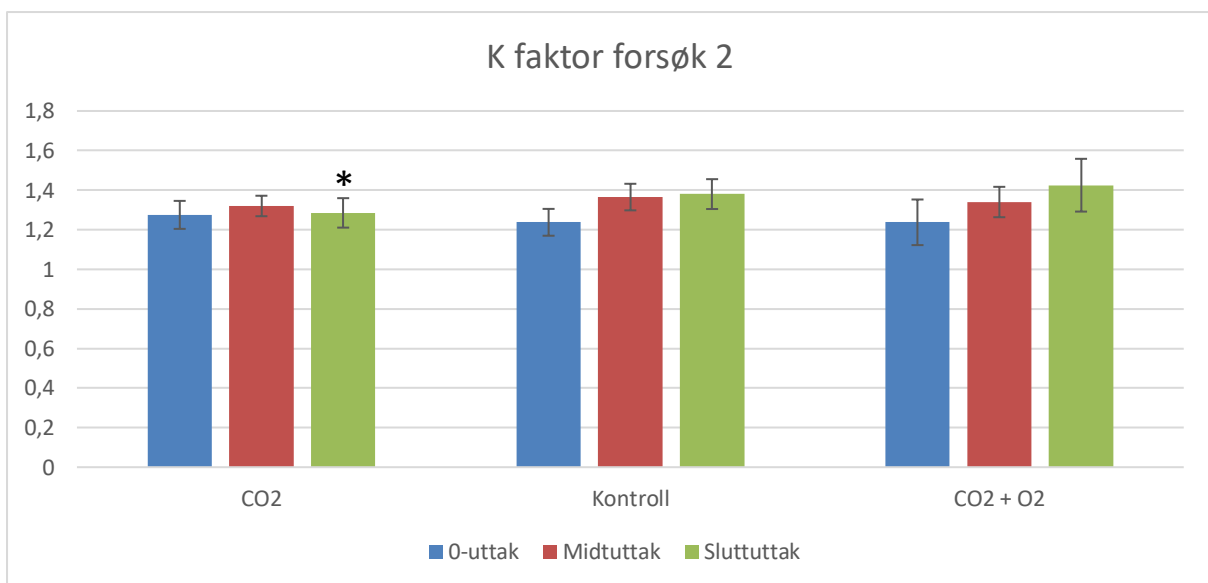


Figur 18: I grafen over kan en se verdiene for SGR (specific growth rate) for fiskene fra 0-uttaket til sluttuttaket 2, gjennomsnitt $\pm$ SD, n=20. Det kan sees at kontrollfiskene hadde høyere vekst ( $0,42 \pm 0,07$ ) enn tanken med CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub> ( $0,32 \pm 0,07$ ), mens fisken med lavest vekst var fisken som ble utsatt for høyt CO<sub>2</sub> ( $0,29 \pm 0,11$ ). «\*» betyr at det ble funnet en signifikant forskjell i denne fiskegruppen.

Det ble observert en økning i k faktor fra 0-uttaket til sluttuttaket i noen av tankene (tabell 8 og figur 19). Fiskene i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene og kontrolltankene hadde en generell økning i k faktor gjennom hele forsøket. Fiskene i CO<sub>2</sub> tankene hadde en økning fra 0-uttak til midtuttak, men så gikk k faktor ned igjen ved sluttuttaket. Fiskene i CO<sub>2</sub> tankene hadde lavere kondisjonsfaktor enn i de andre tankene, og denne forskjellen var signifikant (p<0,05).

Tabell 8: Tabellen viser gjennomsnitt±SD for kondisjonsfaktor fra 0-uttak til sluttuttak. For alle tankene i 0-uttaket er n=8, for midtuttaket og sluttuttaket er n=20.

Behandling	Januar (0-uttak)	Februar (Midtuttak)	Mars (Sluttuttak)
CO <sub>2</sub>	1,27±0,07	1,32±0,07	1,28±0,11
Kontroll	1,24±0,05	1,36±0,07	1,38±0,08
CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	1,24±0,07	1,34±0,07	1,42±0,13



Figur 19: Grafen viser en oversikt over k faktoren for de tre uttakene som ble gjort, n=8 for januar uttaket, og n=20 for resten. Når fisken går gjennom smoltifiseringsprosessen vil en forvente å se en nedgang i k faktor til fisken er ferdig smoltifisert, deretter stiger den. I denne grafen kan en se at k faktoren stiger i forsøkene, med unntak av CO<sub>2</sub> fisken. K faktor for fiskene var følgende fra januar til mars; CO<sub>2</sub>: 1,27±0,07, 1,32±0,07, 1,28±0,11, Kontroll: 1,24±0,06, 1,36±0,07, 1,38±0,08, CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>: 1,24±0,07, 1,34±0,07, og 1,425±0,13. «\*» betyr at det ble funnet en signifikant forskjell i denne fiskegruppen.

### 3.2.2 Nefrokalsinose

I 0-uttaket ble det funnet 5 fisk som tilsynelatende hadde makroskopiske utfellinger i nyrene, men ingen av disse fiskene fikk påvist NK mikroskopisk. Ved midtuttaket ble det funnet to fisk som hadde makroskopiske utfellinger i nyrene, og en som var usikker, disse tre fiskene fikk NK påvist mikroskopisk. I sluttuttaket ble det observert 13 fisk som hadde makroskopiske utfellinger i nyrene. Av disse 13, ble det påvist NK histologisk i 5 fisker.

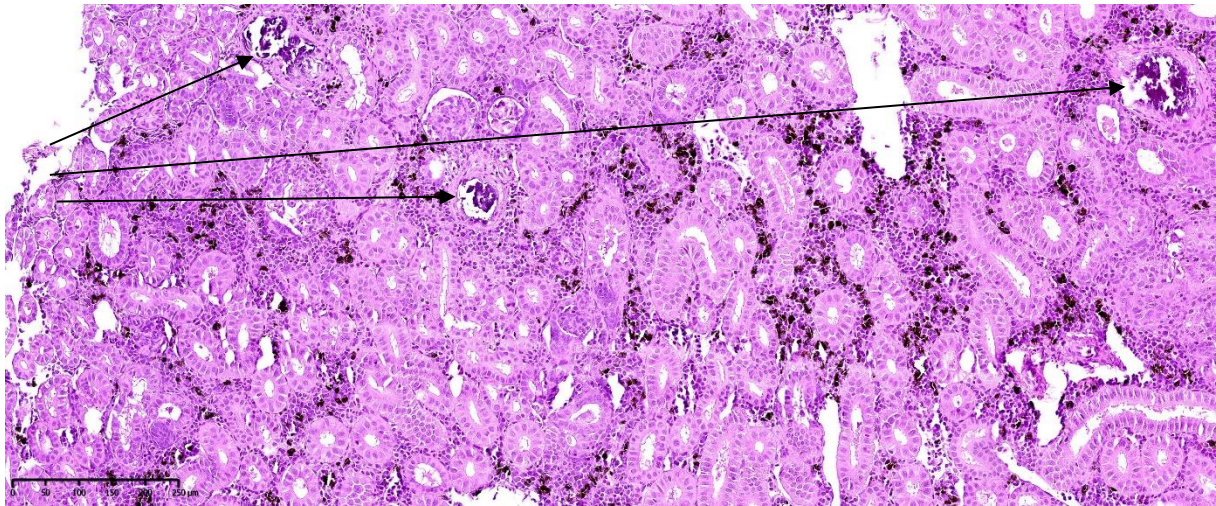


*Figur 20: Bildet viser en fisk dissekert under sluttuttaket med synlige forkalkninger i urinlederen. Foto: Erik Michelsen.*

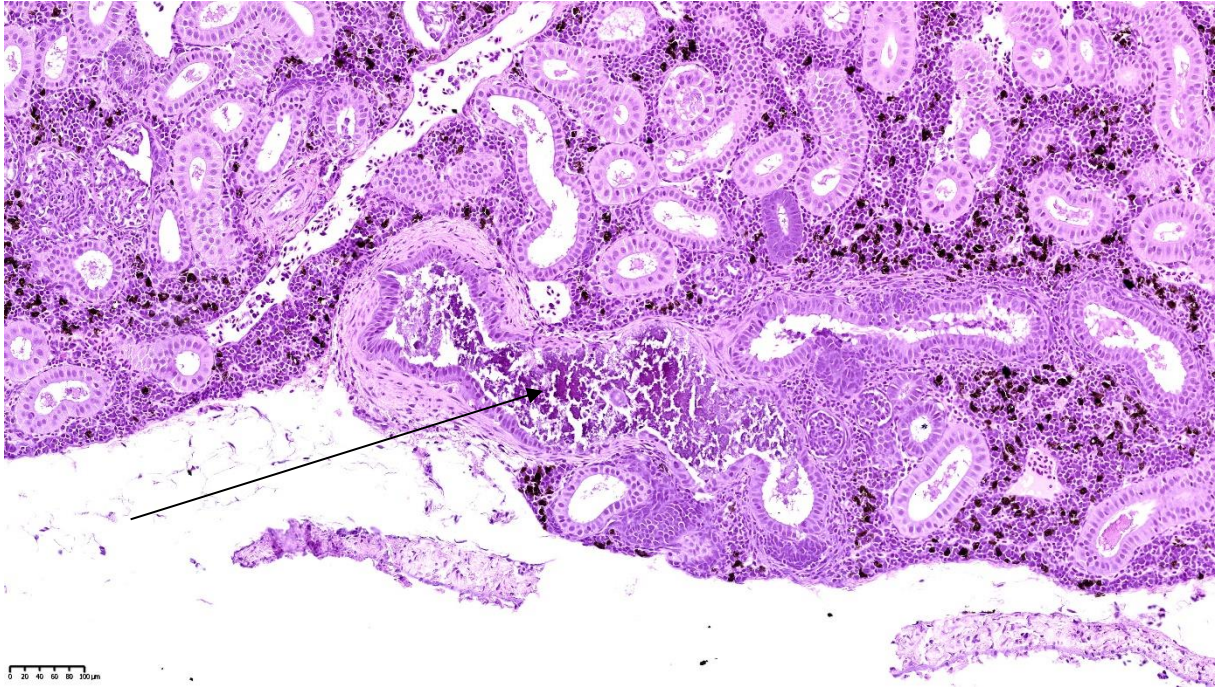
Totalt ble det funnet 53 fisk som fikk påvist NK mikroskopisk i forsøk 2 av 190 fisk som ble undersøkt (27,9%) (tabell 9). Av disse ble 4 funnet ved nulluttaket, 10 ble funnet ved et mellomuttak 27-28 januar, 24 ble funnet ved midtuttaket, og 15 ble funnet ved sluttuttaket (mineralutfellinger sees i figur 21-23). Av de 49 fiskene som hadde nefrokalsinose etter forsøket startet var 1 fra kontrolltankene, 20 fra CO<sub>2</sub> tankene og 24 fra tankene med CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub>. Det var signifikant høyere prevalens av NK i CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene i forhold til kontrolltankene (p<0,05).

Tabell 9: Tabellen viser antall fisk tatt ut ved hvert uttak i forsøk 2 og andelen av denne fisken som ble diagnostisert med NK etter histologisk undersøkelse.

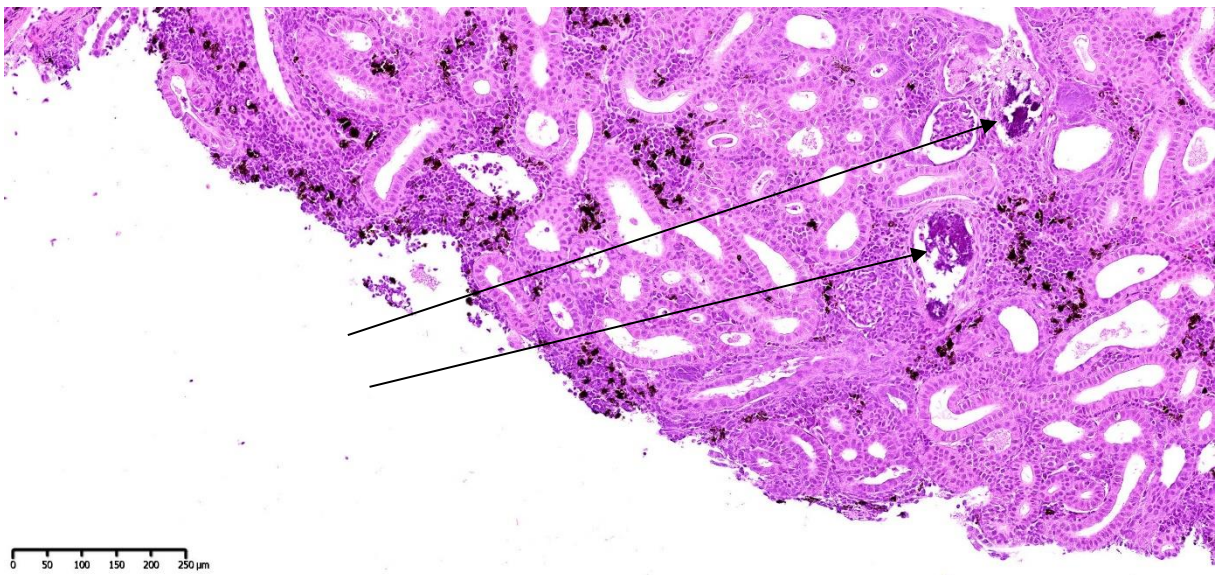
Uttak	Dato	0-uttak	Kontroll	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>
0-uttak	07/01-21	4/24			
Startuttak	27-28/01-21		1/16	4/16	5/16
Midtuttak	17-18/02-21		0/19	10/20	14/20
Slutt før sjø	24-25/03-21		0/20	6/19	9/20
Samlet		4/24	1/55	20/55	28/56



Figur 21: Bildet viser et lengdesnitt fra bakknyren til fisk nr. 337. Denne fisken ble tatt ut fra en av tankene med høy CO<sub>2</sub>. Mineralutfelling er markert med svarte piler. Foto: Erik Michelsen.



Figur 22: Bildet viser et lengdesnitt fra baknyren til fisk nr. 366. Denne fisken ble tatt ut fra en av tankene med høy CO<sub>2</sub> og høy O<sub>2</sub>. Mineralutfelling er markert med svarte piler. Foto: Erik Michelsen.



Figur 23: Bildet viser et lengdesnitt fra baknyren til fisk nr. 366. Denne fisken ble tatt ut fra en av tankene med Høy CO<sub>2</sub> og høy O<sub>2</sub>. Mineralutfelling er markert med svarte piler. Foto: Erik Michelsen.

### 3.2.3 Mineralsammensetning i nyre

Mineralsammensetningen viste en økning i kalsium i alle tankene bortsett fra CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>, videre ble det målt en svak økning i natrium for alle tankene. Det var en nedgang i kalium for kontrollfiskene og CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> fisken, og en økning i CO<sub>2</sub> fisken. For magnesium og fosfor var det en økning i fiskene fra CO<sub>2</sub> tankene og kontrolltankene, men en nedgang for fiskene i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene (tabell 10). Det ble ikke funnet en signifikant forskjell i mineralinnhold i fiskene i CO<sub>2</sub> tankene og kontrolltankene eller mellom CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene og kontrolltankene. Mineralinnholdet i nyren til fiskene som hadde NK i sluttuttaket ble sammenlignet med mineralinnholdet til fiskene som ikke hadde NK, og det ble ikke funnet noen signifikant forskjell i noen av mineralene (p>0,05).

#### 0-uttak

Ved 0-uttaket var det én fisk som hadde unormalt høye kalsium verdier. For å demonstrere dette ble det regnet ut to gjennomsnitt, et gjennomsnitt som inkluderte denne fisken, og et gjennomsnitt som ikke inkluderte denne fisken (tabell 10).

*Tabell 10: Tabellen viser gjennomsnitt±SD for mineralanalysene gjort på fisk fra 0-uttaket med betegnelsen mg/kg ww. n=8 med outlier, og n=7 uten outlier.*

	<b>Ca</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>P</b>
<b>Med outlier</b>	215±154	1138±92	3275±183	200±9	3088±113
<b>Uten outlier</b>	164±59	1157±79	3275±198	200±10	3086±122

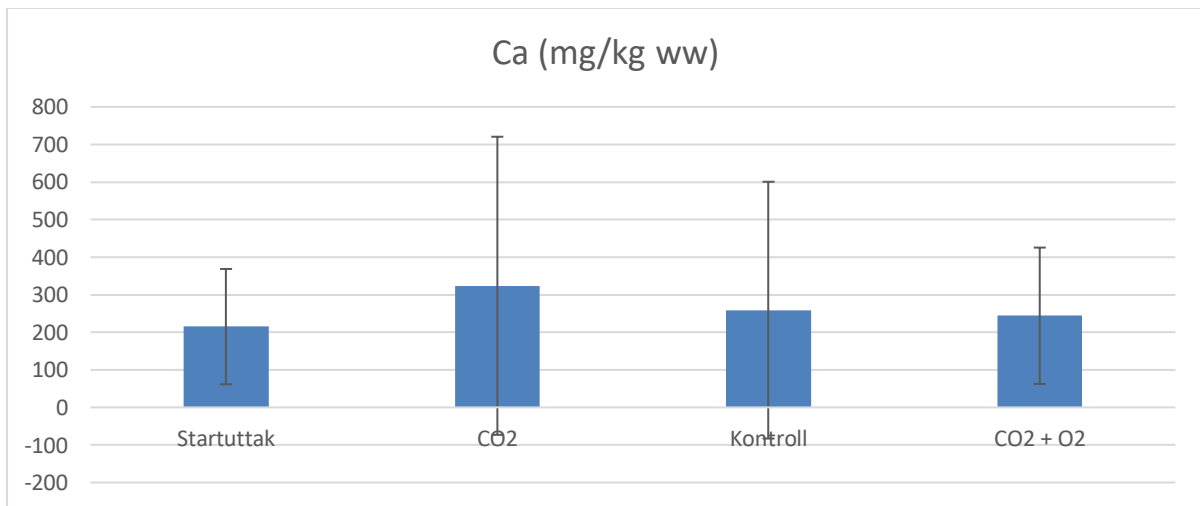
## Sluttuttak

Ved sluttuttaket ble det funnet fire fisker som hadde unormalt høye verdier av Ca i nyren. Av disse fiskene ble to diagnostisert med NK, mens to ikke hadde noe tegn til utfellinger.

Tabell 11: Tabellen viser mineralinnhold målt fra sluttuttaket i de ulike tankene, gjennomsnitt±SD (mg/kg ww), n=8. Standardavvikene ble svært høye på grunn av fiskene markert i gult, som trekker opp avviket.

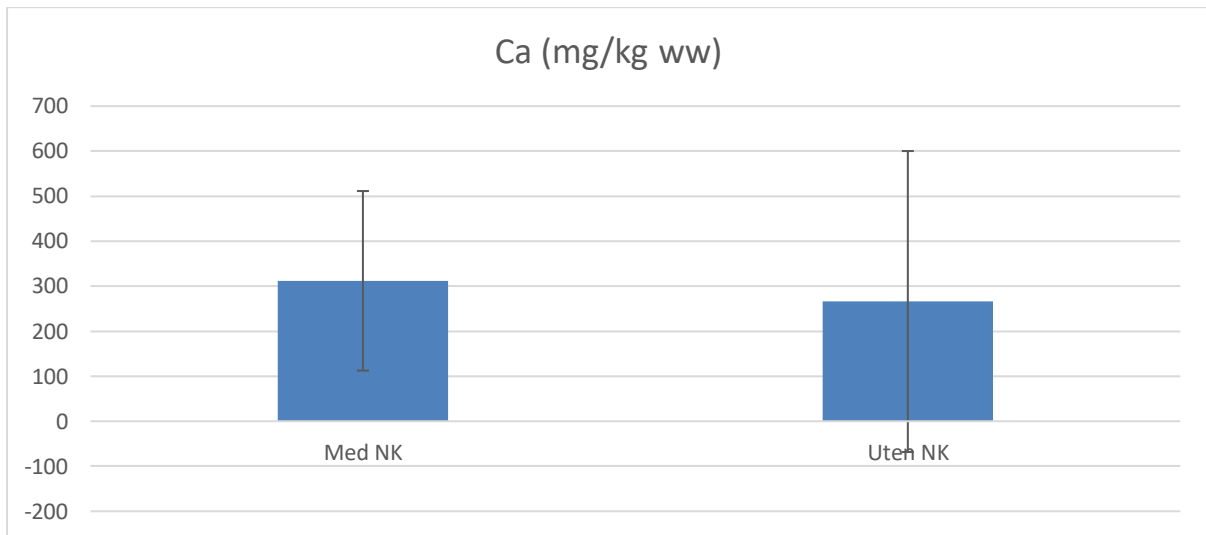
	Ca	Na	K	Mg	P
CO <sub>2</sub>	323±397	1175±103	3287±376	205±16	2987±235
Kontroll	259±342	1050±143	3275±413	209±18	3100±293
CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>	244±181	1132±146	3050±338	199±24	2812±181

Kalsiuminnholdet i alle tankene var høyere enn gjennomsnittet målt ved 0-uttaket (215±154mg/kg ww) (tabell 10). Det ble målt høyere innhold av Ca i nyren hos fiskene fra CO<sub>2</sub> tankene (324±397mg/kg ww) sammenlignet med de fra kontrolltankene (259±342mg/kg ww), men denne forskjellen var ikke signifikant (p>0,05). I fiskene fra CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene var gjennomsnittet lavere (244±181mg/kg ww) enn i fiskene fra kontrolltankene (figur 24).



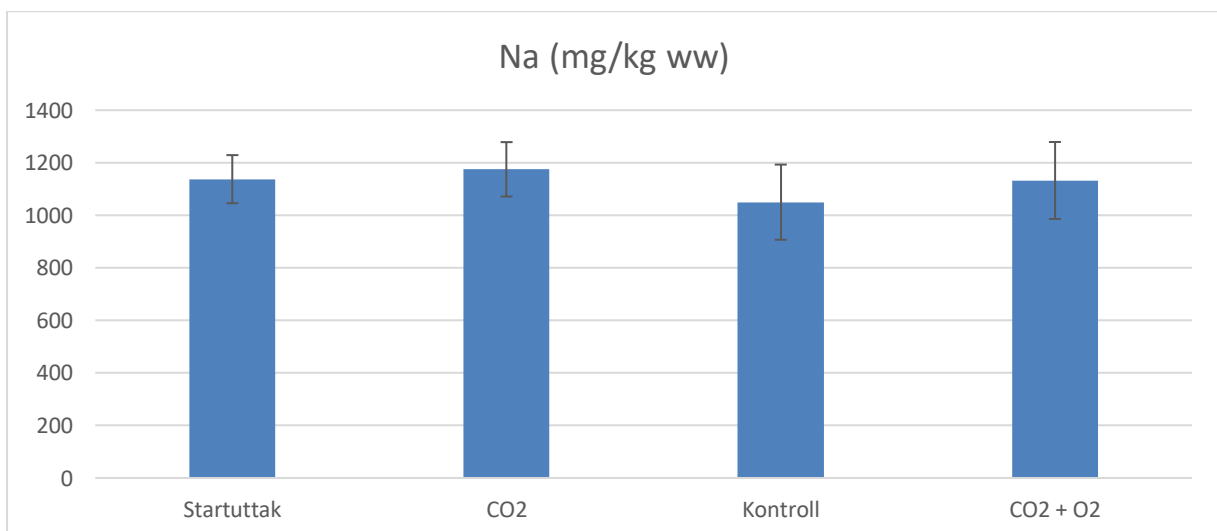
Figur 24: Grafen viser Ca innhold i nyren til fisk fra 0-uttaket og sluttuttaket, gjennomsnitt±SD. 0-uttak: 215±154mg/kg ww (n=8), CO<sub>2</sub>: 324±397mg/kg ww (n=8), Kontroll: 259±342mg/kg ww (n=8), CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>: 244±181mg/kg ww (n=8).

Kalsiuminnholdet i fiskene med NK ble også testet mot kalsiuminnholdet i fiskene som ikke hadde NK ved sluttuttaket (figur 25). Fiskene med NK hadde høyere innhold av kalsium i nyren ( $312\pm 199\text{mg/kg ww}$ ) enn fiskene uten NK ( $266\pm 334\text{mg/kg ww}$ ), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p>0,05$ ).



Figur 25: Grafen viser Ca innhold i nyren til fisk med og uten NK fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. Med NK:  $312\pm 199\text{mg/kg ww}$  ( $n=5$ ), Uten NK:  $266\pm 334\text{mg/kg ww}$  ( $n=19$ ).

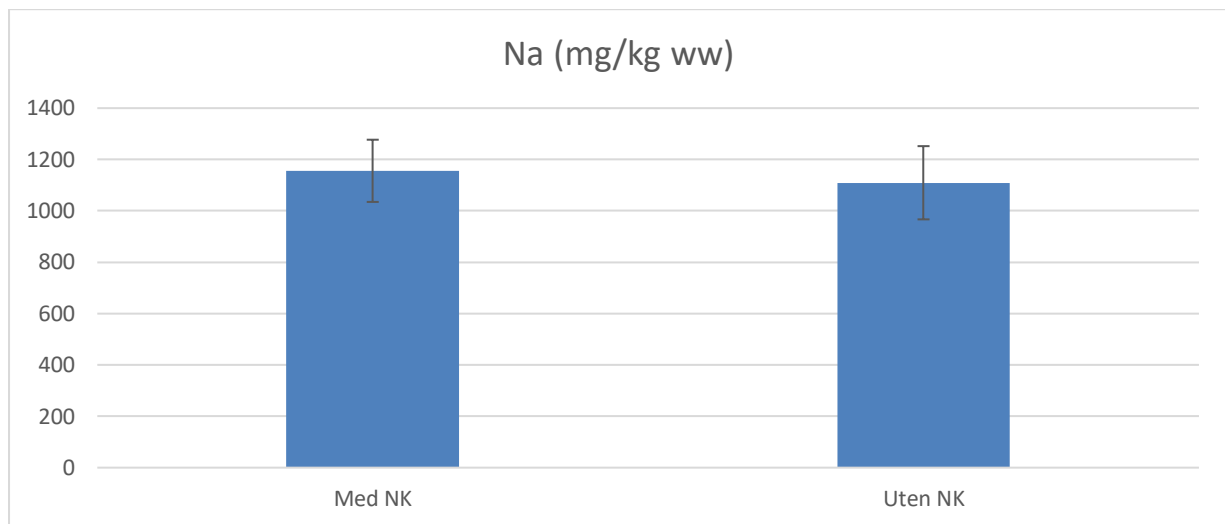
Både fiskene fra  $\text{CO}_2$  tankene ( $1175\pm 103\text{mg/kg ww}$ ) og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene ( $1132\pm 146\text{mg/kg ww}$ ) hadde et høyere natriuminnhold i nyren enn fiskene i kontrolltankene ( $1050\pm 143\text{mg/kg ww}$ ) (figur 26), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p>0,05$ ).



Figur 26: Grafen viser Na innhold i nyren til fisk fra 0-uttaket og sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. 0-uttak:  $1138\pm 92\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2$ :  $1175\pm 103\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ), Kontroll:  $1050\pm 143\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ :  $1132\pm 146\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ).

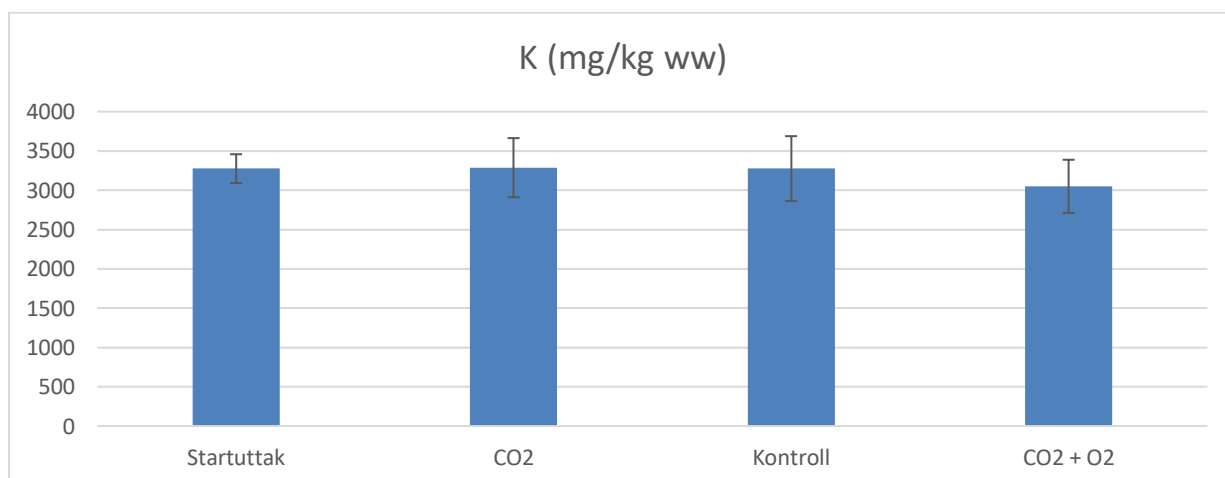


Det ble testet om natriuminnholdet i nyren var forskjellig i fisk med og uten NK ved sluttuttaket (figur 27). Fiskene med NK hadde et høyere natriuminnhold i nyren ( $1156 \pm 121 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene som ikke hadde NK ( $1109 \pm 142 \text{ mg/kg ww}$ ), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ).



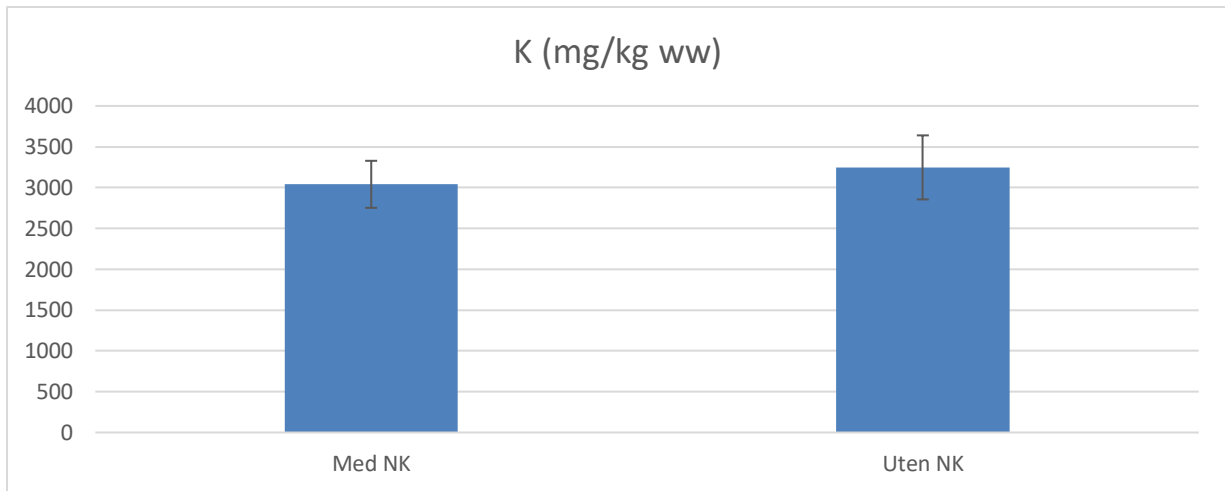
Figur 27: Grafen viser Na innhold i nyren til fisk med og uten NK fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. Med NK:  $1156 \pm 121 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=5$ ), Uten NK:  $1109 \pm 142 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=19$ ).

Fiskene fra  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene hadde et lavere kaliuminnhold i nyren ( $3050 \pm 338 \text{ mg/kg ww}$ ) enn alle de andre tankene, inkludert fiskene fra 0-uttaket ( $3275 \pm 183 \text{ mg/kg ww}$ ) (figur 28). Fiskene fra  $\text{CO}_2$  tankene hadde et litt høyere kaliuminnhold ( $3287 \pm 376 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene fra kontrolltankene ( $3275 \pm 513 \text{ mg/kg ww}$ ), men ingen av disse forskjellene var signifikante ( $p > 0,05$ ).



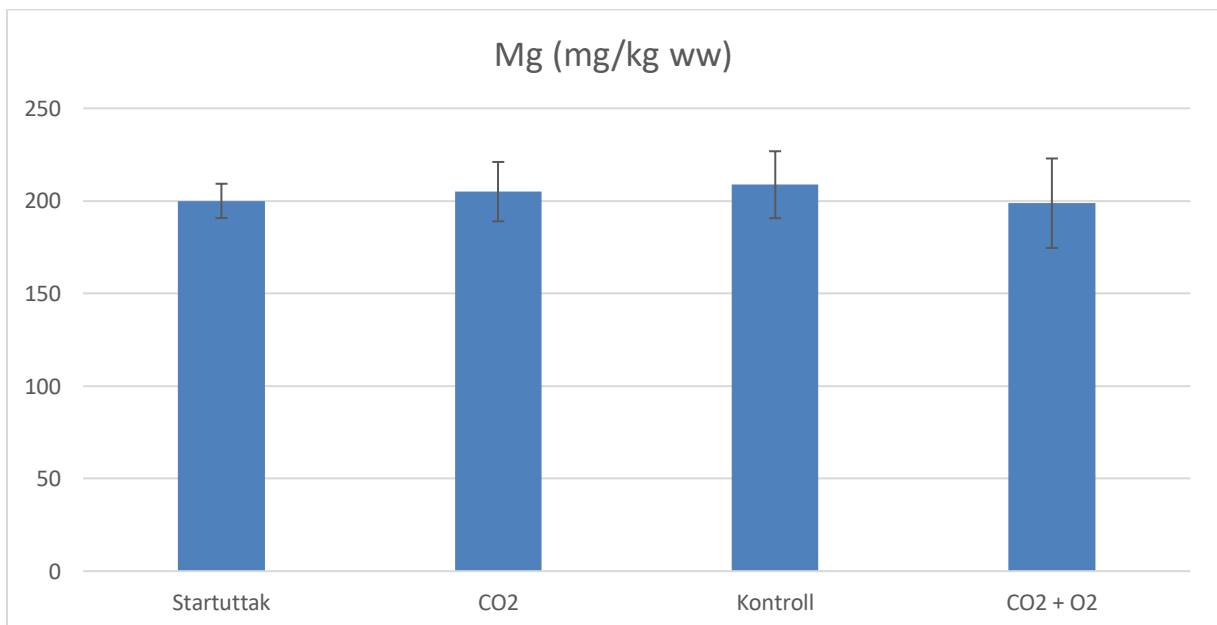
Figur 28: Grafen viser K innhold i nyren til fisk fra 0-uttaket og sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. 0-uttak:  $3275 \pm 183 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2$ :  $3287 \pm 376 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ), Kontroll:  $3275 \pm 413 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ :  $3050 \pm 338 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ).

Det ble testet om det var en forskjell i kaliuminnholdet i fiskene med og uten NK ved sluttuttaket (figur 29). Fiskene uten NK hadde noe høyere innhold av kalium ( $3247 \pm 392 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene med NK ( $3040 \pm 288 \text{ mg/kg ww}$ ), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ).



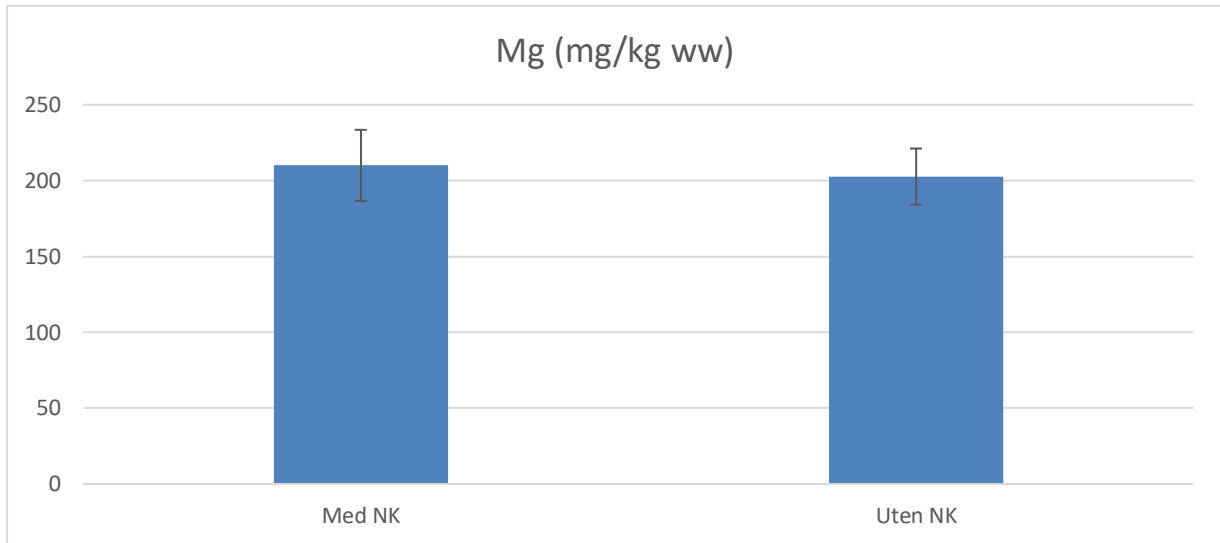
Figur 29: Grafen viser K innhold i nyren til fisk med og uten NK fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. Med NK:  $3040 \pm 288 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=5$ ), Uten NK:  $3247 \pm 392 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=19$ ).

Fiskene fra kontrolltankene hadde et noe høyere magnesiuminnhold ( $209 \pm 18 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene fra  $\text{CO}_2$  ( $205 \pm 16 \text{ mg/kg ww}$ ) og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene ( $199 \pm 24 \text{ mg/kg ww}$ ) (figur 30), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ).



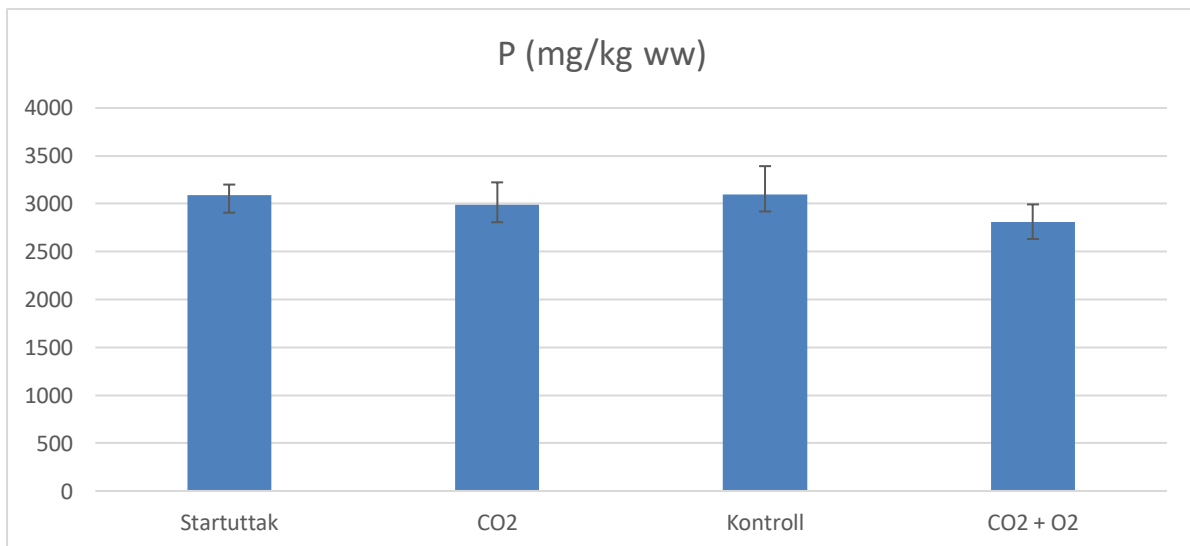
Figur 30: Grafen viser Mg innhold i nyren til fisk fra 0-uttaket og sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. 0-uttak:  $200 \pm 9 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2$ :  $205 \pm 16 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ), Kontroll:  $209 \pm 18 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ :  $199 \pm 24 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=8$ ).

Fiskene med NK hadde høyere magnesiuminnhold i nyren ( $210\pm 23\text{mg/kg ww}$ ) enn fiskene uten NK ( $202\pm 18\text{mg/kg ww}$ ) (figur 31), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p>0,05$ ).



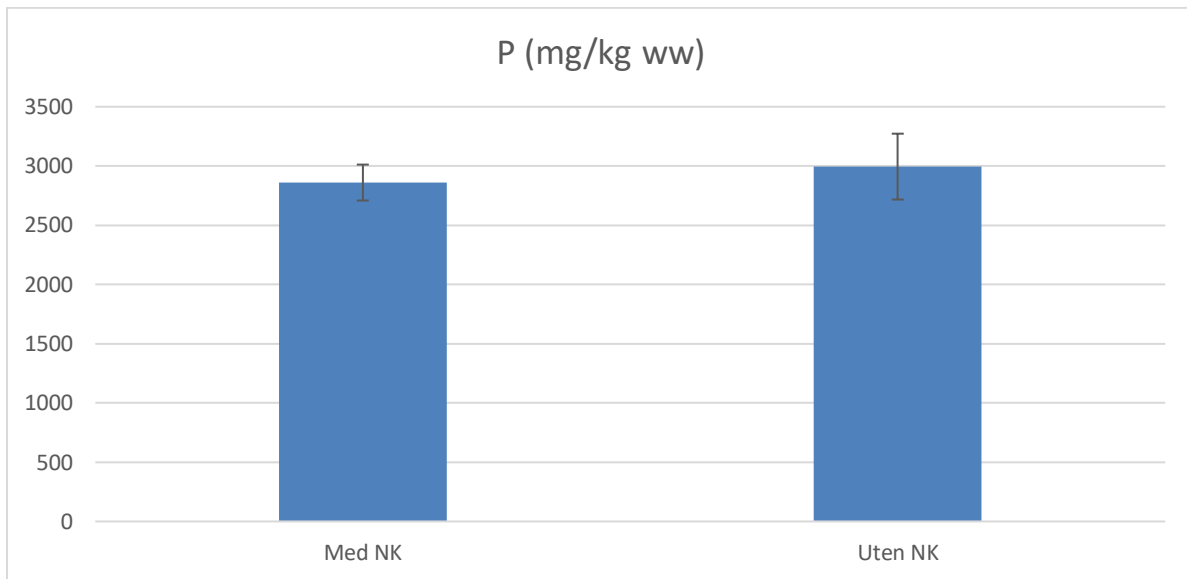
Figur 31: Grafen viser Mg innhold i nyren til fisk med og uten NK fra sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. Med NK:  $210\pm 23\text{mg/kg ww}$  ( $n=5$ ), Uten NK:  $202\pm 18\text{mg/kg ww}$  ( $n=19$ ).

Fiskene fra kontrolltankene ( $3100\pm 293\text{mg/kg ww}$ ) og fiskene fra 0-uttaket ( $3088\pm 113\text{mg/kg ww}$ ) hadde høyere fosforinnhold i nyren, enn fiskene fra  $\text{CO}_2$  tankene ( $2987\pm 236\text{mg/kg ww}$ ) og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene ( $2812\pm 181\text{mg/kg ww}$ ) (figur 32), men ingen av disse forskjellene var signifikante ( $p>0,05$ ).



Figur 32: Grafen viser P innhold i nyren til fisk fra 0-uttaket og sluttuttaket, gjennomsnitt $\pm$ SD. 0-uttak:  $3088\pm 113\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2$ :  $2987\pm 236\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ), Kontroll:  $3100\pm 293\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ),  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ :  $2812\pm 181\text{mg/kg ww}$  ( $n=8$ ).

Fiskene med NK hadde et lavere fosforinnhold i nyrene ( $2860 \pm 152 \text{ mg/kg ww}$ ) enn fiskene uten NK ( $2995 \pm 278 \text{ mg/kg ww}$ ) (figur 33), men denne forskjellen var ikke signifikant ( $p > 0,05$ ).

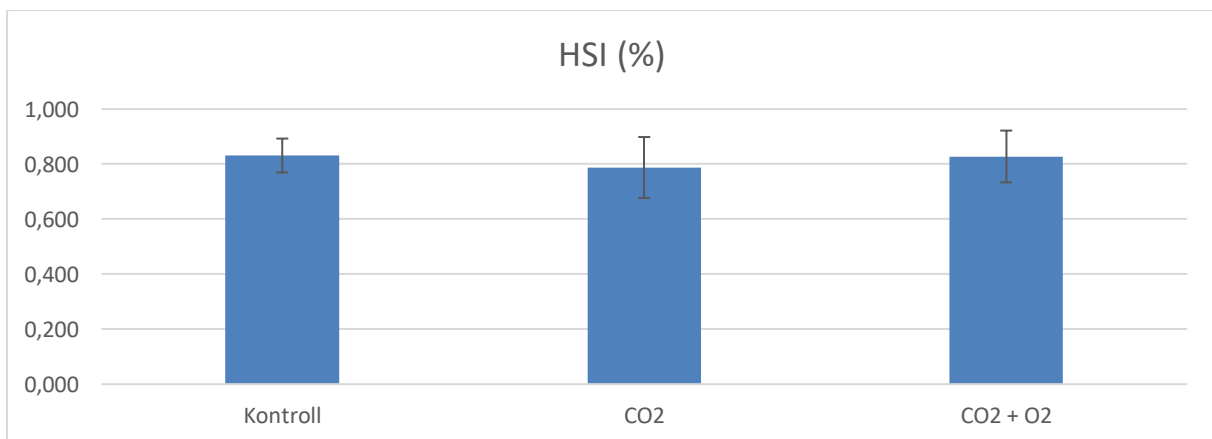


Figur 33: Grafen viser P innhold i nyren til fisk med og uten NK fra sluttuttaket, gjennomsnitt  $\pm$  SD. Med NK:  $2860 \pm 152 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=5$ ), Uten NK:  $2995 \pm 278 \text{ mg/kg ww}$  ( $n=19$ ).

### 3.2.4 Organindekser

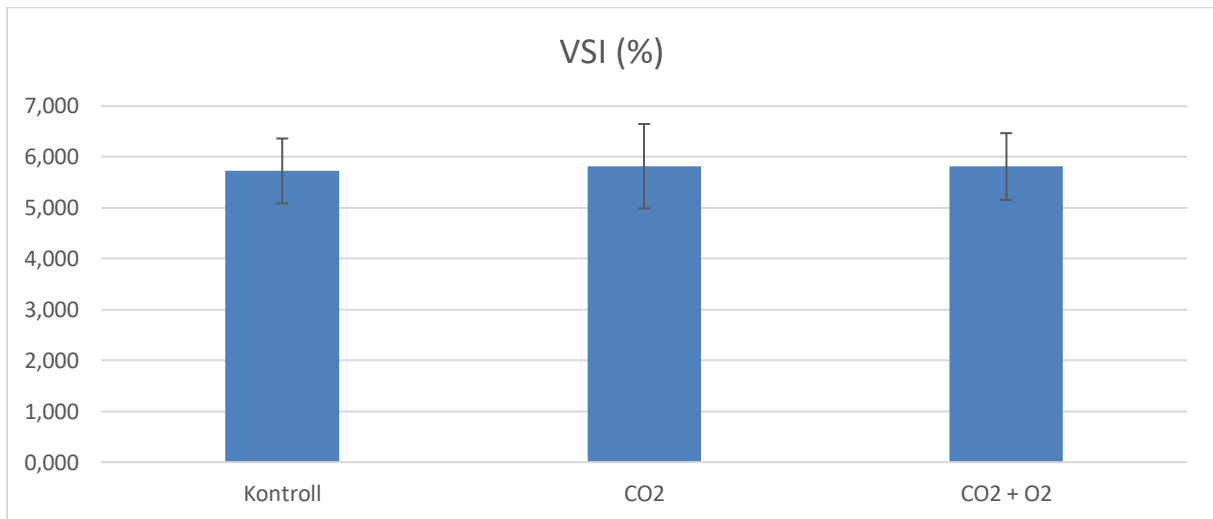
Det ble funnet små forskjeller i HSI mellom fiskene i de ulike tankene (figur 34).

Kontrollfiskene ( $0,8 \pm 0,1\%$ ) og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  fiskene ( $0,8 \pm 0,9\%$ ) hadde likt gjennomsnitt, mens  $\text{CO}_2$  fiskene hadde noe lavere HSI ( $0,8 \pm 0,1\%$ ).



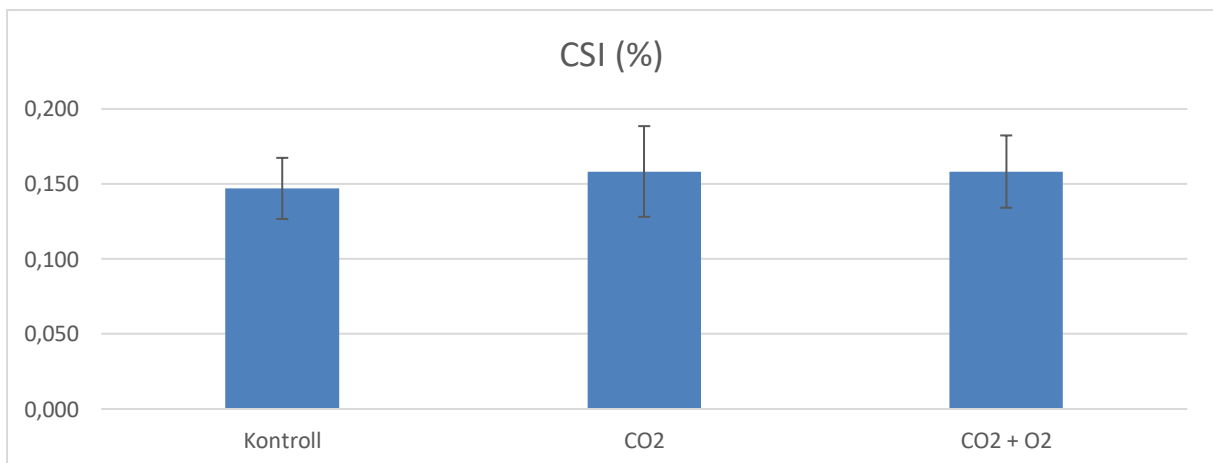
Figur 34: Grafen viser HSI (hepatosomatic index) for fisken tatt ut i sluttuttaket, gjennomsnitt  $\pm$  SD,  $n=20$ . Leveren ble veid før prøvetaking startet og HSI er prosentandelen av levervekt i forhold til kroppsvekt. HSI ble utregnet til å være følgende: Kontroll  $0,8 \pm 0,1\%$ ,  $\text{CO}_2$ :  $0,8 \pm 0,1\%$  og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ :  $0,8 \pm 0,9\%$ .

Fiskene fra alle tankene hadde forholdsvis like verdier for VSI (figur 35). CO<sub>2</sub> fiskene (5,8±0,8%) og CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> fiskene (5,8±0,7%) hadde svært like verdier, mens kontrollfiskene hadde noe lavere VSI (5,7±0,6%). Det ble ikke oppdaget en signifikant forskjell mellom de ulike fisketankene (p>0,05).



Figur 35: Grafen viser VSI (Visceral somatic index) for fisken tatt ut i sluttuttaket, gjennomsnitt±SD, n=20. Viscera ble veid før prøvetaking startet, og VSI er prosentandelen av visceravekt i forhold til kroppsvekt. VSI ble utregnet til å være følgende: Kontroll: 5,7±0,6%, CO<sub>2</sub>: 5,8±0,8%, CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>: 5,8±0,7%.

CSI ble målt for fisken i de ulike tankene (figur 36). Både CO<sub>2</sub> fiskene (0,16±0,03%) og CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> (0,16±0,02%) fiskene hadde høyere CSI enn kontrollfiskene (0,15±0,02%). Det ble ikke funnet en signifikant forskjell mellom fiskene i noen av tankene (p>0,05).



Figur 36: Grafen viser CSI (Cardiac somatic index) for fisken tatt ut i sluttuttaket, gjennomsnitt±SD, n=20. Hjertet ble veid før prøvetaking startet, og CSI er prosentandelen av hjertevekt i forhold til kroppsvekt. CSI ble utregnet til å være følgende: Kontroll: 0,15±0,02%, CO<sub>2</sub>: 0,16±0,03%, CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>: 0,16±0,02%.

## 4 Diskusjon

Formålet med forsøk 1 var å undersøke om forhøyete nivåer av CO<sub>2</sub> kunne føre til utvikling av nefrokalsinose i laks under smoltifiseringsfasen. For forsøk 2 ble det undersøkt om forhøyede nivåer av CO<sub>2</sub> gir nefrokalsinose, men også om høye CO<sub>2</sub> nivåer i kombinasjon med høye O<sub>2</sub> nivåer kan øke risikoen for utvikling av nefrokalsinose.

### 4.1 Vekst

Ingen signifikante forskjeller ble sett i vekst i prøvetatt fisk fra forsøk 1 (figur 8), noe som kan tyde på at fisken kunne håndtere konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> som ble satt i forsøket. Fra tidligere forsøk gjort av Fivelstad (1998) på postsmolt i sjøvann ble det ikke observert en forskjell i vekst mellom grupper eksponert for 1,3mg/L og 10,6mg/L CO<sub>2</sub>. Det ble observert en liten forskjell mellom 10,6mg/L gruppen og medium gruppen som var tilsatt 26 mg/L CO<sub>2</sub>, men denne forskjellen ble funnet å ikke være signifikant. Gil Martens (2006) viste i et forsøk at det var en 10% nedgang i vekst ved 10mg/L CO<sub>2</sub>. Dette mente de kunne være på grunn av lavere fôrinntak og økt energiforbruk på grunn av stress. I et annet forsøk av Fivelstad (2015) som ble gjort på lakseparr ble det vist at CO<sub>2</sub> konsentrasjoner opp mot 15mg/L ikke hadde en påvirkning på fiskens vekst, og at det bare var små endringer i vekst mellom 15-20mg/L CO<sub>2</sub>. Etter dette vil en kunne se en stor nedgang i vekstrate i takt med økende CO<sub>2</sub>. Det har blitt vist en lineær korrelasjon mellom nedgang i vekst, og økning i mengde CO<sub>2</sub> (Colt, 2006), men resultatene våre kan tyde på at konsentrasjonen (11,8-15,6mg/l) som ble brukt i dette forsøket ikke var høye nok til å utgjøre en signifikant forskjell mellom fiskene utsatt for høyt CO<sub>2</sub> og kontrollfiskene. Skov (2019) har også vist at man kan se en lineær nedgang i vekst med økende CO<sub>2</sub> nivåer hos smolt, mens hos parr vil en kunne se at SGR går raskere ned jo mer CO<sub>2</sub> som tilføres vannet. Det er også mulig at hyppig sampling kan ha påvirket veksten i alle tankene. Redusert vekst er velkjent som en bieffekt av blant annet håndtering av fisken (Wendelaar Bonga, 1997). Slik som i Gill Martens (2006) forsøk kan vekstraten i dette forsøket ha blitt påvirket av håndtering av fiskene og nedsatt appetitt, grunnet stress. Dette kan ha ført til at fiskens vekstrate var lav (0,48±0,09 på det høyeste). Det burde også nevnes at fiskene som ble brukt for å regne ut alle målingene i denne oppgaven, var prøvetatt fisk. Dette kan ha ført til mindre nøyaktige, eller mer sporadiske målinger enn det en ville fått hvis en tok målinger av fisken som var igjen etter alle uttakene var gjennomført.

Det kan diskuteres om fisken har blitt akklimatisert til høy  $\text{CO}_2$  ved å hydrere  $\text{CO}_2$  i blodet til  $\text{HCO}_3^-$ , for så å kunne overføre  $\text{H}^+$  og  $\text{HCO}_3^-$  over gjellene i bytte mot  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$ . Fivelstad et al. (1998) har tidligere vist at pH i blodet stiger når fisken blir utsatt for høye  $\text{CO}_2$  nivåer, men det er også gjort forsøk som viser at ved konstant høye  $\text{CO}_2$  nivåer som ikke fluktuerte mye vil en se en lavere blod pH i et par timer. Dette blir så etterfulgt av gjenoppretting av blod pH som følge av kompenseringseffekten til fisken (Brauner et al., 2019). Siden vannet i dette forsøket ble overvåket, og bevisst tilsatt  $\text{CO}_2$  er det mulig at dette kan ha bidratt til at fisken har klart å tilvenne seg den økte mengden  $\text{CO}_2$ .

Temperatur er svært viktig når en snakker om vekst hos fisk siden de er vekselvarmeorganismer. Jobling (1996) demonstrerte at vekstraten til laks vil øke med økende temperatur opp til et visst punkt. I dette tilfelle målte han SGR for fisk fra  $6^\circ\text{C}$ , opptil  $28^\circ\text{C}$ . Dette forsøket viste at det er en stor forskjell på vekstrate basert på konstante temperaturer. Vekstraten for fisken i alle tankene i forsøk 1 var lavere enn målingene ved samme temperatur. SGR var noe lavere enn forventet ved temperaturen brukt i mastergradforsøket, men det kan ha sammenheng med hyppig sampling, i tillegg til smoltifisering som kan stresse fisken.

I forsøk 2 ble det funnet en signifikant nedgang i vekstrate mellom fiskene i  $\text{CO}_2$  tankene og kontrolltankene, og mellom fiskene i  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene og kontrolltankene (appendix 7.3.2).

Det er mulig å se en stor differanse i SGR mellom  $\text{CO}_2$  fiskene og kontrollfiskene, med en noe mindre forskjell mellom  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene og kontrolltankene (figur 18). Dette er sammenlignbart med Hosfelds (2008) resultater, der fisken med høyt oksygen og karbondioksid hadde en betydelig lavere SGR enn fisken som ikke hadde økt  $\text{CO}_2$  i vannet. Hosfelds forsøk ble gjennomført ved  $9^\circ\text{C}$ , derfor vil en anta at fisken i forsøk 2 vil ha en lavere vekstrate enn Hosfelds fisk, men vekstraten var omtrent lik i forsøk 2, som i Hosfelds forsøk. Ved lavere temperatur vil også fisken ha lavere vekstrate, og lavere fôrinntak. Fra tidligere forsøk gjort av Fivelstad (2007) kan en se at vekstraten til fisken var betydelig høyere ved en temperatur på  $15^\circ\text{C}$ , enn ved  $5^\circ\text{C}$  slik som forsøk 2 i denne oppgaven. I et annet forsøk av Fivelstad (2015) utført på parr som ble utsatt for forhøyde  $\text{CO}_2$  nivåer ved  $15^\circ\text{C}$  er det mulig å se en høyere vekstrate enn det som ble sett i forsøk 2.

Det bør nevnes at det kun var prøvetatt fisk som ble brukt for å regne ut vekstraten til fisken. Dette kan ha gitt et skjevt bilde av veksten da antall prøvetatte fisk kun var 10 fisk per tank, dvs. 20 fisk per behandling for sluttuttaket.

## 4.2 Kondisjonsfaktor

Vanligvis vil en se at kondisjonsfaktoren vil synke i løpet av smoltifiseringen (McCormick & Saunders, 1987), som vist i forsøk 1 (figur 9 og tabell 6). Dette er på grunn av at fisken vokser mer i lengde i forhold til i vekt under smoltifiseringen da energiforbruket er høyere enn før smoltifiseringen. I forsøk 2 derimot kan en se at kondisjonsfaktoren øker i løpet av forsøket (tabell 8), altså at fisken øker mer i vekt i forhold til lengde. Utvendig så det ut som at fisken var godt i gang med smoltifiseringen. Dette styrkes også av at fisken som ble tatt ut i første uttaket ikke hadde en smoltfaktor som var under 3,0, men et gjennomsnitt på 3,7. Ferskvanns ATPase analysene gjort av Veterinærinstituttet viste derimot at fisken ikke var kommet langt i smoltifisering. I midtuttaket var smoltfaktoren på fisken 2 – 3,3 med et gjennomsnitt på 2,7, mens i sluttuttaket var smoltfaktoren på mesteparten av fisken 4 med et gjennomsnitt på 3,5. Dette kan ha noe med at det var tilfeldig selektering av fisken som ble tatt ut for hvert uttak, og det tydelig var store forskjeller mellom individer innad i tankene. I forsøk gjort av Jørgensen og Jobling, og Koskela, et al. (Jørgensen and Jobling 1993; Koskela et al. 1997) ble det også observert en økning i kondisjonsfaktor gjennom smoltifiseringen, men årsaken bak dette var ukjent. I forsøk 1 ble det funnet en signifikant lavere kondisjonsfaktor i kontrollfisken i forhold til CO<sub>2</sub> fisken fra gruppe B ( $p < 0,05$ ) (appendix 7.2.4). Det ble også funnet en signifikant lavere kondisjonsfaktor i CO<sub>2</sub> fisken i forhold til kontrollfisken i forsøk 2 ( $p < 0,05$ ) (appendix 7.3.5). Fivelstad (2007) har tidligere vist at kondisjonsfaktoren var lavere hos fisk som var utsatt for høye CO<sub>2</sub> nivåer, både ved en temperatur på 5°C som i forsøk 2 her, og ved en temperatur på 15°C. Andre forsøk har også vist en nedgang i kondisjonsfaktor i takt med økning av CO<sub>2</sub> i vannet (Fivelstad et al., 1998, 2018, 2015). Dette kan være begrunnet av nedsatt fôrintak ved høyere konsentrasjoner av CO<sub>2</sub>, men fôrintaket ble ikke målt i dette forsøket, så det kan ikke konkluderes med at dette var årsaken. Etter å ha sammenlignet ulike forsøk skrev Stien et al. (2013) at kondisjonsfaktoren vanligvis er like over 1 i smolt, som vil si at ingen av fiskegruppene i noen av forsøkene gjennomført i denne oppgaven hadde lavere kondisjonsfaktor enn det som forventes av fisk i dette livsstadiet (figur 9 og figur 19).



### 4.3 Organindekser

Det ble ikke observert en signifikant forskjell mellom noen av fiskene for HSI, VSI eller CSI ved sluttuttaket i forsøk 2 ( $p > 0,05$ ) (appendix 7.3.3). I forsøk 1 ble det funnet en signifikant lavere CSI i kontrollfiskene i forhold til CO<sub>2</sub> fiskene fra gruppe A ( $p < 0,05$ ) (appendix 7.2.2). Dette betyr at CO<sub>2</sub> fiskene fra gruppe A hadde større hjerte i forhold til kroppsvekt sammenlignet med de andre fiskene. Det ble også observert signifikant høyere VSI fiskene fra gruppe A i forhold til gruppe B ( $p < 0,05$ ), men ikke mellom CO<sub>2</sub> fiskene og kontrollfiskene fra samme gruppe (appendix 7.2.2). CSI, HSI og VSI er en prosentratio av hjerte-, lever-, og viscera vekt i forhold til kroppsvekt. Einen et al. (1999) gjennomførte et forsøk på voksen atlantisk laks under ulike fôringsregimer, og målte gjennomsnittlig  $7,3 \pm 1,1\%$  for VSI, og  $1,00 \pm 0,13\%$  for HSI, som begge er høyere enn gjennomsnittene målt i dette forsøket.

### 4.4 Nefrokalsinose

I forsøk 1 ble det ikke sett en høy andel utfellinger. Det ble funnet tre fisk fra gruppe B og en fisk fra gruppe A som hadde NK før forsøket startet, og det ble funnet en fisk fra gruppe B som hadde NK ved sluttuttaket.

I forsøk 1 ble det tilsatt 11,8-15,6mg/L CO<sub>2</sub> i vannet, kombinert med sjøvann 8‰ for å bufre vannet (tabell 1). Det er ikke blitt gjort mye forskning på hva som kan regnes som trygge CO<sub>2</sub> nivåer, men det har blitt foreslått i tidligere forskning at 10mg/L er helt trygt for postsmolt (Fivelstad et al., 1998). Forsøk 1 viste at fisken kan håndtere konsentrasjoner opp til 15,6mg/L, med tanke på den lave andelen av fisken som faktisk utviklet nefrokalsinose. I tidligere forsøk gjort av Fivelstad et al. (2003) ble det observert NK hos fisk som ble holdt under sammenlignbare parametere ( $16 \pm 2,1$  mg/L CO<sub>2</sub>, 7-9°C) som i dette forsøket (11,5-15,6mg/L CO<sub>2</sub> og 9°C). I Fivelstad et al. (2003) sitt forsøk ble det brukt NaOH som buffer i motsetning til i forsøk 1 der 8‰ saltvann ble benyttet, og eksponeringstiden var 60 dager i motsetning til 43 dager. Fivelstad et al. (2018) gjennomførte et forsøk på post-smolt i 34‰ sjøvann ved 9°C. I Fivelstads forsøk ble det ikke observert nefrokalsinose i noen av fiskene i tankene med 15mg/L CO<sub>2</sub> eller mindre, men det ble observert nefrokalsinose i fisk fra tankene med 21-30mg/L. I et annet lignende forsøk av Fivelstad et al. (1998) gjort på postsmolt ved 15-16°C i sjøvann med 34‰ salinitet, ble det ikke observert nefrokalsinose i noen av gruppene. I Fivelstads forsøk (1998) ble fiskegruppene eksponert for CO<sub>2</sub> konsentrasjoner på 1,3mg/L (kontroll), 10,6mg/L (lav), 26mg/L (medium) og 44mg/L (høy). Samlet sett tyder dette på at

både temperatur, buffringemetode, livsstadie og eksponeringstid påvirker utviklingen av NK, siden det selv med veldig høye konsentrasjoner av CO<sub>2</sub> ikke ble sett NK i Fivelstad et al. (2018). I Hosfeld et al. (2008) ble NK funnet ved 17-18mg/L CO<sub>2</sub>, men da med flere andre miljøbetingelser som er ulikt det som ble brukt i forsøk 1. En mulig forklaring til at det ikke ble utviklet NK i forsøk 1, kan være at det ble benyttet saltvann til buffring (se tabell 1). Fra tidligere forsøk (Fivelstad et al., 2003) blir det observert at NK forsvinner etter en periode i saltvann, men som nevnt er det også gjort forsøk på postsmolt i sjøvann (Fivelstad et al., 2018) der NK ble observert ved CO<sub>2</sub> konsentrasjoner over 20mg/L.

Forsøk 2 ble designet blant annet med bakgrunn i et eksperiment utført av Hosfeld et al. (2008) der det ble vist at kombinasjonen av høy CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub> fører til en betydelig høyere prevalens av nefrokalsinose i fisken. I Hosfelds forsøk ble laks eksponert for med lavt (93%), medium (111%) og høyt (123%) oksygennivå der tre av tankene var kun oksygenert, mens de tre andre tankene var tilsatt 17-18mg/L CO<sub>2</sub> i tillegg til disse tre oksygenivåene. I forsøket ble det ikke funnet fisk med nefrokalsinose i tankene med kun lavt eller medium oksygenivå, mens tankene med medium og høyt oksygenivå i kombinasjon med tilsatt CO<sub>2</sub> hadde en prevalens på henholdsvis 50% og 33% (Hosfeld et al., 2008).

I forsøk 2 gikk fisken på lav temperatur for å få lang eksponeringstid under smoltifiseringen, NaOH ble brukt til å bufre vannet og fisken ble eksponert for 20-25mg/L CO<sub>2</sub> alene og med 125% O<sub>2</sub> i 78 dager (tabell 1). Allerede ved 0-uttaket i forsøk 2 var det påvist NK i 4 av 24 undersøkte fisk (tabell 9). Denne fisken kom fra et anlegg som har kjent NK historikk, og etter 78 dager var det en prevalens på 27,9% NK blant all fisken som var tatt ut til mikroskopisk undersøkelse. Makroskopisk ble det observert 21 fisker som tilsynelatende hadde utfellinger i nyrene, av disse 21, fikk 8 påvist NK mikroskopisk. Ved sluttuttaket ble det ikke funnet NK i kontrollfiskene, og det hadde til da blitt funnet totalt én fisk med NK i kontrolltankene. Prevalensen i de ulike tankene var 1,8% i kontrolltankene, 36,3% i CO<sub>2</sub> tankene og 50% i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene. Det var en signifikant høyere prevalens i CO<sub>2</sub> tankene i forhold til kontrolltankene ( $p < 0,05$ ), og en signifikant høyere prevalens i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> tankene i forhold til kontrolltankene ( $p < 0,05$ ). Dette gir grunn til å tro at det er behandlingene, altså forhøyet CO<sub>2</sub>, og forhøyet CO<sub>2</sub> med forhøyet O<sub>2</sub> som har ført til utviklingen av NK i de andre tankene.

Dette bekrefter funnene i Hosfeld et al. (2008) til tross for en forskjell i eksponeringstid, temperatur og lysforhold. En kan se på forskjellen mellom de ulike forsøkene nevnt i denne oppgaven at tilsetning av høyere konsentrasjon CO<sub>2</sub> kan resultere i større sannsynlighet for utfellinger i nyrene, og at kombinasjonen av forhøyet CO<sub>2</sub> i tillegg til høy oksygenmetning av

vannet, kan ytterligere øke sannsynligheten for utfellinger. Resultatene i forsøk 2 bekrefter Hosfeldts (2008) resultater, men mer forskning trengs, blant annet for å undersøke effekten av forhøyet O<sub>2</sub> i kombinasjon med CO<sub>2</sub> og alene i forhold til risiko for utvikling av nefrokalsinose.

Som nevnt tidligere er det fortsatt variasjon i observasjoner av NK selv ved sammenlignbare parametere. Dette kan tyde på at det er andre ukjente faktorer som virker inn på utviklingen av nefrokalsinose (appendix 7.1).

#### 4.5 Mineral

Fra tidligere forsøk (Fivelstad et al., 2003; Shavit et al., 2015) er det antydnet at utfellingene en finner i fisk som har nefrokalsinose består hovedsakelig av kalsiumfosfat og vi regnet derfor med å se en økning i kalsium og fosfor. I forsøk 1 ble det funnet et signifikant høyere kalsiumnivå i fisken fra gruppe B i forhold til gruppe A ( $p < 0,05$ ). I et forsøk gjort av Fivelstad et al. (2003) ble det målt et kalsium innhold på  $167 \pm 27$  mg/kg i nyren etter 28 dagers eksponering for 16 mg/L CO<sub>2</sub>. Etter 58 dagers eksponering steg dette tallet til  $204 \pm 23$ . Sammenlignet med våre funn i forsøk 1 der fisken fra gruppe A utsatt for 11,8-15,6 mg/L CO<sub>2</sub> hadde et kalsiuminnhold i nyren på  $154 \pm 47$  mg/kg, mens fisken fra gruppe B hadde et kalsiuminnhold på  $190 \pm 23$  mg/kg etter 43 dager. Disse fiskene var også forskjellig i størrelse, CO<sub>2</sub> fisken fra gruppe A var  $99 \pm 16$  g, mens fisken fra gruppe B var  $132 \pm 23$  g. Fivelstad et al. (2003) målte også innholdet av fosfor og magnesium, men disse målingene var lavere enn målingene gjort i dette forsøket. Dette kan ha årsak i den store forskjellen i mineralinnholdet i fiskene som ble målt i dette forsøket, da det var stor variasjon i alle mineralmålingene gjort for både gruppe A og gruppe B. Fivelstad målte også mineralinnhold for hele fisken, og disse målingene ble bestemt å være innenfor normale mengder observert i fisk som hadde en sammenlignbare størrelser og livsstadier. I dette forsøket ble ikke mineralinnholdet for hele fisken målt, og det er derfor vanskelig å sammenligne med det som kan regnes som normale verdier observert av Shearer et al. (1994).

I et forsøk gjennomført av Smart et al. (1979), på regnbueørret ble det målt kalsium-, magnesium og fosforinnhold i nyren til ørreten ved ulike tidspunkt. Første gang det ble målt var etter 112 dager. I Smarts forsøk ble det målt et gjennomsnittlig kalsiuminnhold på  $183 \pm 39$  mg/kg ww, og  $209 \pm 33$  mg/kg ww i fiskene utsatt for 12-14 mg/l CO<sub>2</sub>. Disse målingene er noe høyere enn dem målt i forsøk 1 (figur 10) som hadde en lignende CO<sub>2</sub> konsentrasjon. Forskjellen mellom Smarts forsøk og forsøk 1 kan skyldes lengre eksponeringstid i Smarts forsøk. Magnesiuminnholdet i Smarts forsøk ble etter 112 dager målt til å være  $213 \pm 10$  mg/kg

ww, og  $202 \pm 6 \text{ mg/kg ww}$  i fiskene som ble utsatt for  $12\text{-}14 \text{ mg/l CO}_2$ . Dette er noe lavere enn magnesiumnivåene målt i forsøk 1, og noe høyere enn magnesiumnivåene målt i forsøk 2 (tabell 7 og 11). For fosfor målte Smart  $2563 \pm 63 \text{ mg/kg ww}$  og  $3111 \pm 346 \text{ mg/kg ww}$ . Dette er lavere enn målingene gjort i forsøk 1, og rundt samme nivå som de målt i forsøk 2. Smart observerte en markert økning i mineralinnhold med stigende  $\text{CO}_2$ , men dette ble ikke replisert i dette mastergradsforsøket.

I forsøk 2 viste mineral i nyre en generell økning av kalsium og natrium innhold hos  $\text{CO}_2$  fisken i forhold til kontrollfisken (figur 24 og 26). For  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  fisken var det en økning i natrium, mens kalsium innholdet var lavere enn i kontrollfisken. Sammenlignet med sluttuttaket i forsøk 1 (tabell 7), kan en se at mineralinnholdet fra sluttuttaket i forsøk 2 (tabell 11) har høyere verdier av Ca, men lavere verdier for alle de andre mineralene i alle tankene. Mineralinnholdet i fisken fra forsøk 2 var sammenlignbar med Fivelstad et al. (2003) sine målinger i den gruppen med høy  $\text{CO}_2$  ( $24 \pm 3.1 \text{ mg/L}$ ). I forsøk 2 ble det målt høyere gjennomsnitt av kalsium i kontrolltankene,  $\text{CO}_2$  tankene, og i  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene, i forhold til den høye gruppen i Fivelstads forsøk. Fosfor verdiene i forsøk 2 var lavere i  $\text{CO}_2$  tankene og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  tankene (figur 32), i forhold til Fivelstads målinger, men høyere i kontrolltankene. Målingene for magnesium var forholdsvis like i forsøk 2 (figur 30) som i Fivelstads forsøk. Endringene observert i mineralinnhold er foreslått å være en kompensatorisk reaksjon på forstyrrelser i mineral homeostasen som følge av stress assosiert med økte  $\text{CO}_2$  konsentrasjoner i ferskvann (Fivelstad et al., 2003).

Det er interessant at to av fiskene som hadde svært høye nivåer av kalsium hadde nefrokalsinose, mens to andre fisk ble også målt med svært høye nivåer av kalsium, men viste ingen tegn til utfellinger i nyrene. Årsaken bak denne høye konsentrasjonen av kalsium er ukjent. Fisk nr. 28, 31, og 33 fra sluttuttaket i forsøk 2 ble også diagnostisert med NK, men viser ingen tegn til høyere mineralnivåer. Videre forskning på dette vil være svært nyttig for å bekrefte om det er en sammenheng mellom målt mineralnivå i nyre og utvikling av NK i laks. Det ble gjort statistiske analyser av mineralinnholdet i prøvetatt fisk fra sluttuttaket i forsøk 2 som hadde NK mot fisken som ikke hadde NK. Her ble det ikke funnet en signifikant forskjell i mineralinnholdet ( $p > 0,05$ ). Dette kan være grunnet det lave antallet fisk av fisk med NK som ble analysert, da det var 5 fisk ble diagnostisert med NK som ble brukt i mineralanalysen, målt opp mot 19 som ikke hadde NK. For dette forsøket ble baknyren delt på langs. Halvparten ble undersøkt histologisk, mens den andre halvdel ble brukt til mineralanalyser. Det er mulig at dette kan ha forårsaket forskjellene i mikroskopisk påvisning av NK, og kalsiumnivå i nyren,

da utfellingene oftest ble observert på den ene siden av nyren, men ikke den andre (figur 20 og 3). Det var også bare fem fisk av de som tilsynelatende hadde makroskopiske utfelling, som fikk påvist NK histologisk. Dette kan tyde på at det er vanskelig å se utfellingene makroskopisk med mindre det er snakk om alvorlige tilfeller, noe som ikke ble sett i forsøk 1 og 2.

For videre forskning vil det anbefales å ha høyere antall prøver for mineralmålinger av fisk, da variasjonen målt kan ha ført til resultater som kunne vært mer nøyaktige ved å ha en større mengde prøver.

Totalt sett er det vanskelig å si om disse resultatene kan brukes som klinikk for NK uten å dissekere fisken. Det ble oppdaget en forskjell i k faktor og vekstrate mellom fisken som var utsatt for forhøyet  $\text{CO}_2$  og forhøyet  $\text{CO}_2$  med forhøyet  $\text{O}_2$ . Både k faktor og SGR var lavest i  $\text{CO}_2$  fiskene, som hadde lavere prevalens av NK i forhold til  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  fiskene. Fiskene som ble utsatt for høy  $\text{CO}_2$  og høy  $\text{O}_2$  hadde høyere k faktor enn kontrollfiskene, men lavere vekst. Videre forskning kreves for å bekrefte om det er en korrelasjon mellom disse endringen og NK.

## 5 Konklusjon

Hovedformålet med prosjektet var å undersøke om forhøyet CO<sub>2</sub> påvirket vekst, kondisjonsfaktor, organindekser, mineralinnhold i nyre, og utvikling av nefrokalsinose i to ulike forsøk med laks under smoltifisering.

Det ble ikke observert en forskjell i vekst blant fiskene i forsøk 1 utsatt for 11,8-15,6mg/L CO<sub>2</sub> ved 9°C. Vekstrate var påvirket negativt hos laks utsatt for 20-25mg/L CO<sub>2</sub> ved 5°C både med og uten høy oksygenmetning i forsøk 2 (p<0,05).

Det ble observert en signifikant lavere k faktor mellom fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og kontrollfiskene i forsøk 2 (p<0,05). I forsøk 1 ble det vist at k faktor var signifikant høyere i gruppe B fiskene i forhold til fiskene i gruppe A (p<0,05).

Nefrokalsinose ble bare funnet i 1 fisk ved sluttuttaket i forsøk 1, dette tyder på at fisken kunne tolerere denne CO<sub>2</sub> konsentrasjonen (11,8-15,6mg/L).

Det ble funnet en signifikant økning i prevalens av nefrokalsinose mellom fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> sammenlignet med kontrollfisken i forsøk 2 (p<0,05).

CO<sub>2</sub> eksponeringen påvirket ikke innholdet av mineraler i forsøk 1 eller 2, men det ble observert store forskjeller i konsentrasjonen, som bør følges opp videre.

Det ble heller ikke funnet en signifikant forskjell i mineralinnhold mellom fiskene med NK og fiskene uten NK (p>0,05).

I forsøk 1 ble det funnet en høyere CSI og VSI i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> (p<0,05), men dette ble ikke observert i forsøk 2. Det var ingen forskjeller i HSI som følge av CO<sub>2</sub> eksponering.

Det ble vist i dette forsøket at CO<sub>2</sub> konsentrasjoner fra 20-25mg/L påvirker både vekst og øker forekomsten av nefrokalsinose hos atlantisk laks. Det ble også demonstrert at høye konsentrasjoner av CO<sub>2</sub> i kombinasjon med høy oksygenmetning i vannet fører til økt forekomst av nefrokalsinose. CO<sub>2</sub> kan også ha en signifikant innvirkning på kondisjonsfaktor i laks, som demonstrert i forsøk 2. I forsøk 1 ble det demonstrert en signifikant nedgang i kondisjonsfaktor i fisken fra gruppe B, men ikke i fisken fra gruppe A, som ble studert ved de samme parameterne.

## 6 Referanser

- Aslam, S. N., Navada, S., Bye, G. R., Mota, V. C., Terjesen, B. F., & Mikkelsen, Ø. (2019). Effect of CO<sub>2</sub> on elemental concentrations in recirculating aquaculture system tanks. *Aquaculture*, 511. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734254>
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O., & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.003>
- Bone, Q., & Moore, R. (2008). Biology of Fishes. In *Biology of Fishes* (3rd ed.), New York: Taylor & Francis.
- Borgatti, A. R., Pagliarani, A., & Ventrella, V. (1992, August 1). Gill (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase involvement and regulation during salmonid adaptation to salt water. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*, 102, 637–643. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90717-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90717-5)
- Brauner, C. J., Seidelin, M., Madsen, S. S., & Jensen, F. B. (2000). Effects of freshwater hyperoxia and hypercapnia and their influences on subsequent seawater transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts., 57(10), 2054–2064. <https://doi.org/10.1139/F00-161>
- Brauner, C. J., Shartau, R. B., Damsgaard, C., Esbaugh, A. J., Wilson, R. W., & Grosell, M. (2019). Acid-base physiology and CO<sub>2</sub> homeostasis: Regulation and compensation in response to elevated environmental CO<sub>2</sub>. In *Fish Physiology*, 37, 69–132. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2019.08.003>
- Brittain, T. (1987, January 1). The root effect. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 86, 473–481. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90434-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90434-2)
- Colt, J. (2006). Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 143–156. <https://doi.org/10.1016/J.AQUAENG.2005.08.011>
- Cowey, C. B., Knox, D., Adron, J. W., George, S., & Pirie, B. (1977). The production of renal calcinosis by magnesium deficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 38(1), 127–135. <https://doi.org/10.1079/bjn19770068>
- Dalum, A., Poppe, T., Lunheim, A., & Reed, A. (2019). (PDF) Nefrokalsinose - ukjent årsak til økt forekomst av nyreproblemer hos norsk oppdrettslaks. Retrieved September 29, 2020, from Norsk fiskeoppdrett 3 website: [https://www.researchgate.net/publication/332427725\\_Nefrokalsinose\\_-\\_ukjent\\_arsak\\_til\\_okt\\_forekomst\\_av\\_nyreproblemer\\_hos\\_norsk\\_oppdrettslaks](https://www.researchgate.net/publication/332427725_Nefrokalsinose_-_ukjent_arsak_til_okt_forekomst_av_nyreproblemer_hos_norsk_oppdrettslaks)
- Eddy, F. B., Lomholt, J. P., Weber, R. E., & Johansen, K. (1977). Blood respiratory properties of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) kept in water of high CO<sub>2</sub> tension. *Journal of Experimental Biology*, 67, 37–47. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/23113115\\_Blood\\_respiratory\\_properties\\_of\\_rainbow\\_trout\\_Salmo\\_gairdneri\\_kept\\_in\\_water\\_of\\_high\\_CO2\\_tension](https://www.researchgate.net/publication/23113115_Blood_respiratory_properties_of_rainbow_trout_Salmo_gairdneri_kept_in_water_of_high_CO2_tension)
- Einen, O., Mørkøre, T., Rørå, A. M. B., & Thomassen, M. S. (1999). Feed ration prior to slaughter—a potential tool for managing product quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 178(1–2), 149–169. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00126-X)
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). *The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>.-The
- Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G., & Olsen, A. B. (1998). Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): Ion regulation and growth.

- Aquaculture*, 160(3–4), 305–316. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00166-X)
- Fivelstad, S., Hosfeld, C. D., Medhus, R. A., Olsen, A. B., & Kvamme, K. (2018). Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures. *Aquaculture*, 482, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.012>
- Fivelstad, S., Kvamme, K., Handeland, S., Fivelstad, M., Olsen, A. B., & Hosfeld, C. D. (2015). Growth and physiological models for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr exposed to elevated carbon dioxide concentrations at high temperature. *Aquaculture*, 436, 90–94. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.11.002>
- Fivelstad, S., Olsen, A. B., Åsgård, T., Baevefjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T., & Stefansson, S. (2003). Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): Ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture*, 215(1–4), 301–319. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00048-0)
- Fivelstad, S., Olsen, A. B., Kløften, H., Ski, H., & Stefansson, S. (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*, 178(1–2), 171–187. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00125-8)
- Fivelstad, S., Waagbø, R., Stefansson, S., & Olsen, A. B. (2007). Impacts of elevated water carbon dioxide partial pressure at two temperatures on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and haematology. *Aquaculture*, 269(1–4), 241–249. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2007.05.039>
- Gil Martens, L., Witten, P. E., Fivelstad, S., Huysseune, A., Sævareid, B., Vikeså, V., & Obach, A. (2006). Impact of high water carbon dioxide levels on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): Effects on fish performance, vertebrae composition and structure. *Aquaculture*, 261(1), 80–88. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.06.031>
- Gillespie, D. C., & Evans, R. E. (1979). Composition of Granules from Kidneys of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) with Nephrocalcinosis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 36(6), 683–685. <https://doi.org/10.1139/f79-100>
- Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 212, 1647–1661. <https://doi.org/10.1242/jeb.029181>
- Handeland, S. O., Wilkinson, E., Sveinsbø, B., McCormick, S. D., & Stefansson, S. O. (2004). Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 233(1–4), 513–529. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2003.08.028>
- Hayashi, M., Kita, J., & Ishimatsu, A. (2004). Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three marine fishes. *Marine Biology*, 144(1), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1172-y>
- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., & Bowen, B. W. (2009). *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. 2nd edition. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Hicks, B. D., Hilton, J. W., & Ferguson, H. W. (1984). Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 7(5), 379–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1984.tb01202.x>
- Hosfeld, C. D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T. M., Waagbø, R., Olsen, A. B., ... Fivelstad, S. (2008). Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 280(1–4), 146–153.



<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.009>

- Hu, Y., Ni, Q., Wu, Y., Zhang, Y., & Guan, C. (2011). Study on CO<sub>2</sub> removal method in recirculating aquaculture waters. *Procedia Engineering*, *15*, 4780–4789. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.894>
- Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K. S., & Kita, J. (2004). Effects of CO<sub>2</sub> on marine fish: Larvae and adults. *Journal of Oceanography*, *60*, 731–741. <https://doi.org/10.1007/s10872-004-5765-y>
- Jobling, M. (1996). Global Warming Implications for Freshwater and Marine Fish Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*, 225–254. Retrieved from <http://ebooks.cambridge.org/>
- Jørgensen, E. H., & Jobling, M. (1993). The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, *116*(2–3), 233–246. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90011-M](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90011-M)
- Khan, J. R., Johansen, D., & Skov, P. V. (2018). The effects of acute and long-term exposure to CO<sub>2</sub> on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater. *Aquaculture*, *491*, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.010>
- Koskela, J., Pirhonen, J., & Jobling, M. (1997). Effect of low temperature on feed intake, growth rate and body composition of juvenile Baltic salmon. *Aquaculture International*, *5*(6), 479–488. <https://doi.org/10.1023/A:1018397014684>
- Kryvi, H., & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*. Bergen: Fagbokforlaget
- Lefevre, S. (2019). Effects of high CO<sub>2</sub> on oxygen consumption rates, aerobic scope and swimming performance. In *Fish Physiology*, *37*, 195–244. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2019.08.001>
- Marinhelse. (2019). (PDF) *Fisken i Fokus*. Retrieved November 16, 2020, from <https://doi.org/10.02.2019>
- McArley, T. J., Sandblom, E., & Herbert, N. A. (2021). Fish and hyperoxia—From cardiorespiratory and biochemical adjustments to aquaculture and ecophysiology implications. *Fish and Fisheries*, *22*(2), 324–355. <https://doi.org/10.1111/FAF.12522>
- Mccormick, S. D., & Saunders, R. L. (1987). Preparatory Physiological Adaptations for Marine Life of Salmonids: Osmoregulation, Growth, and Metabolism. *American Fisheries Society Symposium*, *1*, 211–229.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* *1999* *9*:3, *9*(3), 211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Patel, A. K., & Cooper, J. S. (2018). Physiology, Bohr Effect. In *StatPearls*. Retrieved February 24, 2021, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30252284>
- Richardson, N. L., Higgs, D. A., Beames, R. M., & McBride, J. R. (1985). Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Nutrition*, *115*(5), 553–567. <https://doi.org/10.1093/jn/115.5.553>
- Rosten, T., Åtland, Å., Kristensen, T., Rosseland, B. O., & Braathen, B. (2004). (PDF) *Mattilsynet UTKAST Utredning av vannkvalitet relatert til dyrevelferd*. Retrieved December 02, 2020, from [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskevelferd/mattilsynet\\_\\_rapport\\_om\\_vannkvalitet\\_og\\_fiskevelferd\\_2004.5943/binary/Mattilsynet%20-](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/mattilsynet__rapport_om_vannkvalitet_og_fiskevelferd_2004.5943/binary/Mattilsynet%20-)

%20Rapport%20om%20vannkvalitet%20og%20fiskevelferd%20(2004)

- Shavit, L., Jaeger, P., & Unwin, R. J. (2015). What is nephrocalcinosis? *Kidney International*, 88, 35–43. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.76>
- 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. *Journal of Fish Biology*, 44(5), 785–797. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1994.TB01255.X>
- Skov, P. V. (2019). CO<sub>2</sub> in aquaculture. In *Fish Physiology*, 37, 287–321. <https://doi.org/10.1016/bs.fp.2019.07.004>
- Smart, G. R., Knox, D., Harrison, J. G., Ralph, J. A., Richard, R. H., & Cowey, C. B. (1979). Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Fish Diseases*, 2(4), 279–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00170.x>
- Sommerset, I., Brun, E., Jensen, B., Nilsen, A., Jansen, Dverdal, M., Silva De Oliveira, H, V., ... Stige, L. C. (2021). Fiskehelse rapporten 2020. Retrieved March 15, 2021, from Fiskehelse rapporten 2020 website: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2021/fiskehelse rapporten-2020>
- Sommerset, I., Walde S., C., Bang Jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A., & Brun, E. (red). (2020). *Fiskehelse rapporten 2019 Rapport 5a/2020*. 1–156. <https://doi.org/ISSN 1890-3290>
- Stien, L. H., Bracke, M. B. M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., ... Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5(1), 33–57. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2012.01083.X>
- Thomsen, H. M. (2019). Brage NMBU: Forekomst av nefrokalsinose hos atlantisk laks (*Salmo salar* L) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*); et klinisk studie. In 59. Retrieved December 03, 2020, from Norwegian University of Life Sciences, Ås website: <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2635067>
- Verde, C., Vergara, A., Giordano, D., Mazzarella, L., & Di Prisco, G. (2007, June). The Root effect - A structural and evolutionary perspective. *Antarctic Science*, 19, 271–278. <https://doi.org/10.1017/S095410200700034X>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591–625. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1997.77.3.591>
- Wilson, R. W., Wilson, J. M., & Grosell, M. (2002). Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish - Why and how? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1566(1–2), 182–193. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00600-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00600-4)

# 7 Appendix

## 7.1 Tabell med tidligere forsøk

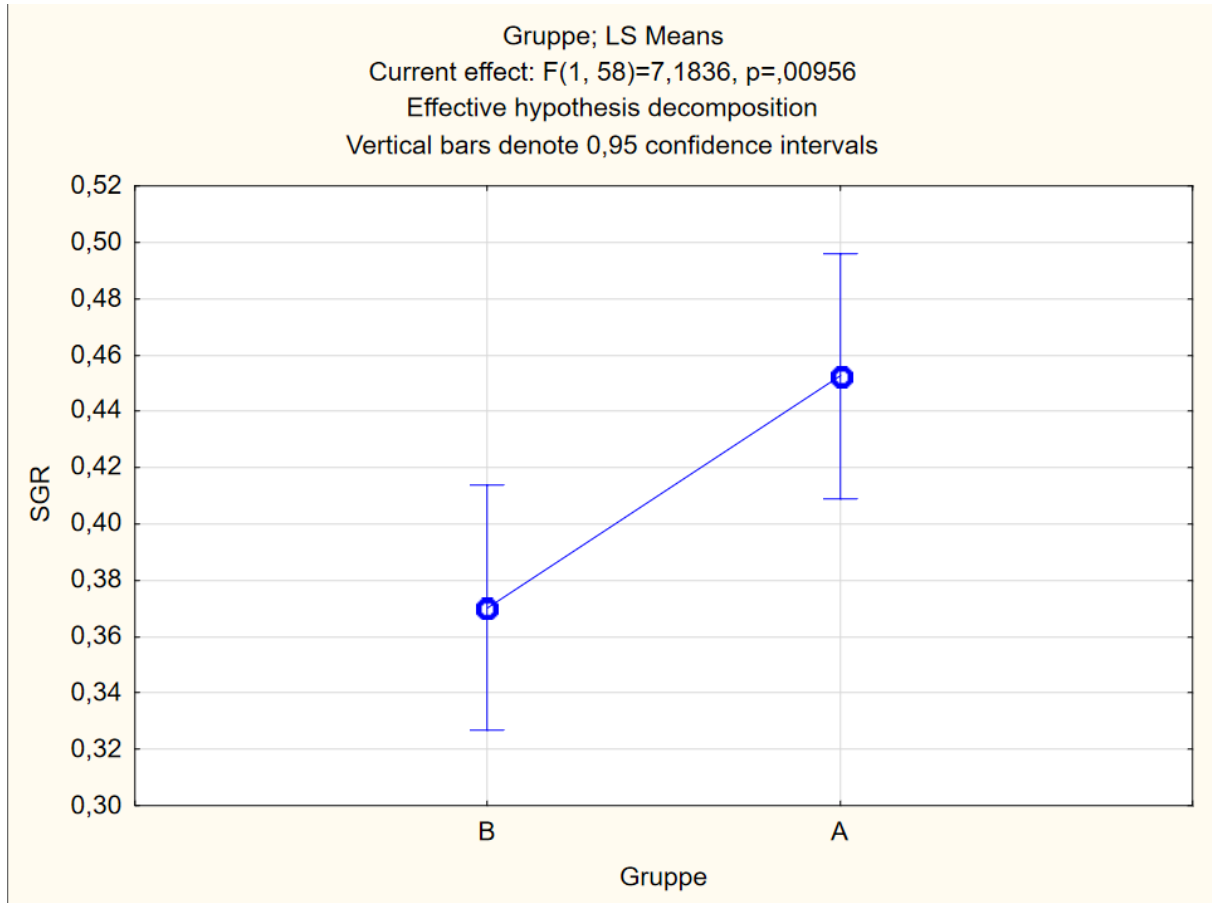
Størrelse	Strain/opphav	[CO <sub>2</sub> ]	Buffer	pH	Oksygenering	Anlegg	Varighet	Lys	Salinitet	Temperatur	Fôr	Antal fisk med nefrokalsinose	Artikkel	Link
Gjennomsnitt 53g	Mowi strain Salmo salar	2mm Hg, 5 mm Hg, og 9mm Hg	NaHCO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.4-7.0	Ewox oxygen packed column	Open flow	62 dager i ferskvann, 123 dager i sjøvann	Simulering av naturlig lys	34% i sjøvannsfasen	3-7°C	Commercial dry diet food, fra Ewos Oslo	Nefro i alle gruppene, gruppen med 9mm Hg hadde fest tilfeller	Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (Salmo salar L. smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater	<a href="https://www.science/article/abs/doi/10.1016/j.aquaculture.2018.08.012">https://www.science/article/abs/doi/10.1016/j.aquaculture.2018.08.012</a>
53.99g ± 1.55g	Danish salmon A/S	0, 10, 20, og 30 mg L <sup>-1</sup>		7.8, 7.25, 7.1 og 6.8	Gassing tower	RAS	47 dager	24x konstant lys	< 2 ppt	14°C	Biomar® Effic 940 3 mm and 4.5 mm pellets	Ingen data	The effects of acute and long- term exposure to CO <sub>2</sub> on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (Salmo salar) in freshwater	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848617317143">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848617317143</a>
Regnbueørret: 119-135.5g Laks: 99.7-106g							Regnbueørret: 77 dager, Laks: 54 dager					12 regnbueørret: 6 med score 1, 4 med score 2, og 2 med score 3. 17 laks: 5 med score 1, 7, 5 med score 2, og 4, 5 med score 3	Forekomst av nefrokalsinose hos atlantisk laks (Salmo salar L.) og regnbueørret (Oncorhynchus mykiss): et klinisk studie xmlui/handle/11250/2635067	<a href="https://hmbulb.rage.unit.no/inmbul-xmlui/handle/11250/2635067">https://hmbulb.rage.unit.no/inmbul-xmlui/handle/11250/2635067</a>
	Aquagen strain atlantic salmon	1.3-2.3 mm Hg (kontroll), 3.4-6.1 mm Hg (medium), 5.4-9.3 mm Hg (høy)		6.3-6.9 (kontroll), 6.4- 6.7 (medium), 6.3-6.6 (høy)	RAS	60 dager i ferskvann og 150 dager i saltvann	60 dager i ferskvann og 150 dager i saltvann	Simulering av naturlig lys ved 60°N	34% i sjøvannsfasen	7-9°C	Commercial dry diet food, fra Ewos Oslo	Ingen data om hvor mange, men det ble notert at det var forskjeller mellom gruppene	Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (Salmo salar L.) on regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters	<a href="https://www.science/article/abs/doi/10.1016/j.aquaculture.2018.08.012">https://www.science/article/abs/doi/10.1016/j.aquaculture.2018.08.012</a>
		0.5, 2.6, 5.5, 8.0, 10.4, og 11.6 mm Hg		7.86, 7.26, 6.93, 6.78, 6.67, 6.63	Gjennoms trømning	Packed column aerator	12 uker	Kontinuerlig lys	Tilvenning til sjøvannsfasen fra 15% opp til endelig sluttpunkt på 34%	10°C	Skretting nutra parr LB3	34% av fisken	Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (Salmo salar L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/doi/10.1016/j.aquaculture.2018.08.012">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/doi/10.1016/j.aquaculture.2018.08.012</a>

Størrelse	Strain/opphav	[CO <sub>2</sub> ]	Buffer	pH	Oksygenering	Anlegg	Variighet	Lys	Salinitet	Temperatur	Før	Antall fisk med nefrokalsinose	Artikkel	Link
20g	Shearwater fishfarming	12-14 mg/L (tank 1 og 3), 22-25 mg/L (tank 5-8), 50-60 mg/L (tank 9-12)		7.0-7.4 (tank 1 og 3), 6.65-6.7 (tank 5-8), 6.15-6.30 (tank 9-12)	Aerated with a water flow rate of 2-3 l/min	Tanker på laben	120-385 dager utifra tank			9°C	Lav mineral diett, og normal mineral diett	Tank nr: 1: 5.3%, 3: 4.3%, 5: 14.3%, 6: 5%, 7: 14.3%, 8: 5%, 9: 67.8%, 10: 28.6%, 11: 53.6%, 12: 30.9%	Nephrocalcinosis in rainbow trout Salmo gairdneri Richardson, the effect of exposure to elevated CO <sub>2</sub> concentrations to elevated CO <sub>2</sub> concentrations	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00170.x">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00170.x</a>
Regnbueørret yngel: 0.6 ±0.1g	Goosen's trout farm, Ontario, Canada			7.7-7.9		Tanker på laben	16 uker	12t		15-5±0.6°C	Diett med høyt nivå av selen, NS. Kontroll diett. Selen diett er fra California pellet mill, San Francisco	90% av fisken på diett med høyt selen innhold, nephrocalcinosis in the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson	Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson Richardson	<a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.1994.tb01202.x">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.1994.tb01202.x</a>
0.17-0.26kg	Salmo salar	0.6 mm Hg (Control), 4.9 mm Hg (low), 12 mm Hg (medium), 20mm Hg (High)		7.83-7.95 (Control), 6.95-7.14 (low), 6.43-6.79 (medium), 6.25-6.74 (high)	Packed column aerator	Gjennomstrømning	43 dager	Kontinuerlig lys	34‰	15-16°C	Tørrfôr (Fellesjøpet vekst 4; protein innhold 45%)	Ingen observasjoner	Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (Salmo salar L.: ion regulation and growth	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484869700166X">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484869700166X</a>
71 ± 9g ved start av eksperimentet	SalmoBreed	5, 12, 19, 26, 33 og 40 mg/L	NaHCO <sub>3</sub>	7.66 i 5 mg/l, 7.15 i 12 mg/l, 6.99 i 19 mg/l, 6.87 i 26 mg/l, 6.81 i 33 mg/l, 6.74 i 40 mg/l	Degasser column aerator	RAS	12 uker, etterfulgt av 6 uker i en simulert sjøvannsfase		12 ppt, senere overført til 34‰ (sjøvannsfasen)	12.7-12.8°C	3-4mm, Nutra Olympic, Skretting Norway	5/396 fisk viste tegn til nefrokalsinose grad 1 (1.26%)	The effects of carbon dioxide on growth performance, welfare, and health of Atlantic salmon post-smolt (Salmo salar) in recirculating aquaculture systems	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484869700166X">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484869700166X</a>
300g		8 ± <1 mg/L (kontroll), 20 ± 1 mg/L (høy)		7.86 ± 0.03 (Kontroll), 7.41 ± 0.01 (Høy)	degassing column, overtopping a low headoxgenator (LHO)	RAS	384 dager	Kontinuerlig lys		14.1 ± 0.1°C	Sakte-synkende ørret for (Zeigler Brothers, Inc, Gardners, PA, USA) 48:24 protein-til-fett ratio, senere byttet til lakse diett (EWOS, Vancouver, BC, Canada)	Ingen tegn til nefrokalsinose	The effects of long-term carbon dioxide exposure on the health and performance of Atlantic salmon smolts in water recirculation aquaculture systems	<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860917302145">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144860917302145</a>

## 7.2 Statistikk forsøk 1

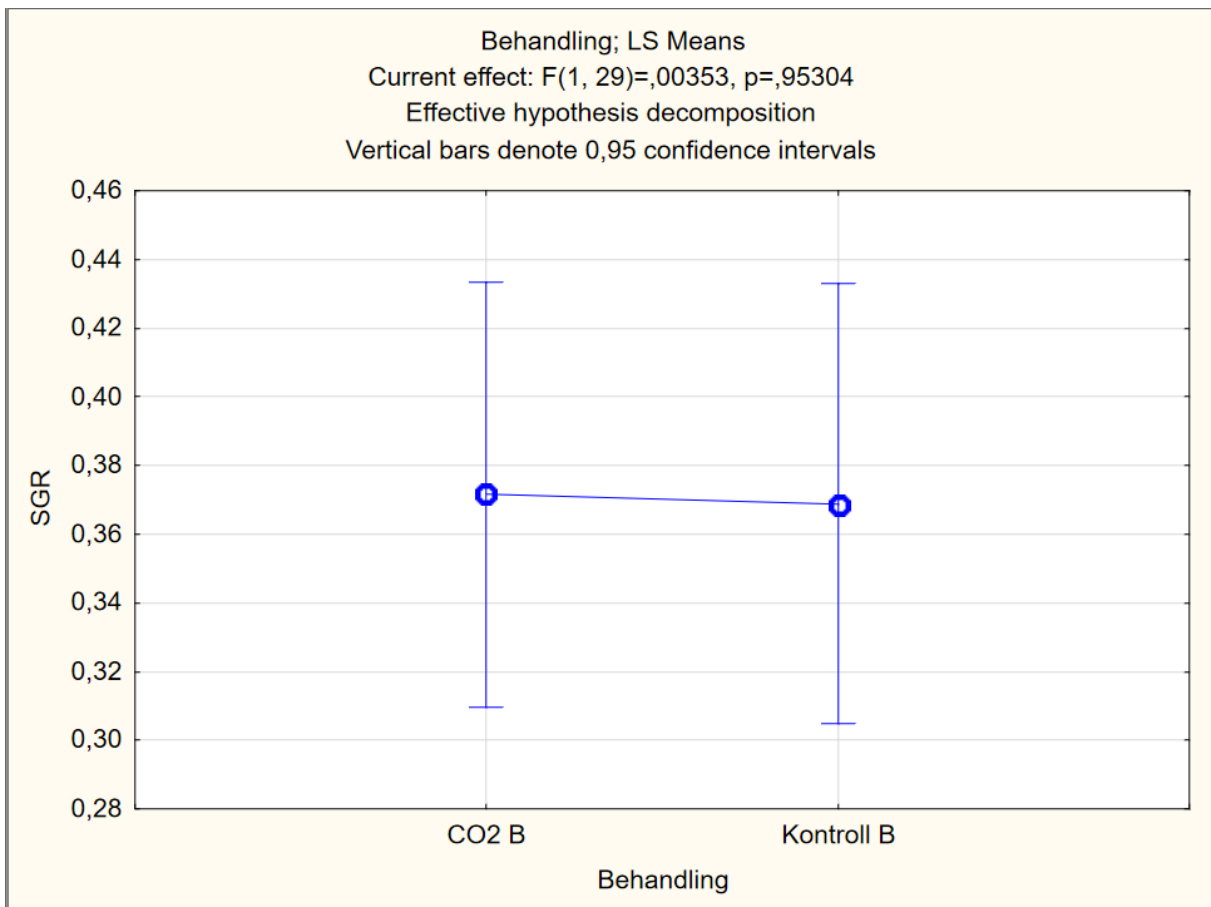
### 7.2.1 Statistikk for vekst

Toveis ANOVA for SGR med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



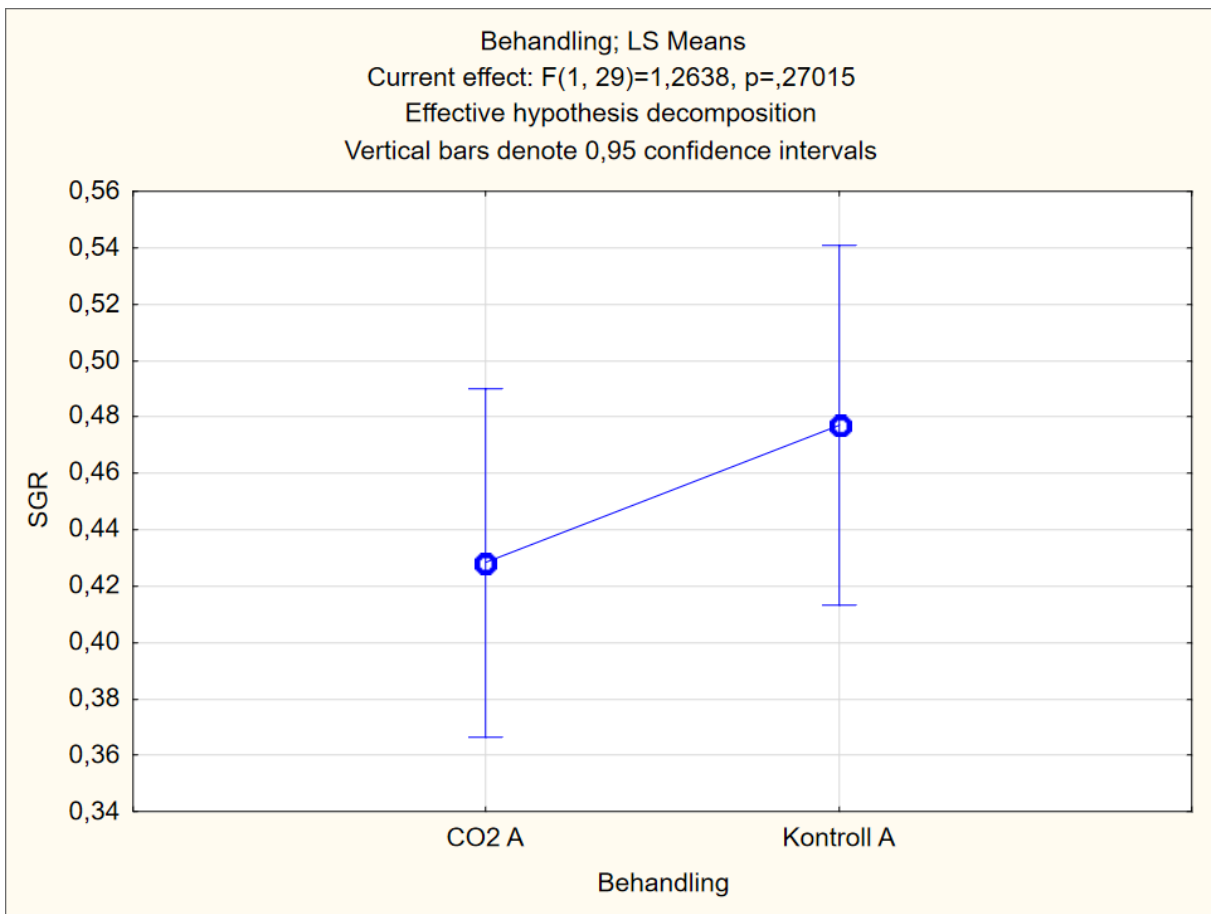
Univariate Tests of Significance for SGR (Spreadsheet18.sta)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>10,48420</b>	1	10,48420	716,0027	0,000000
Gruppe	0,10519	1	0,10519	7,1836	0,009562
Behandling	0,00827	1	0,00827	0,5646	0,455447
Gruppe*Behandling	0,01022	1	0,01022	0,6982	0,406832
Error	0,84928	58	0,01464		

Enveis ANOVA for SGR mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B, med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable SGR (Spreadsheet55)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,01470, df = 29,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 B	,37151	,36893	
2	Kontroll B	0,953142		

Enveis ANOVA for SGR mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



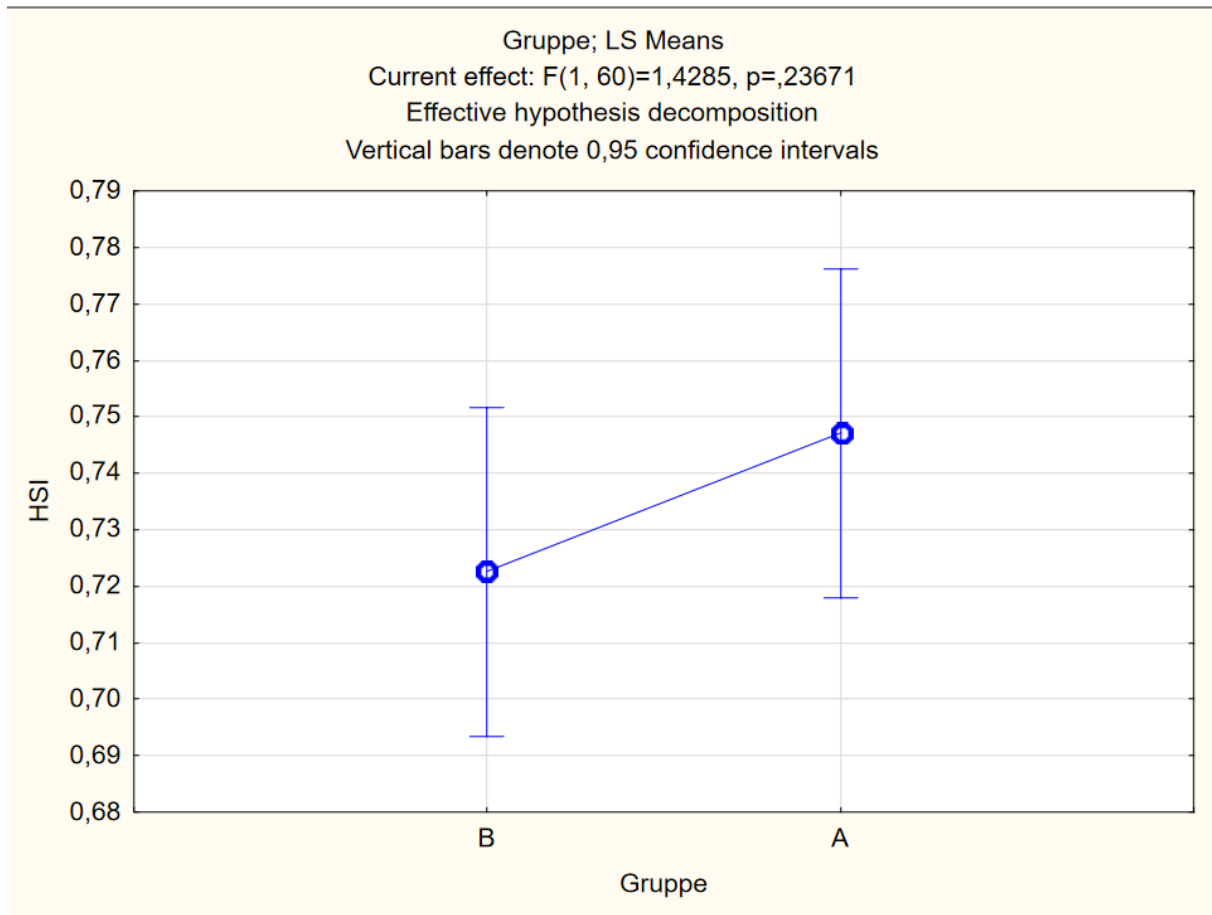
Tukey HSD test; variable SGR (Spreadsheets55)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = ,01459, df = 29,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 A	,42824	,47704
2	Kontroll A	0,270273	

## 7.2.2 Statistikk for organindekser

### HSI

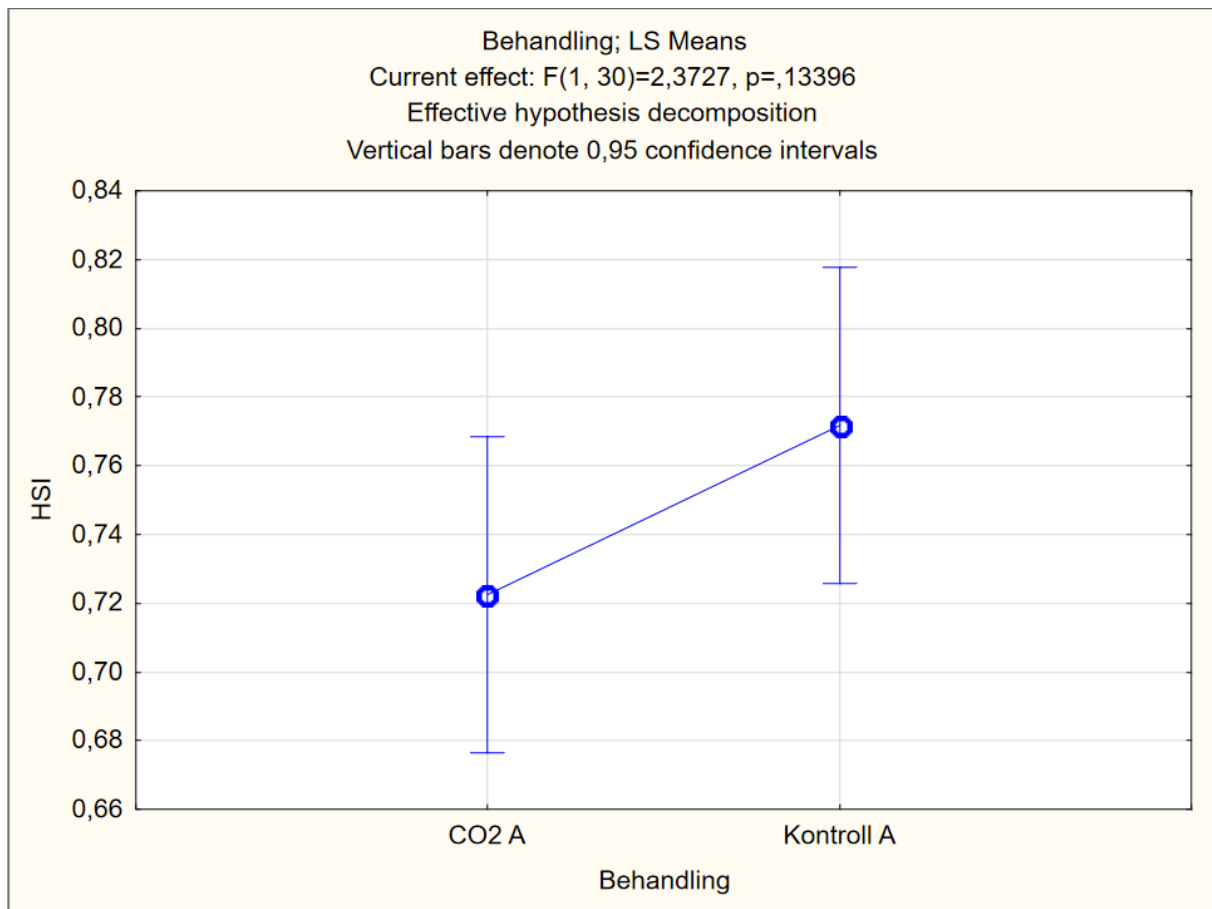
Toveis ANOVA for HSI med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



Univariate Tests of Significance for HSI (Spreadsheet60)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>34,56055</b>	<b>1</b>	<b>34,56055</b>	<b>5107,914</b>	<b>0,000000</b>
Gruppe	0,00967	1	0,00967	1,429	0,236705
Behandling	0,01759	1	0,01759	2,600	0,112137
Gruppe*Behandling	0,00404	1	0,00404	0,598	0,442528
Error	0,40596	60	0,00677		

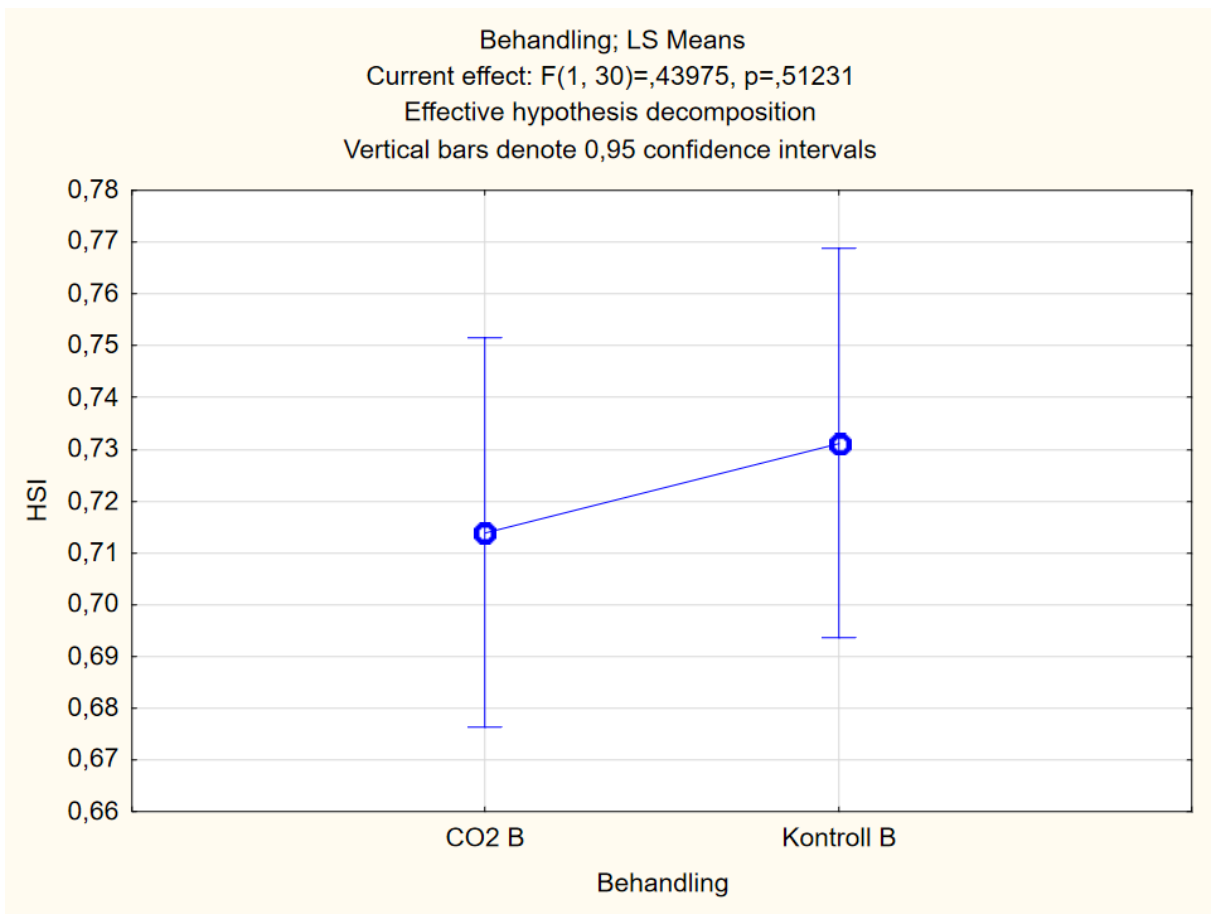


Enveis ANOVA for HSI mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable HSI (Spreadsheet23)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00811, df = 30,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 A		0,134098	
2	Kontroll A	0,134098		

Enveis ANOVA for HSI mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test

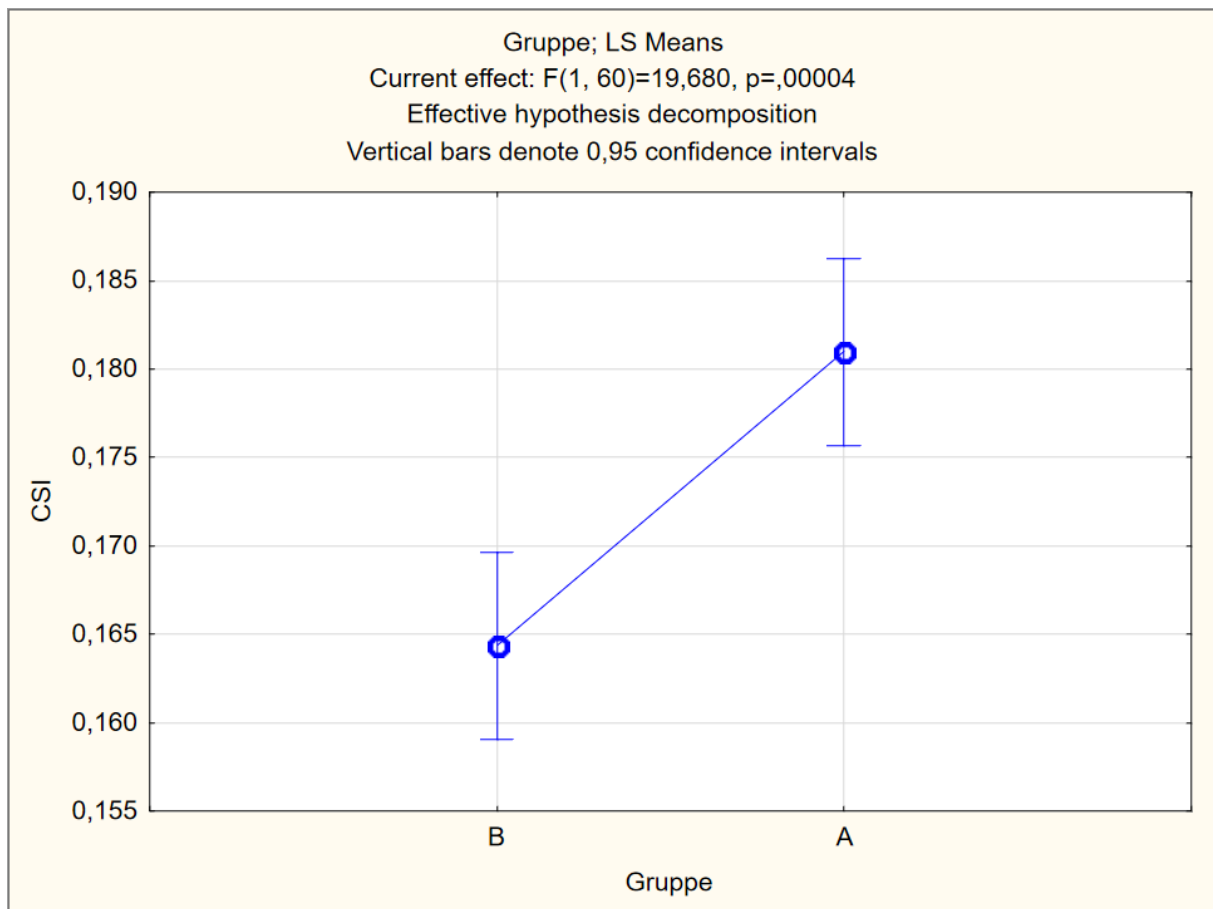


Tukey HSD test; variable HSI (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = ,00542, df = 30,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 B	,71393	,73119
2	Kontroll B	0,512441	0,512441

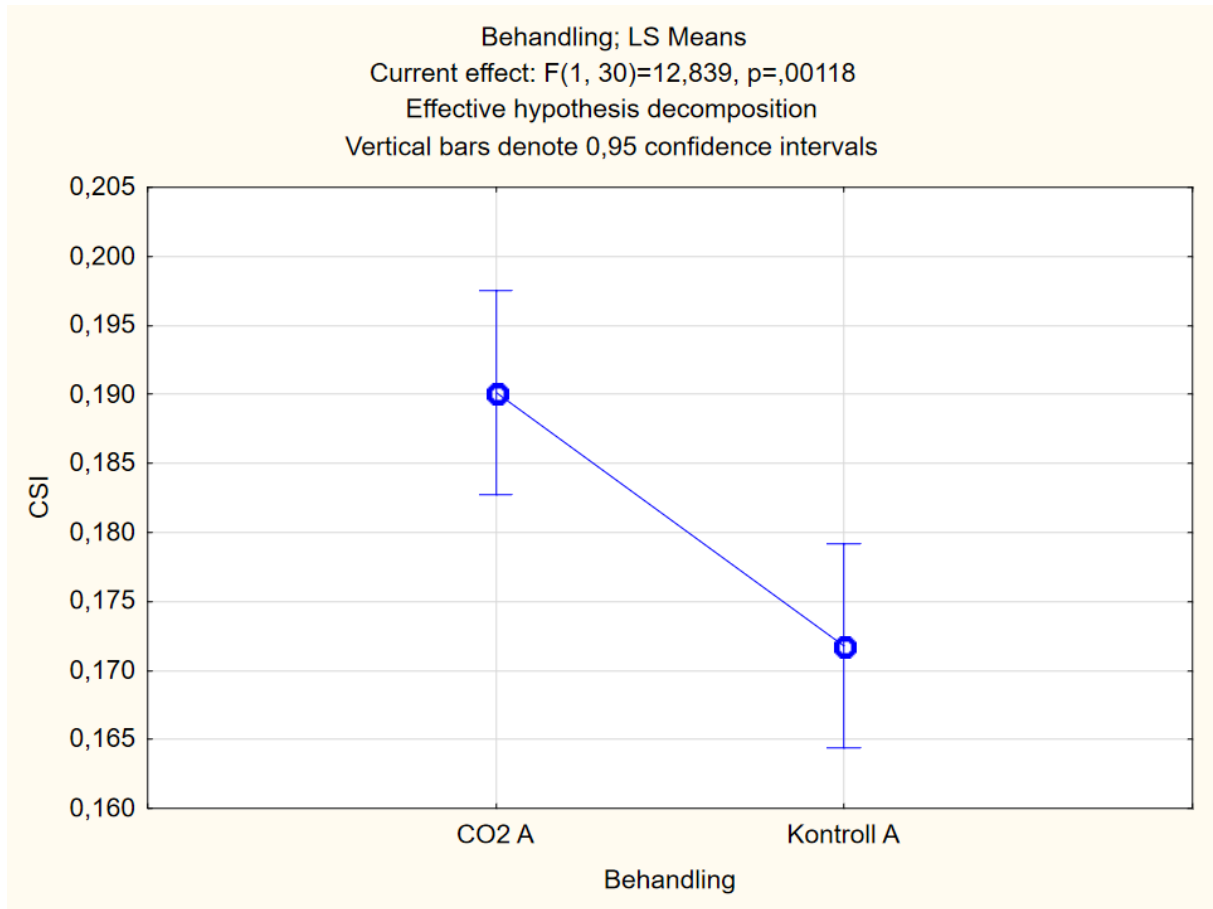
# CSI

Toveis ANOVA for CSI med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



Univariate Tests of Significance for CSI (Spreadsheet23)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	1,908199	1	1,908199	8499,387	0,000000
Gruppe	0,004418	1	0,004418	19,680	0,000040
Behandling	0,001468	1	0,001468	6,538	0,013104
Gruppe*Behandling	0,001227	1	0,001227	5,465	0,022755
Error	0,013471	60	0,000225		

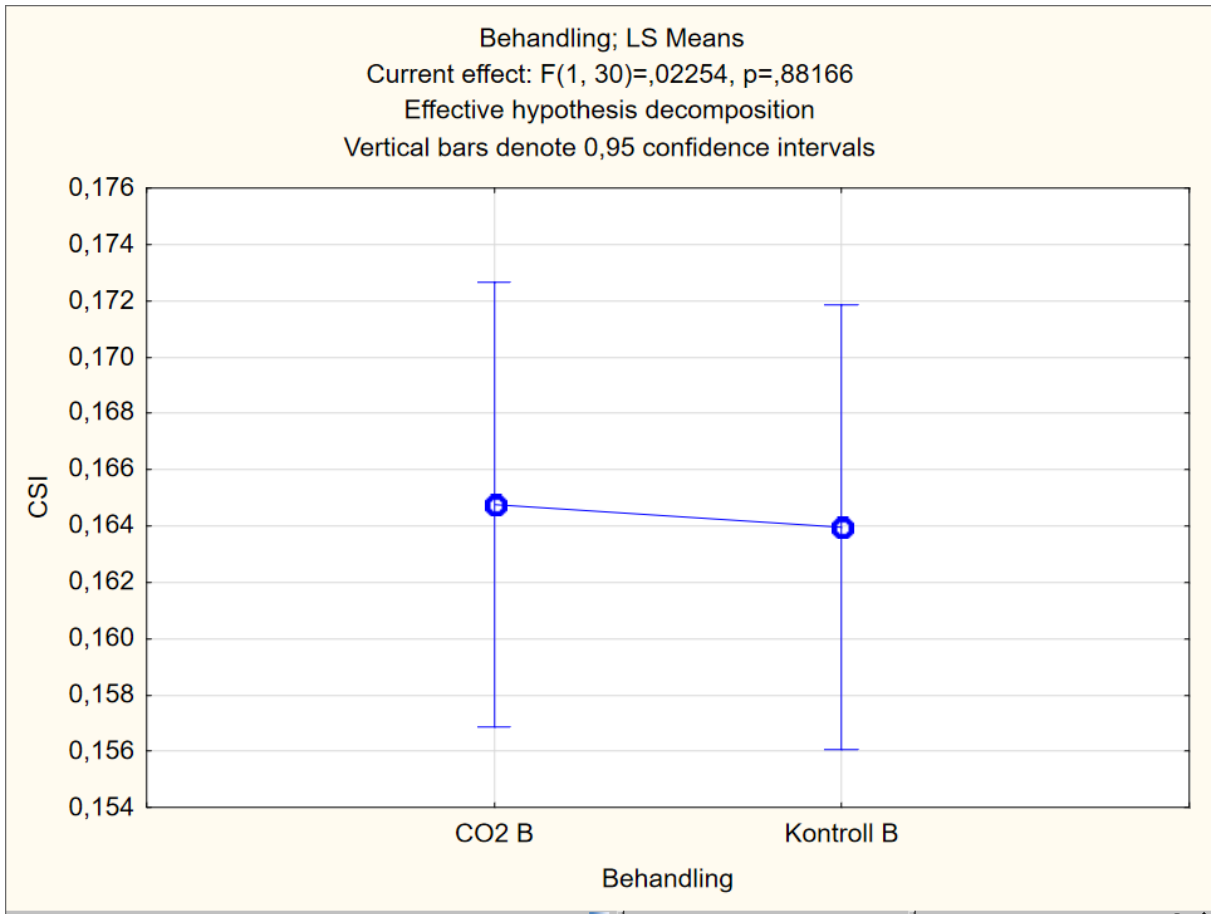
Enveis ANOVA for CSI mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable CSI (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = ,00021, df = 30,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 A	,19015	,17181
2	Kontroll A	0,001319	0,001319

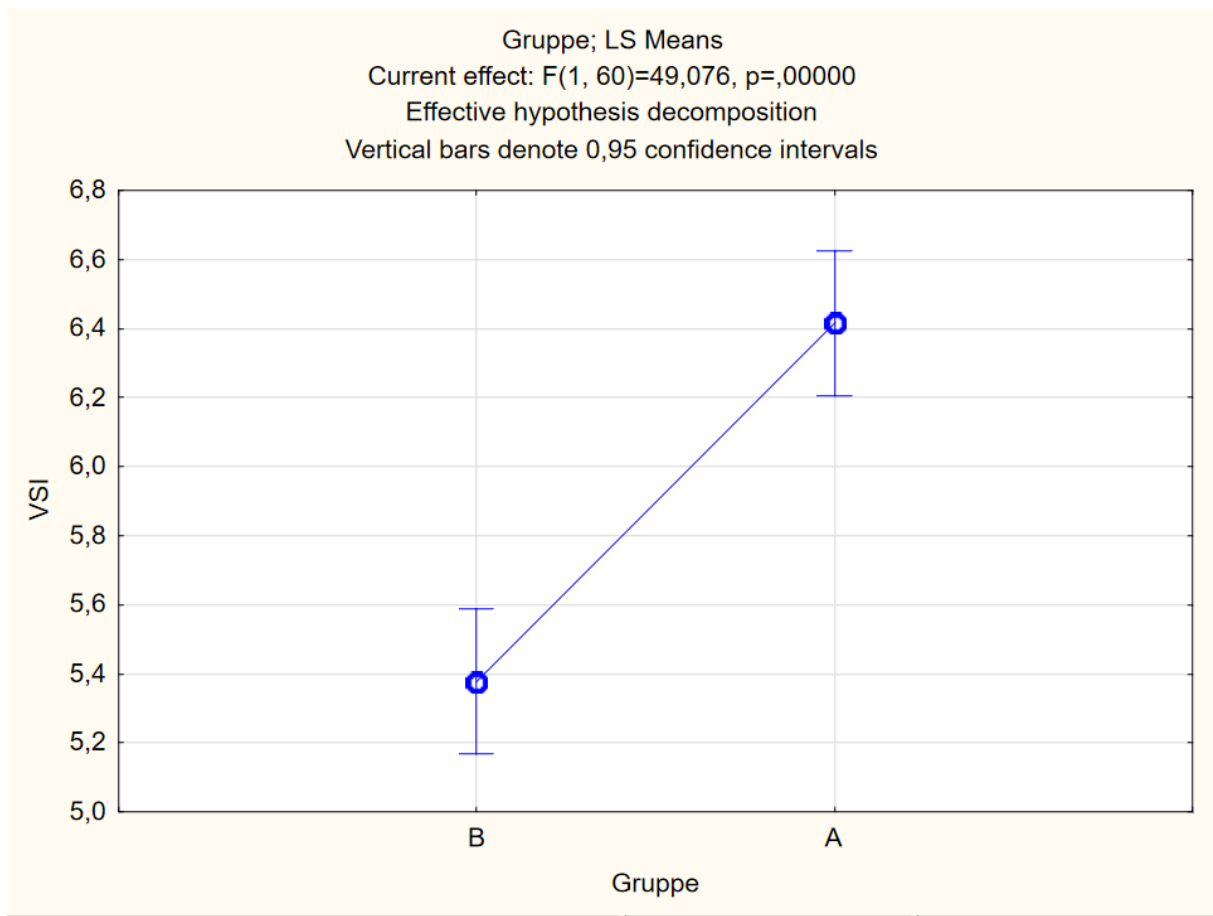
Enveis ANOVA for CSI mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable CSI (Spreadsheet23)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00024, df = 30,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 B		0,881760	
2	Kontroll B	0,881760		

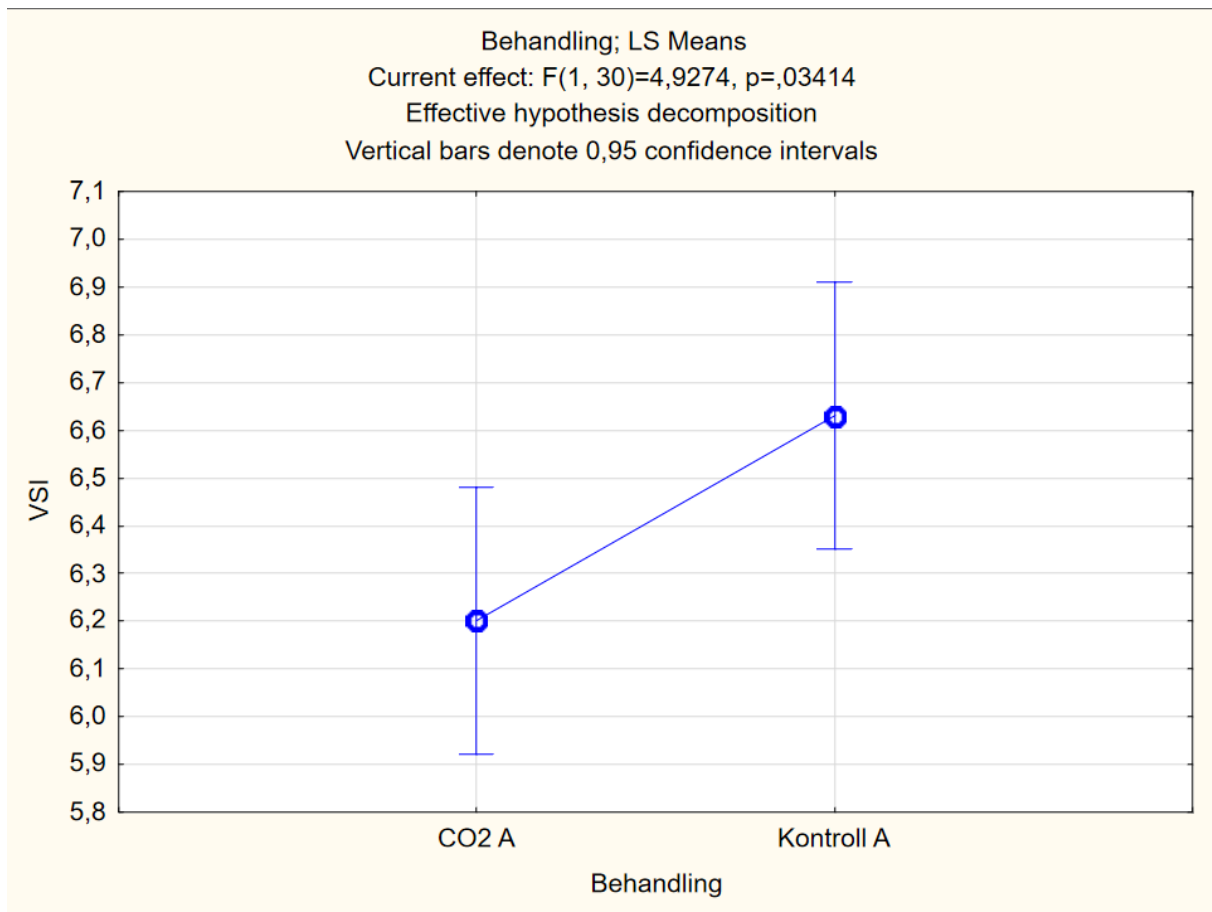
# VSI

Toveis ANOVA for VSI med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



Univariate Tests of Significance for VSI (Spreadsheet23)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2225,550</b>	<b>1</b>	<b>2225,550</b>	<b>6334,567</b>	<b>0,000000</b>
Gruppe	17,242	1	17,242	49,076	0,000000
Behandling	1,592	1	1,592	4,532	0,037381
Gruppe*Behandling	0,209	1	0,209	0,595	0,443377
Error	21,080	60	0,351		

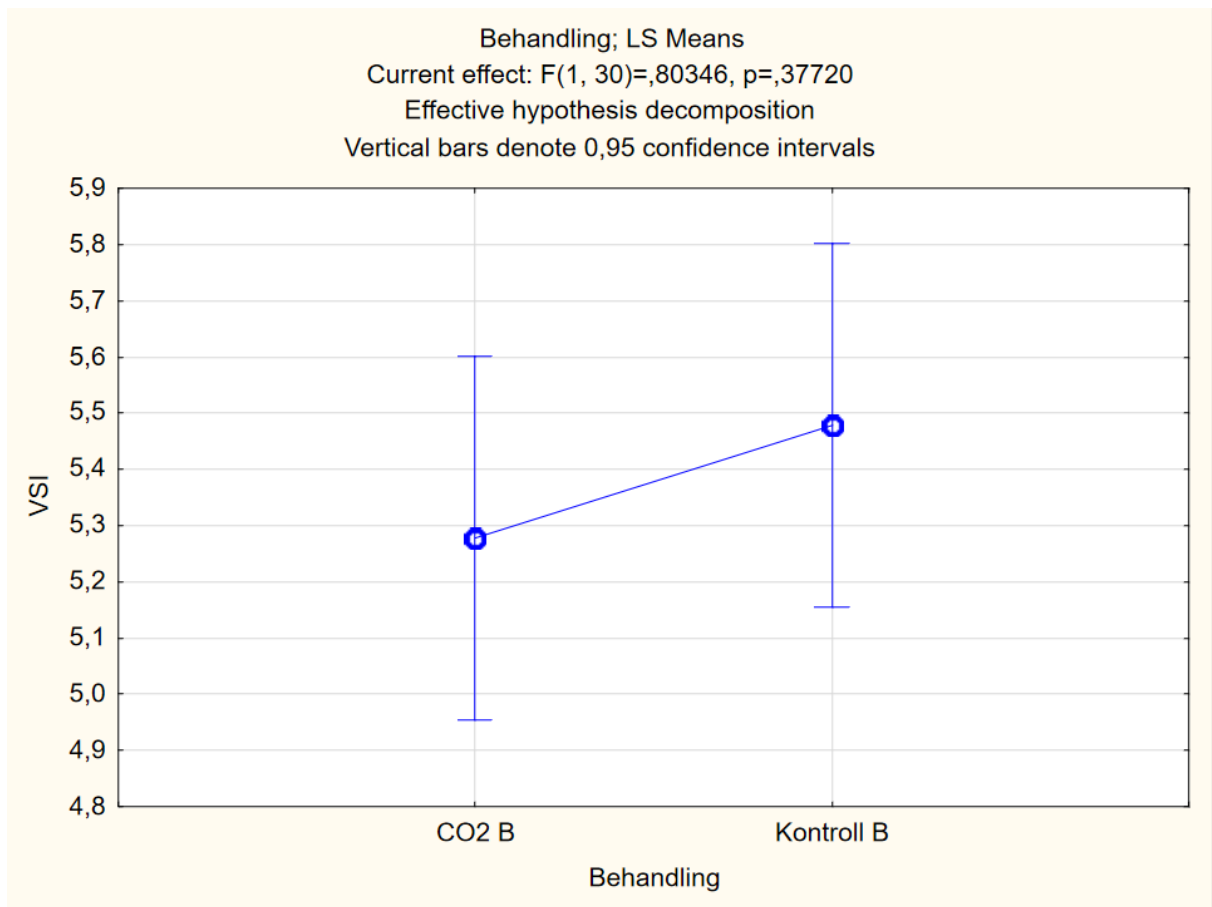
Enveis ANOVA for VSI mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable VSI (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = ,29992, df = 30,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}
		6,2011	6,6309
1	CO2 A		0,034256
2	Kontroll A	0,034256	

Enveis ANOVA for VSI mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test



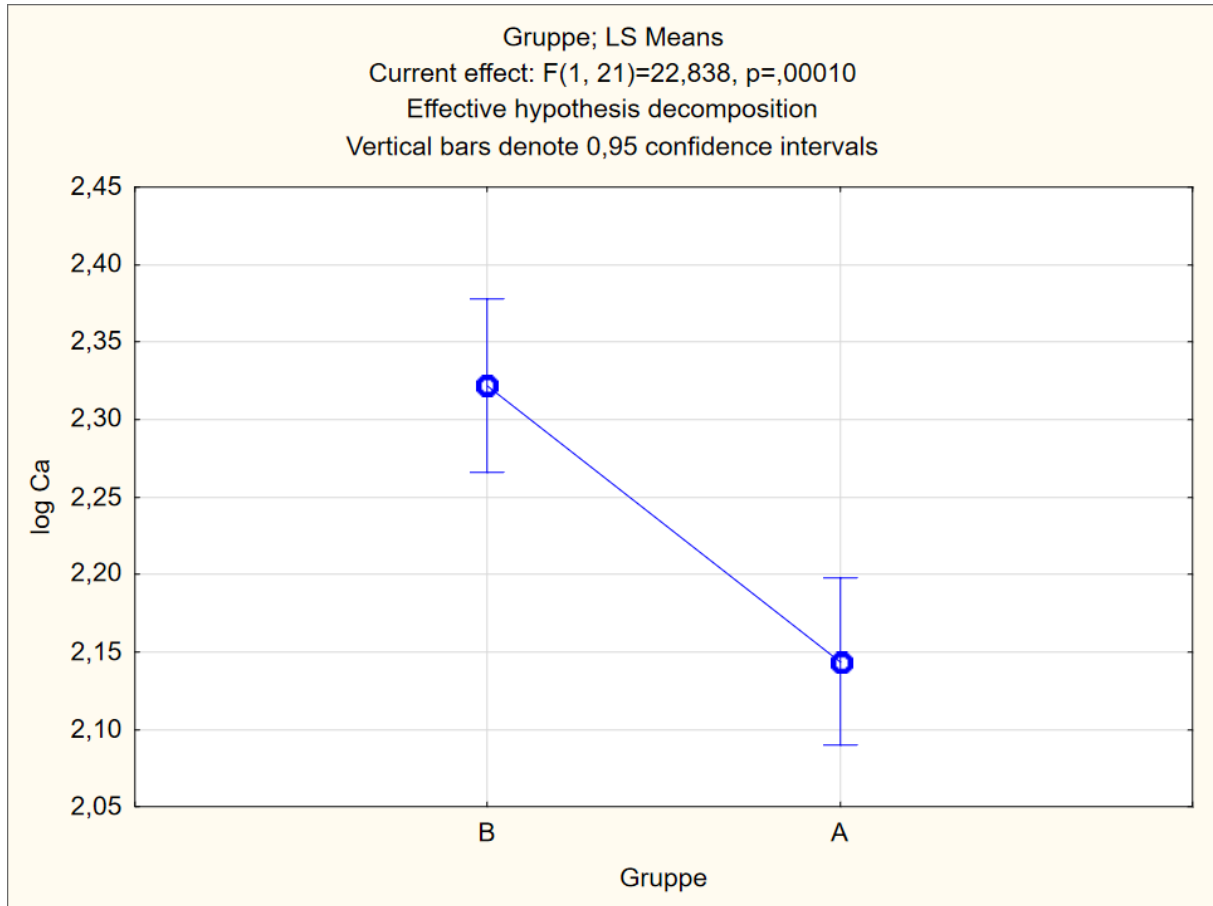
Tukey HSD test; variable VSI (Spreadsheet23) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,40275, df = 30,000			
Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 B		0,377366
2	Kontroll B	0,377366	



### 7.2.3 Statistikk for mineralanalyser

## Ca

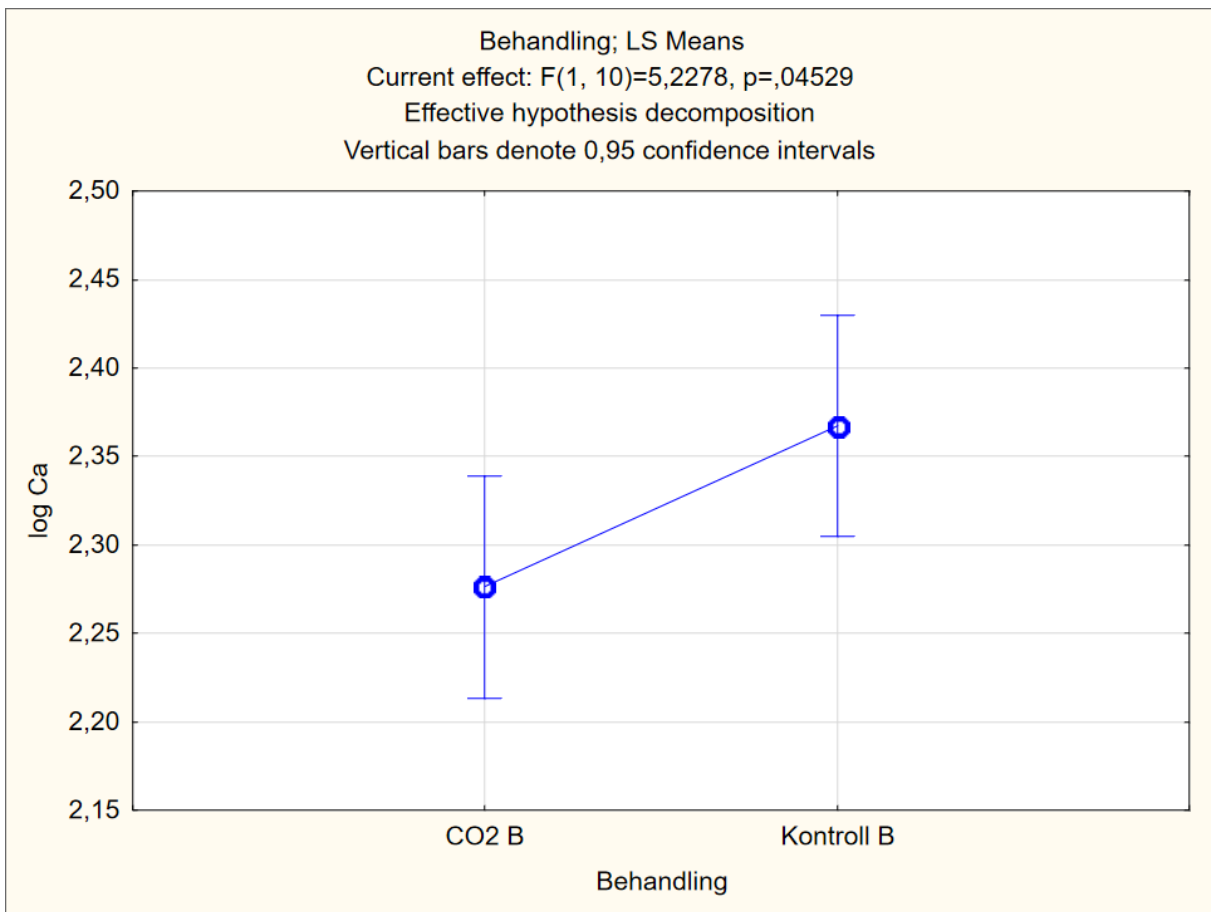
Toveis ANOVA for Ca med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



Univariate Tests of Significance for log Ca (Spreadsheet25)  
Sigma-restricted parameterization  
Effective hypothesis decomposition

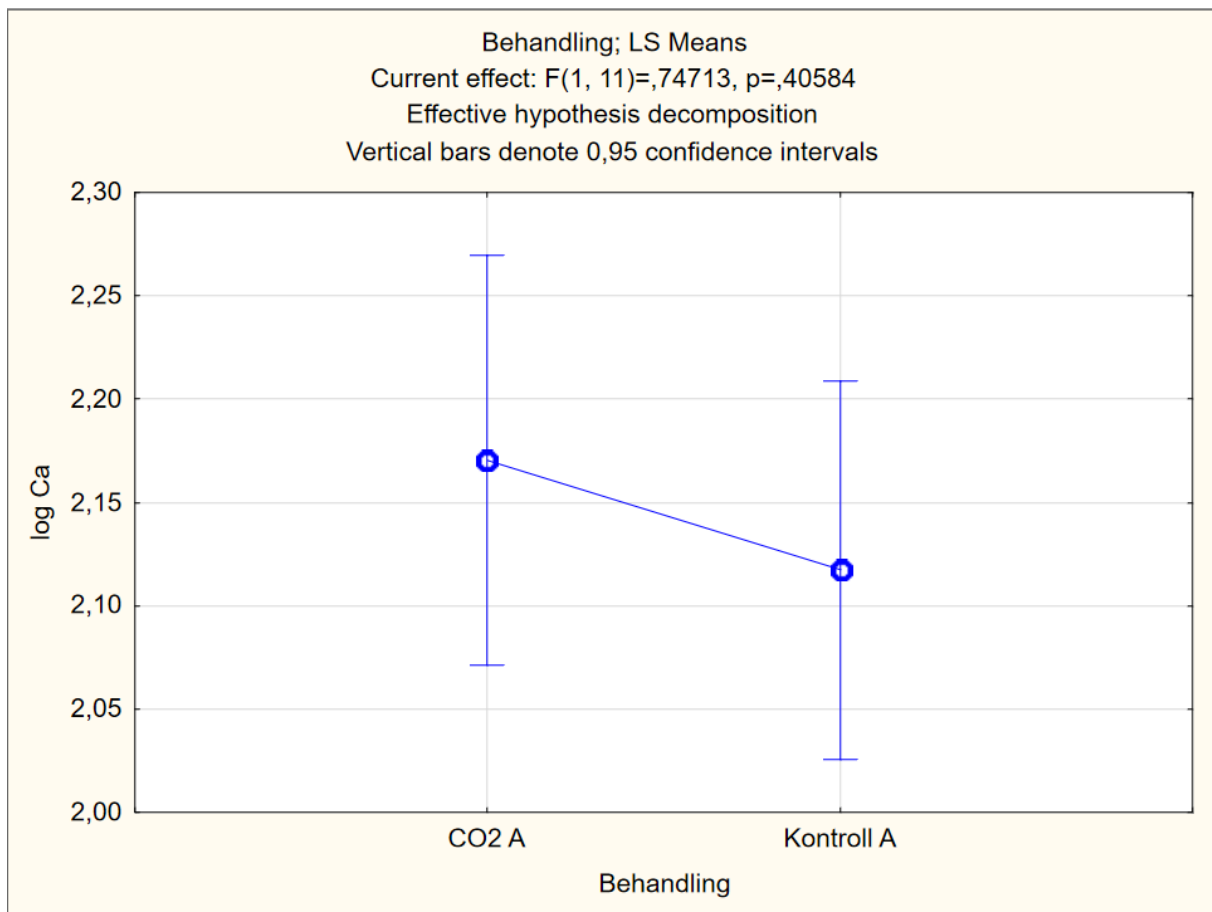
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>124,0789</b>	1	<b>124,0789</b>	<b>14358,38</b>	<b>0,000000</b>
Behandling	0,0023	1	0,0023	0,26	0,615003
<b>Gruppe</b>	<b>0,1974</b>	1	<b>0,1974</b>	<b>22,84</b>	<b>0,000101</b>
Behandling*Gruppe	0,0323	1	0,0323	3,74	0,066710
Error	0,1815	21	0,0086		

Enveis ANOVA for Ca mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable log Ca (Spreadsheet23)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00476, df = 10,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 B	2,2763	2,3674	
2	Kontroll B	0,045444		

Enveis ANOVA for Ca mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test

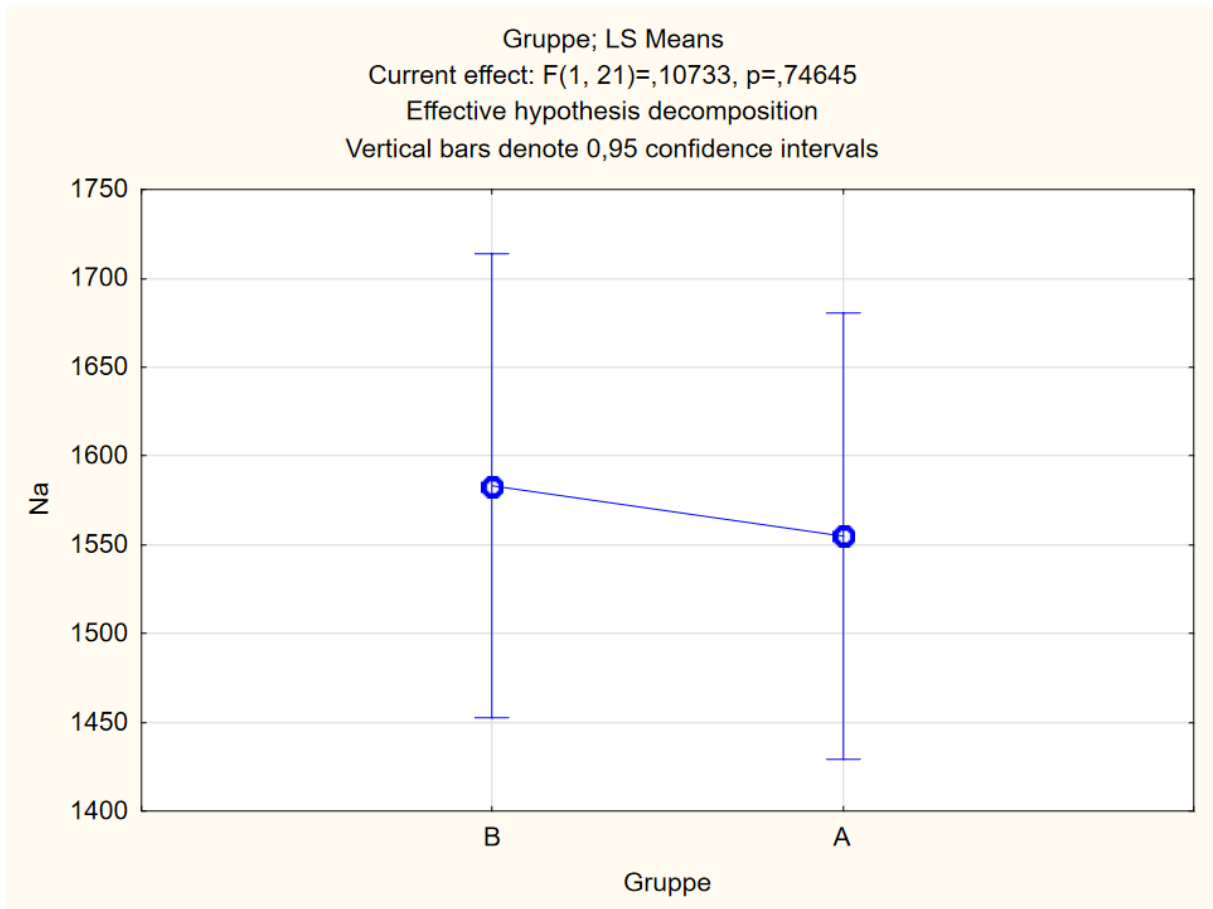


**Tukey HSD test; variable log Ca (Spreadsheet23)**  
**Approximate Probabilities for Post Hoc Tests**  
 Error: Between MS = ,01217, df = 11,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 A	2,1703	2,1172
2	Kontroll A	0,406036	0,406036

Na

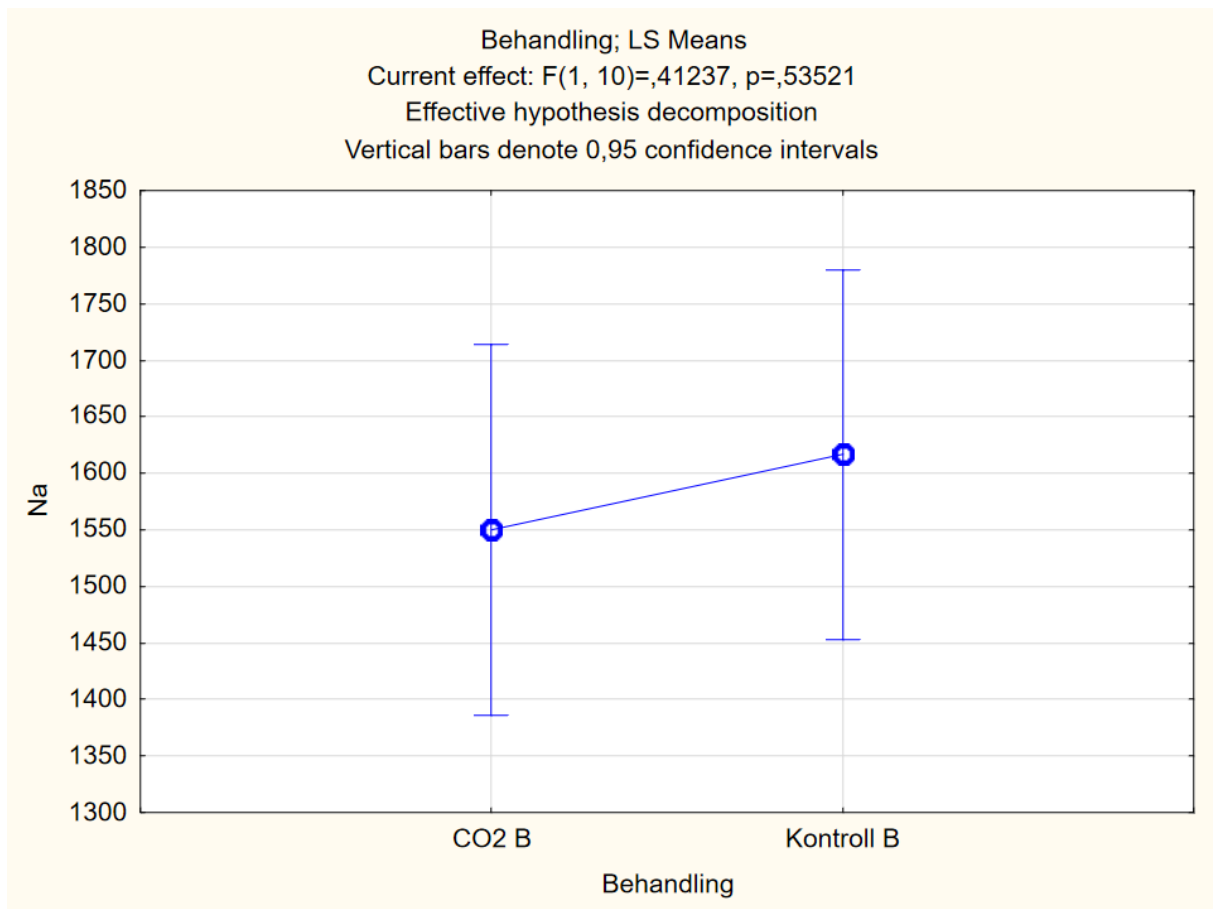
Toveis ANOVA for Na med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



Univariate Tests of Significance for Na (Spreadsheet25)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

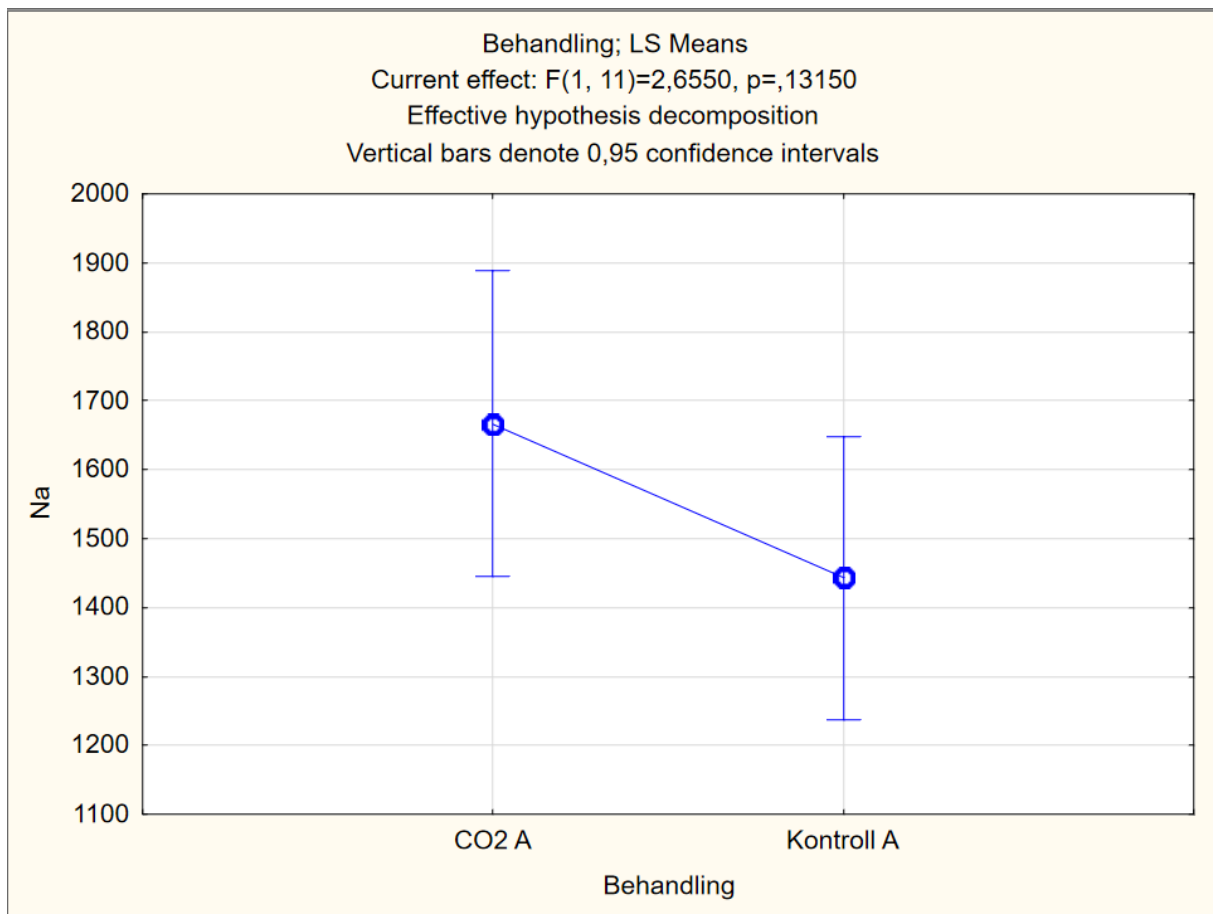
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>61274215</b>	<b>1</b>	<b>61274215</b>	<b>1294,774</b>	<b>0,000000</b>
Handling	38413	1	38413	0,812	0,377837
Gruppe	5079	1	5079	0,107	0,746447
Handling*Gruppe	131252	1	131252	2,773	0,110688
Error	993810	21	47324		

Enveis ANOVA for Na mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable Na (Spreadsheet23)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 32333,, df = 10,000			
Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 B	1550,0	1616,7
2	Kontroll B	0,535381	0,535381

Enveis ANOVA for Na mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable Na (Spreadsheets23)			
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests			
Error: Between MS = 60952,, df = 11,000			
Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 A	1666,7	0,131663
2	Kontroll A	1442,9	0,131663

# K

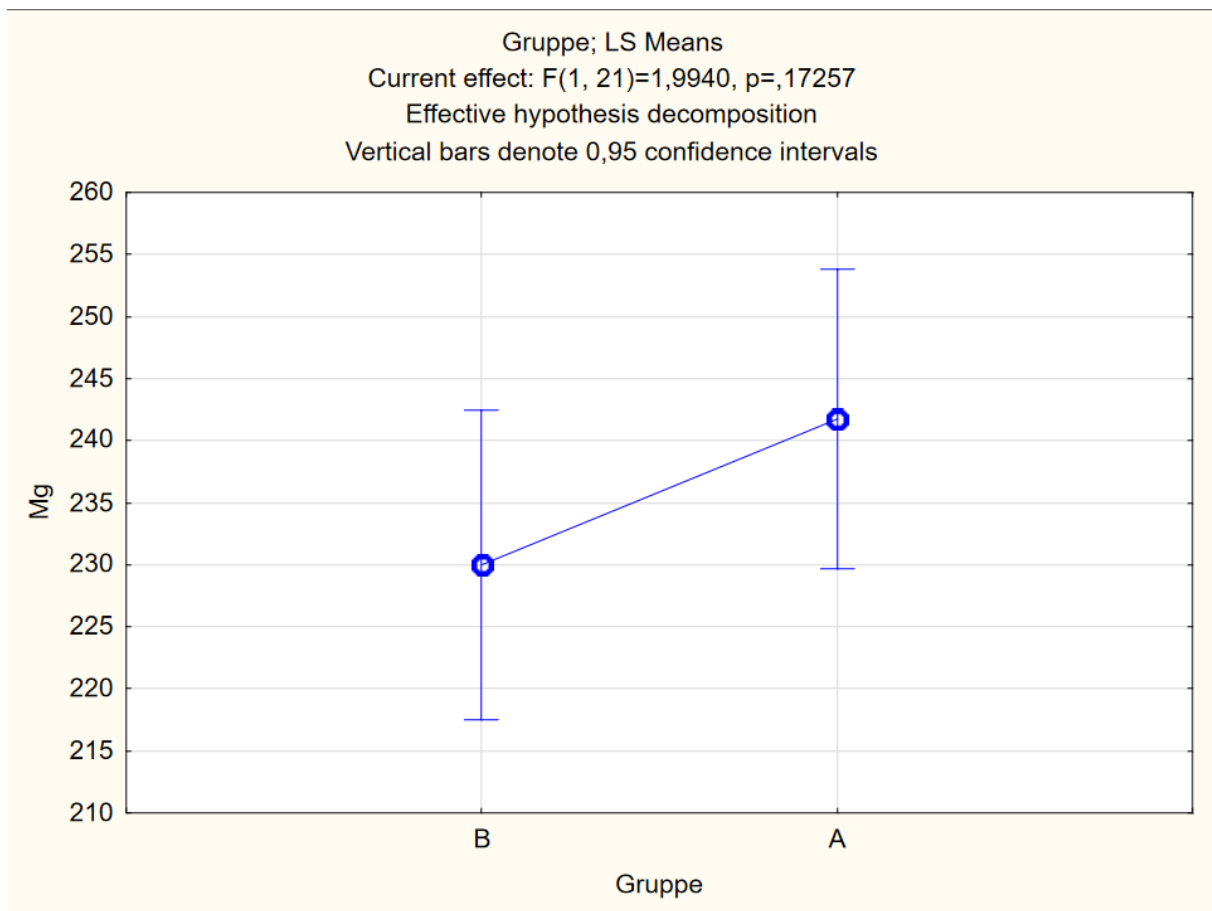
Kruskal-Wallis test for kalium innhold i nyren ved sluttuttaket.

Dependent: K		Median Test, Overall Median = 3750,00; K (Spreadsheet23) Independent (grouping) variable: Behandling Chi-Square = 1,333333 df = 1 p = ,2482		
		CO2 B	Kontroll B	Total
<b>&lt;= Median: observed</b>		2,00000	4,00000	6,00000
expected		3,00000	3,00000	
obs.-exp.		-1,00000	1,00000	
<b>&gt; Median: observed</b>		4,00000	2,00000	6,00000
expected		3,00000	3,00000	
obs.-exp.		1,00000	-1,00000	
<b>Total: observed</b>		6,00000	6,00000	12,00000

Dependent: K		Median Test, Overall Median = 4100,00; K (Spreadsheet64) Independent (grouping) variable: Behandling Chi-Square = ,6267857 df = 1 p = ,4285		
		CO2 A	Kontroll A	Total
<b>&lt;= Median: observed</b>		3,000000	5,000000	8,000000
expected		3,692308	4,307692	
obs.-exp.		-0,692308	0,692308	
<b>&gt; Median: observed</b>		3,000000	2,000000	5,000000
expected		2,307692	2,692308	
obs.-exp.		0,692308	-0,692308	
<b>Total: observed</b>		6,000000	7,000000	13,000000

# Mg

Toveis ANOVA for Mg med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B

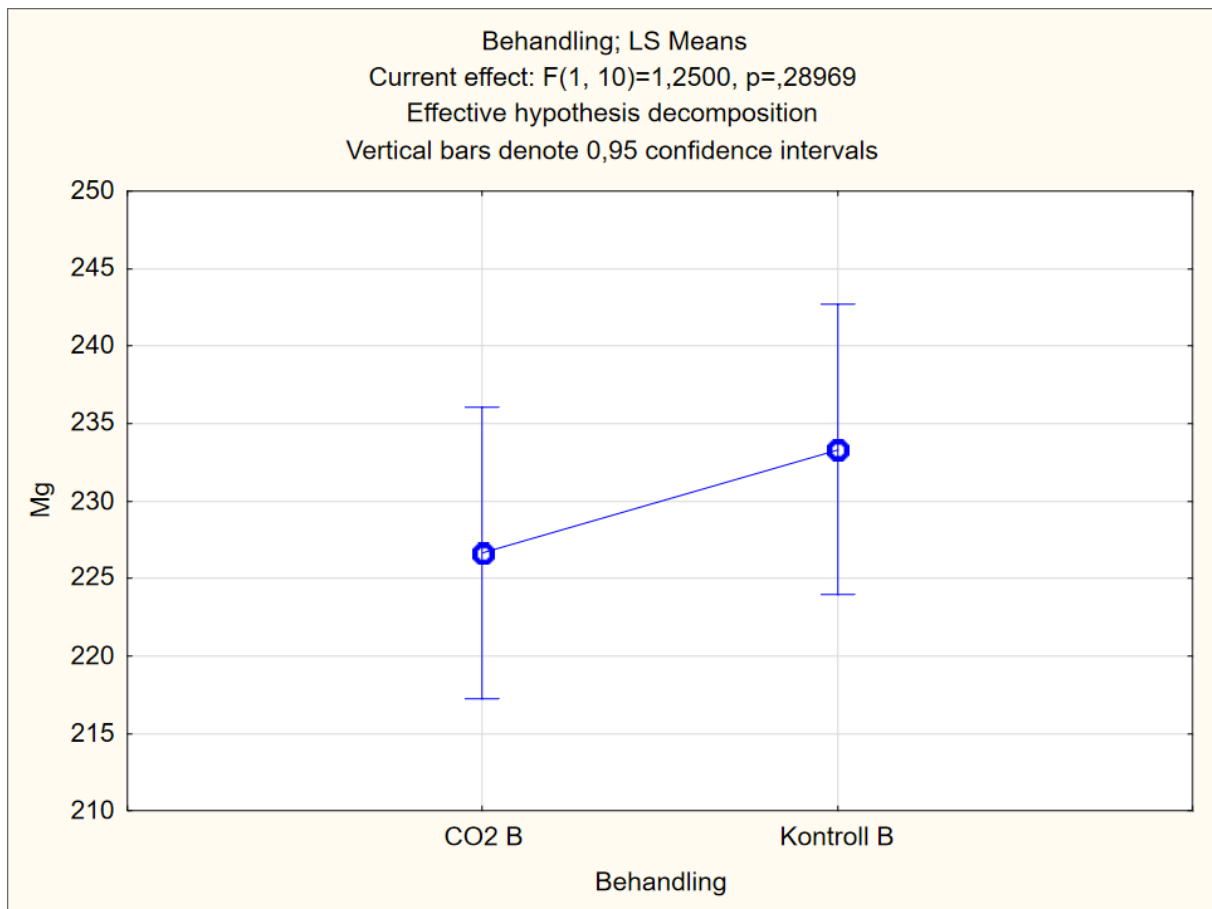


Univariate Tests of Significance for Mg (Spreadsheet25)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>1384953</b>	<b>1</b>	<b>1384953</b>	<b>3195,210</b>	<b>0,000000</b>
Behandling	0	1	0	0,000	0,988754
Gruppe	864	1	864	1,994	0,172573
Behandling*Gruppe	267	1	267	0,615	0,441512
Error	9102	21	433		



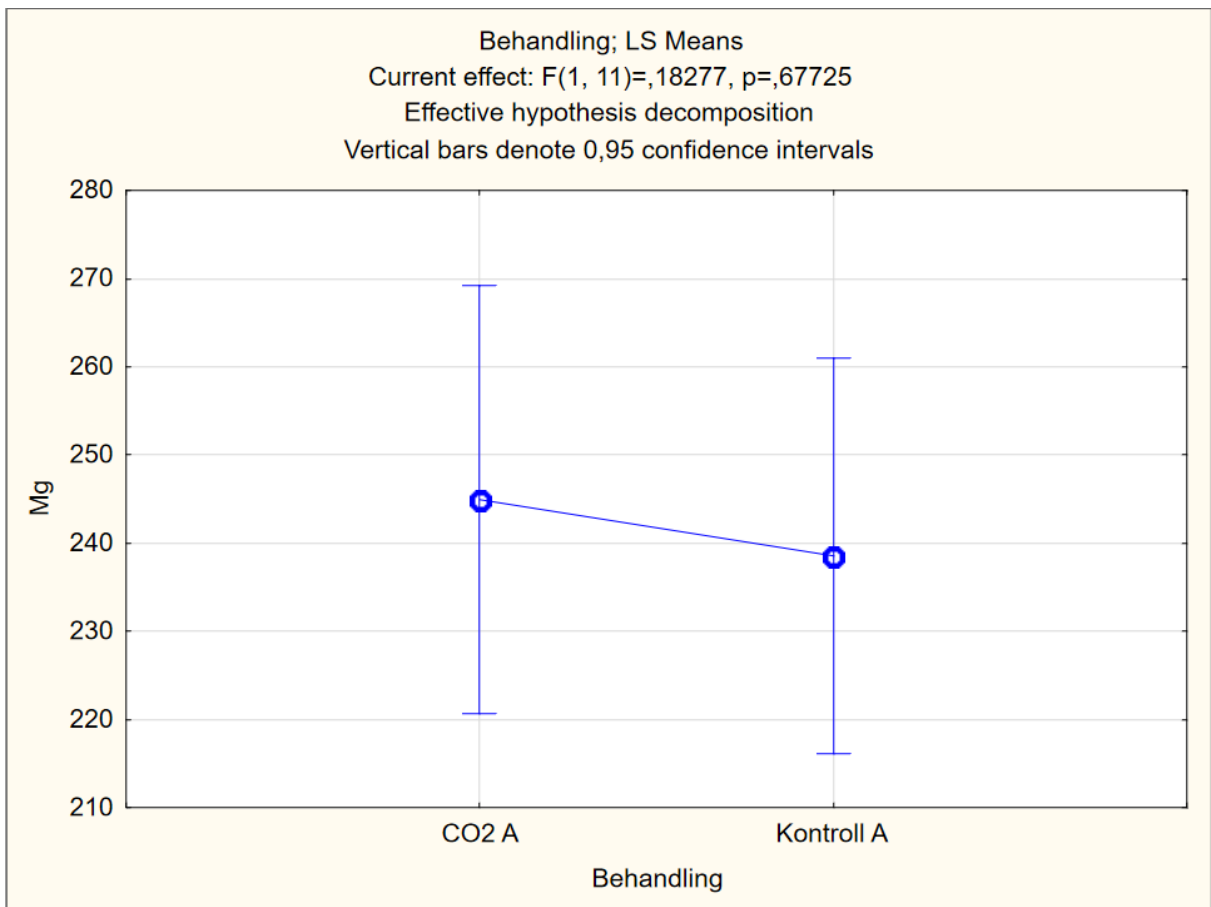
Enveis ANOVA for Mg mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable Mg (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 106,67, df = 10,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}
1	CO2 B	226,67	233,33
2	Kontroll B	0,289828	0,289828

Enveis ANOVA for Mg mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable Mg (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 730,52, df = 11,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 A	245,00	238,57	
2	Kontroll A	0,677405		

# P

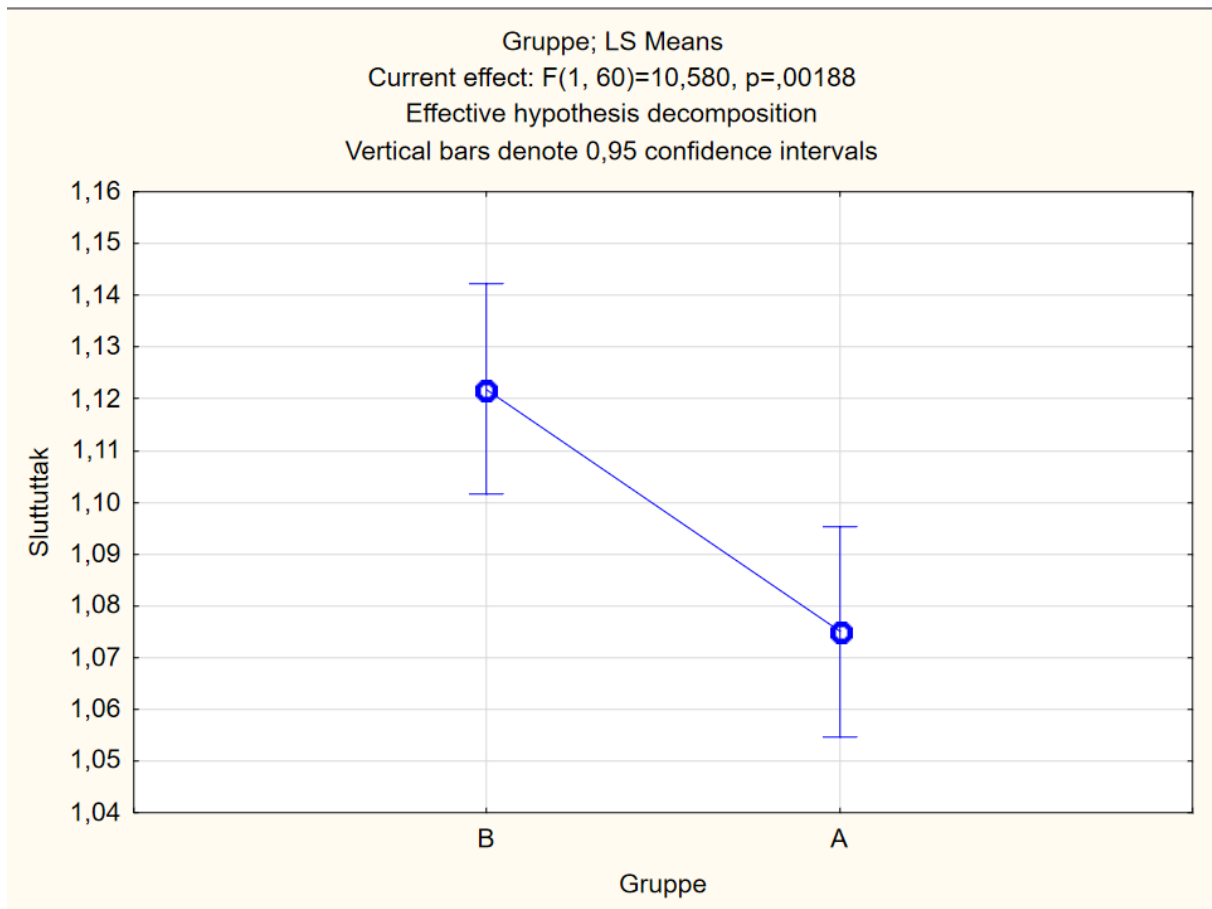
Kruskal-Wallis test for fosforinnhold i nyren ved sluttuttaket.

Dependent: P		Median Test, Overall Median = 3450,00; P (Spreadsheet23) Independent (grouping) variable: Behandling Chi-Square = 1,333333 df = 1 p = ,2482		
		CO2 B	Kontroll B	Total
<b>&lt;= Median: observed</b>		4,00000	2,00000	6,00000
	expected	3,00000	3,00000	
	obs.-exp.	1,00000	-1,00000	
<b>&gt; Median: observed</b>		2,00000	4,00000	6,00000
	expected	3,00000	3,00000	
	obs.-exp.	-1,00000	1,00000	
	<b>Total: observed</b>	6,00000	6,00000	12,00000

Dependent: P		Median Test, Overall Median = 3600,00; P (Spreadsheet23) Independent (grouping) variable: Behandling Chi-Square = ,0663265 df = 1 p = ,7968		
		CO2 A	Kontroll A	Total
<b>&lt;= Median: observed</b>		3,000000	4,000000	7,00000
	expected	3,230769	3,769231	
	obs.-exp.	-0,230769	0,230769	
<b>&gt; Median: observed</b>		3,000000	3,000000	6,00000
	expected	2,769231	3,230769	
	obs.-exp.	0,230769	-0,230769	
	<b>Total: observed</b>	6,000000	7,000000	13,00000

## 7.2.4 Statistikk for k faktor

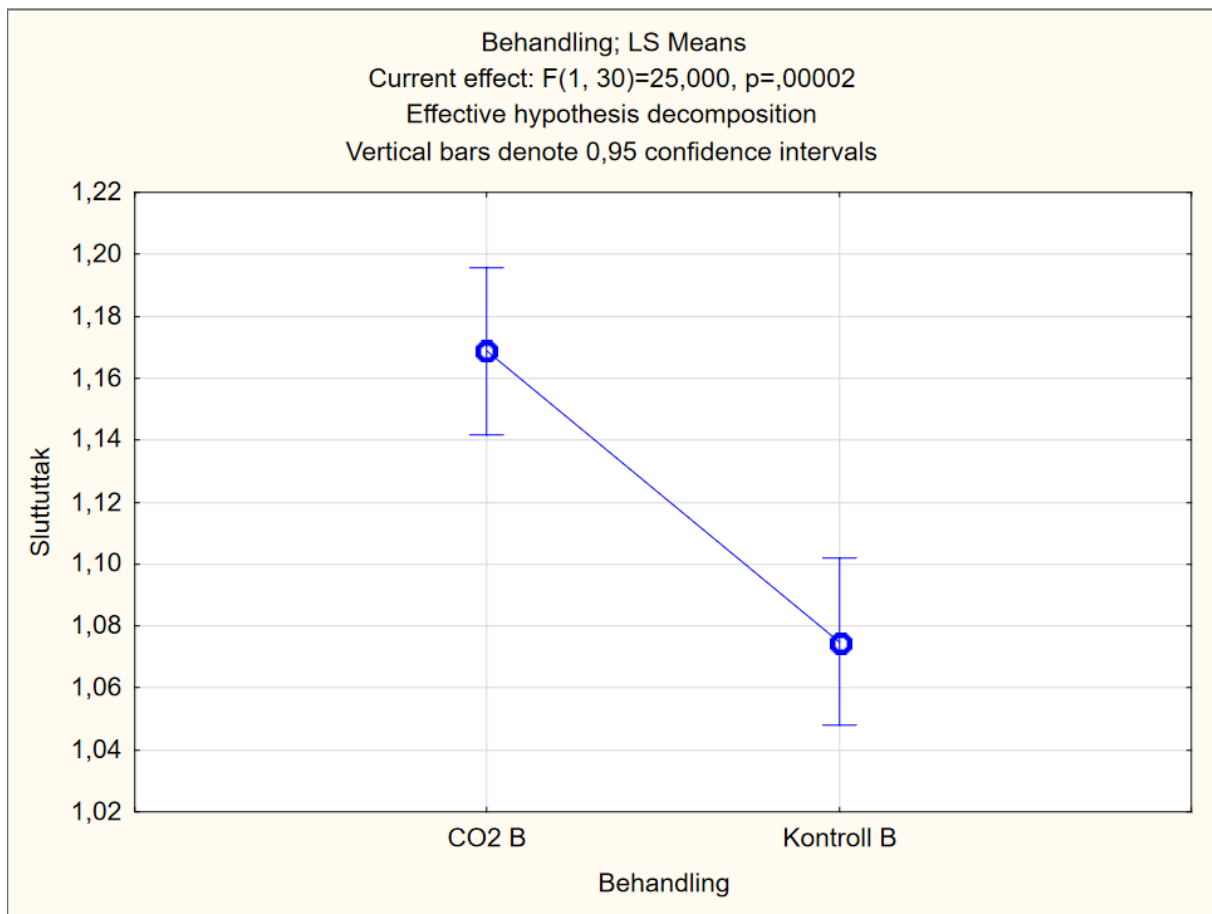
Toveis ANOVA for K faktor med Univariate tests of significance for gruppe A mot gruppe B



Univariate Tests of Significance for Sluttuttak (Spreadsheet32)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

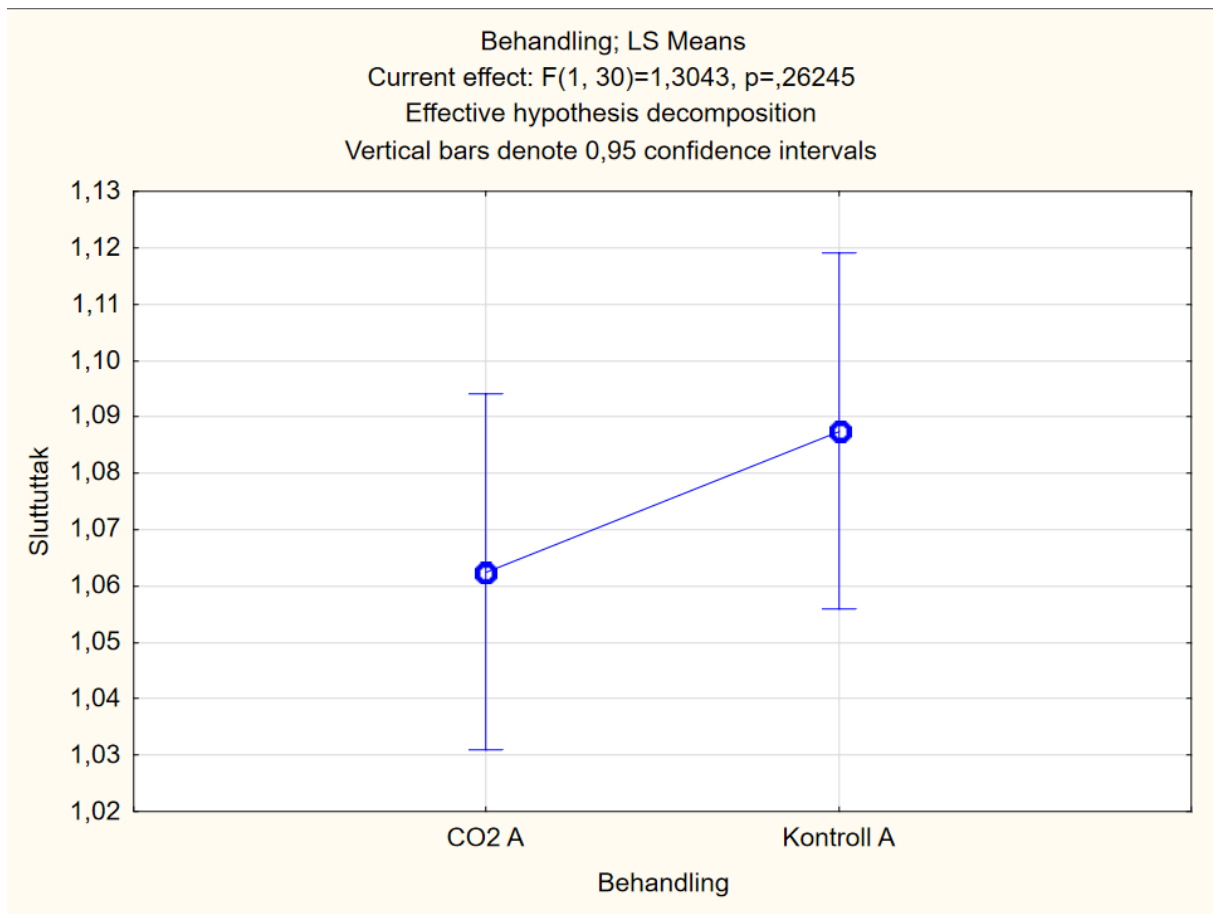
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	77,22016	1	77,22016	23238,67	0,000000
Behandling	0,01891	1	0,01891	5,69	0,020240
Gruppe	0,03516	1	0,03516	10,58	0,001879
Behandling*Gruppe	0,05641	1	0,05641	16,97	0,000118
Error	0,19938	60	0,00332		

Enveis ANOVA for k faktor mellom CO<sub>2</sub> B og kontroll B med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable Sluttuttak (Spreadsheet51)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00281, df = 30,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 B	1,1688	1,0750	
2	Kontroll B	0,000157	0,000157	

Enveis ANOVA for k faktor mellom CO<sub>2</sub> A og kontroll A med post hoc Tukey test



Tukey HSD test; variable Sluttuttak (Spreadsheet51)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00383, df = 30,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	
1	CO2 A	1,0625	1,0875	
2	Kontroll A	0,262577	0,262577	

## 7.3 Statistikk forsøk 2

### 7.3.1 Statistikk for prevalens av NK

Chi-square test for forskjell i prevalens av NK i CO<sub>2</sub> fiskene mot kontrollfiskene.

Chi-square score:   
DF:

Significance Level:

- 0.01  
 0.05  
 0.10

The P-Value is .000013. The result is significant at  $p < .05$ .

Chi-square test for forskjell I prevalens av NK i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> fiskene mot kontrollfiskene.

Chi-square score:   
DF:

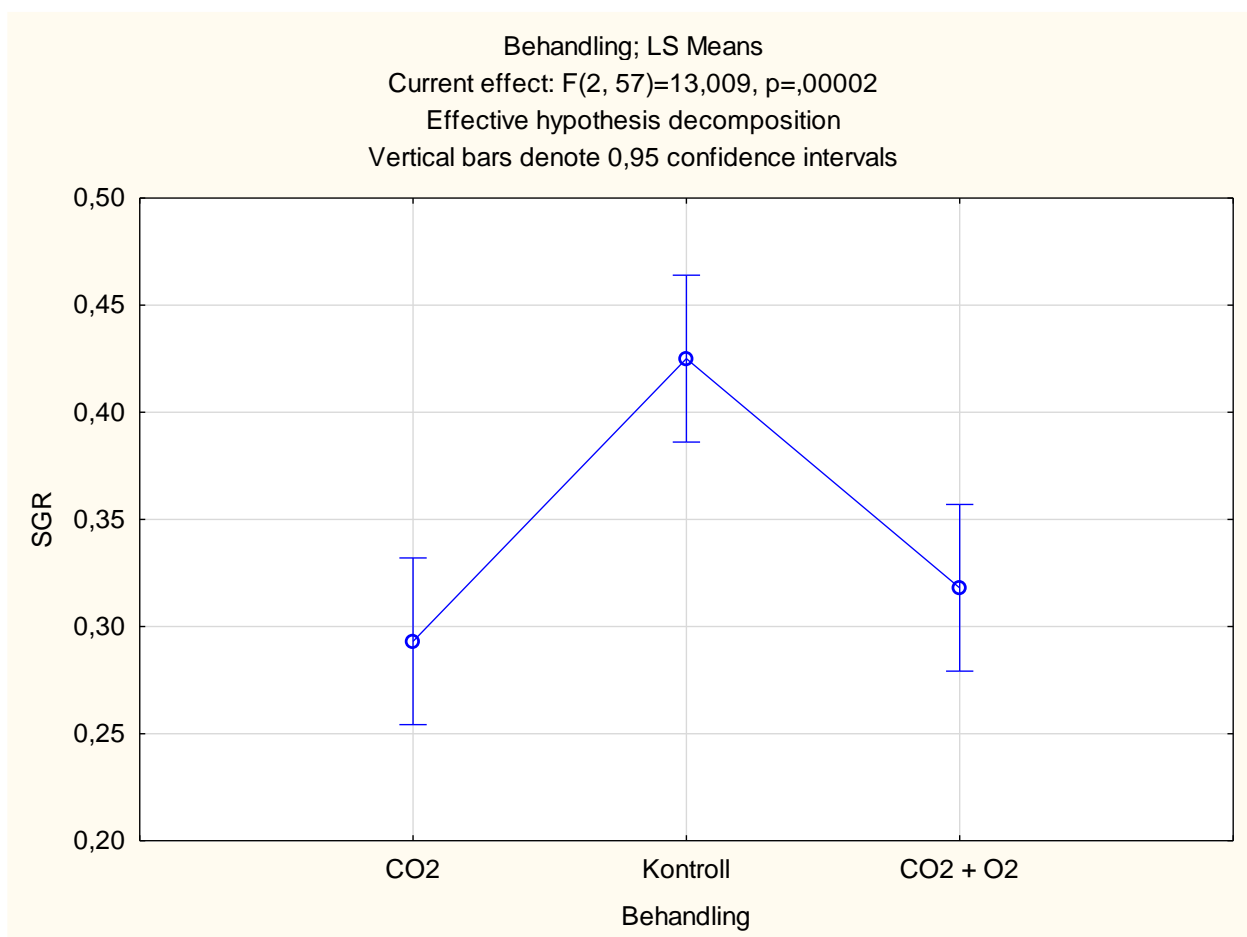
Significance Level:

- 0.01  
 0.05  
 0.10

The P-Value is  $< .00001$ . The result is significant at  $p < .05$ .

### 7.3.2 Statistikk for vekst

Enveis ANOVA og post hoc Tukey test for SGR fra 0-uttaket til sluttuttaket, CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> testet mot kontroll.



Viser en veis ANOVA graf for vekstrate i forsøk 2, der avhengig variabel er satt som SGR innhold, og uavhengig variabel er satt som behandlingsmetode.

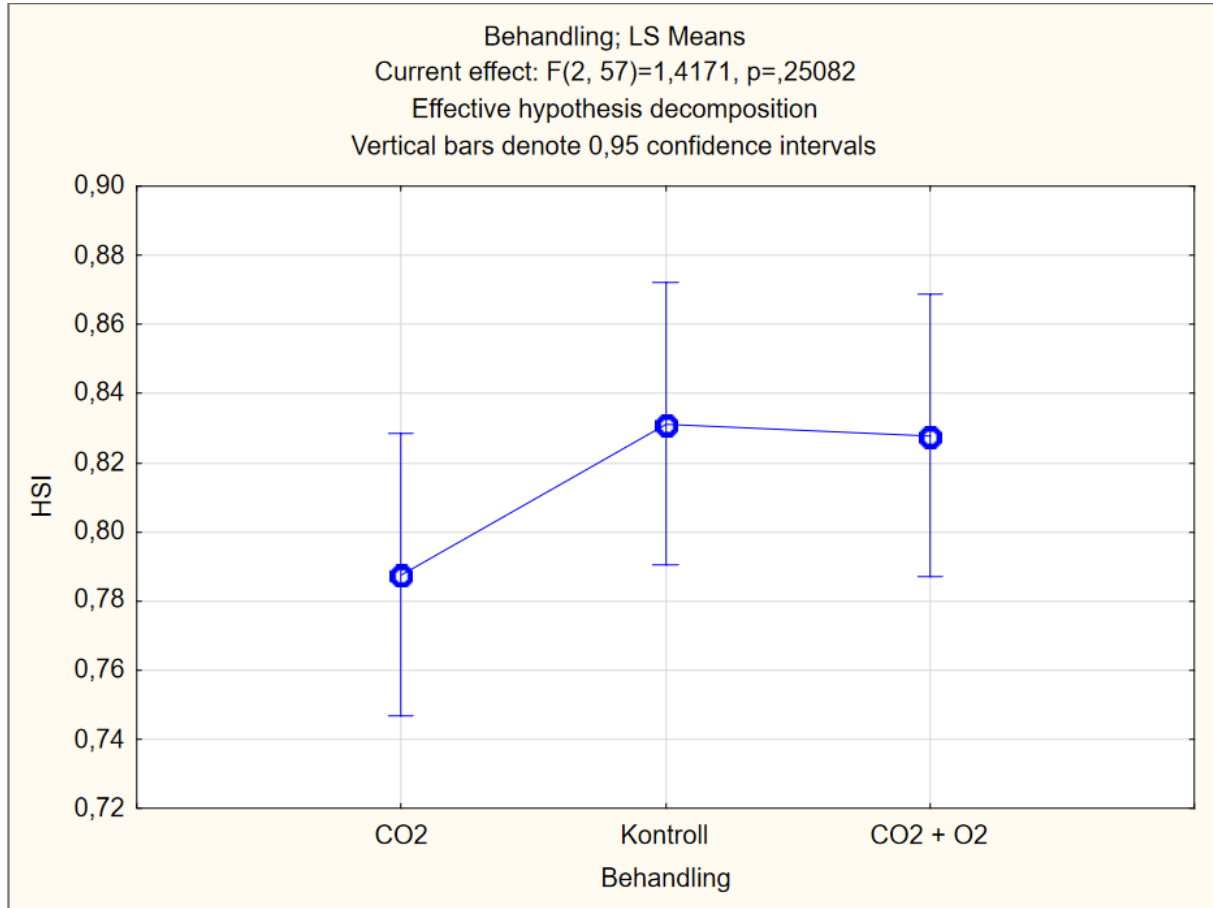
Tukey HSD test; variable SGR (Spreadsheet29)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00756, df = 57,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}
1	CO2	,29311	,42507	,31807
2	Kontroll	0,000149		0,000862
3	CO2 + O2	0,637456	0,000862	



### 7.3.3 Statistikk for organindekser

## HSI

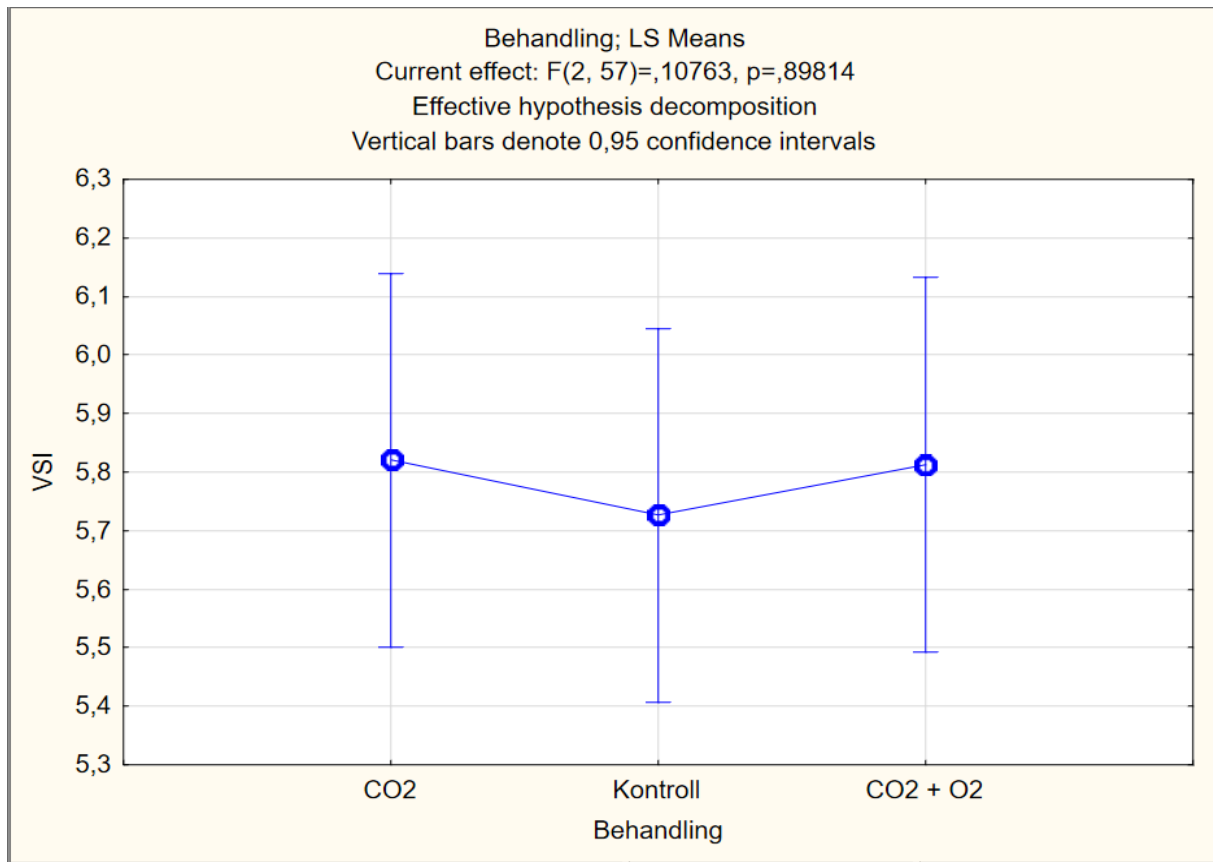
Enveis ANOVA og Kruskal-Wallis test for HSI ved sluttuttaket.



		Median Test, Overall Median = -,08799; log10 HSI (Spreadsheet43) Independent (grouping) variable: Behandling Chi-Square = 1,200000 df = 2 p = ,5488			
Dependent: log10 HSI		CO2	Kontroll	CO2 + O2	Total
<= Median:	observed	11,00000	8,00000	11,00000	30,00000
	expected	10,00000	10,00000	10,00000	
	obs.-exp.	1,00000	-2,00000	1,00000	
> Median:	observed	9,00000	12,00000	9,00000	30,00000
	expected	10,00000	10,00000	10,00000	
	obs.-exp.	-1,00000	2,00000	-1,00000	
Total: observed		20,00000	20,00000	20,00000	60,00000

# VSI

Enveis ANOVA, Univariate test of significance og post hoc Tukey test for VSI ved sluttuttaket.



Univariate Tests of Significance for VSI (Spreadsheet49.sta)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

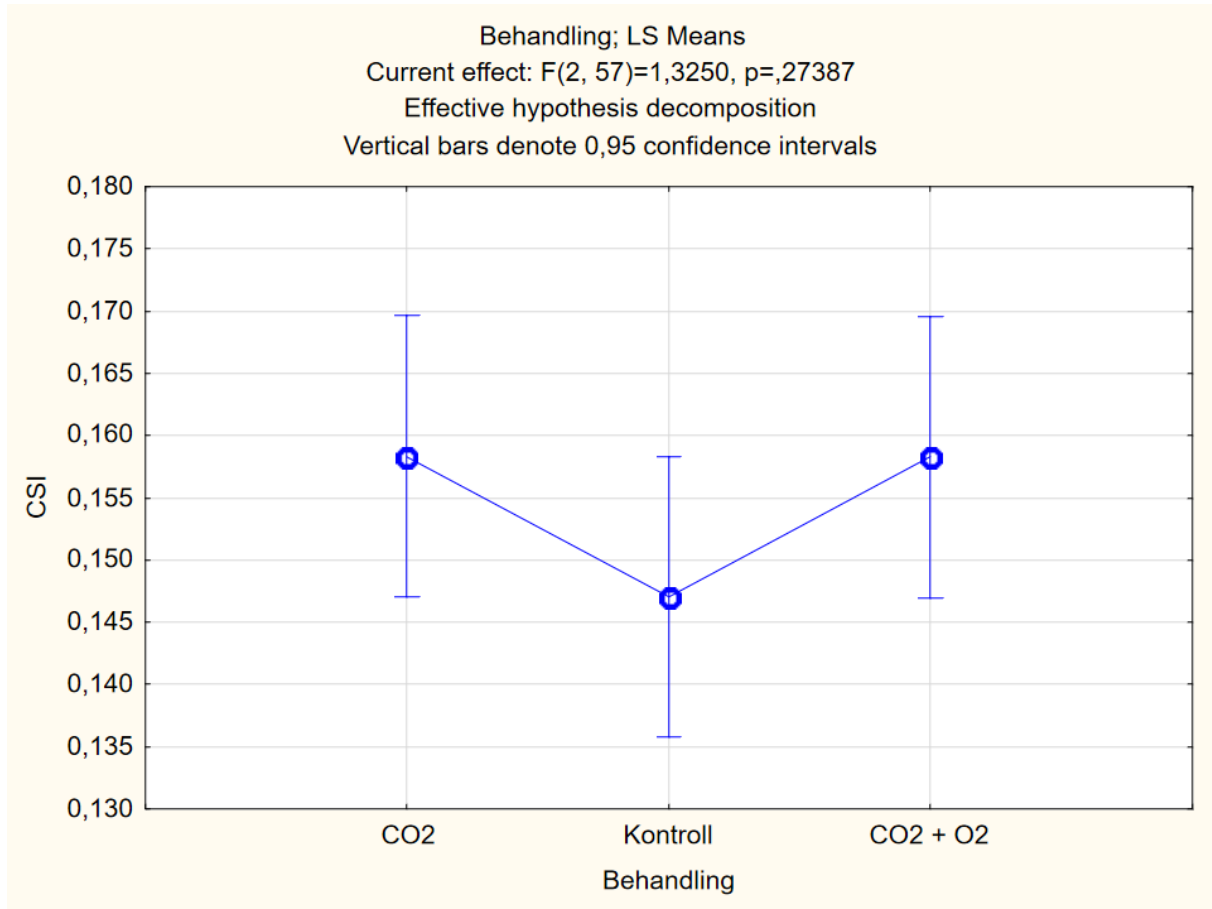
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2008,798</b>	<b>1</b>	<b>2008,798</b>	<b>3949,776</b>	<b>0,000000</b>
Behandling	0,109	2	0,055	0,108	0,898139
Error	28,989	57	0,509		

Tukey HSD test; variable VSI (Spreadsheet29)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = ,50859, df = 57,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}
		5,8203	5,7259	5,8124
<b>1</b>	<b>CO2</b>		0,908331	0,999420
<b>2</b>	<b>Kontroll</b>	0,908331		0,922459
<b>3</b>	<b>CO2 + O2</b>	0,999420	0,922459	

# CSI

Enveis ANOVA, Univariate test of significance og post hoc Tukey test for CSI ved sluttuttaket.



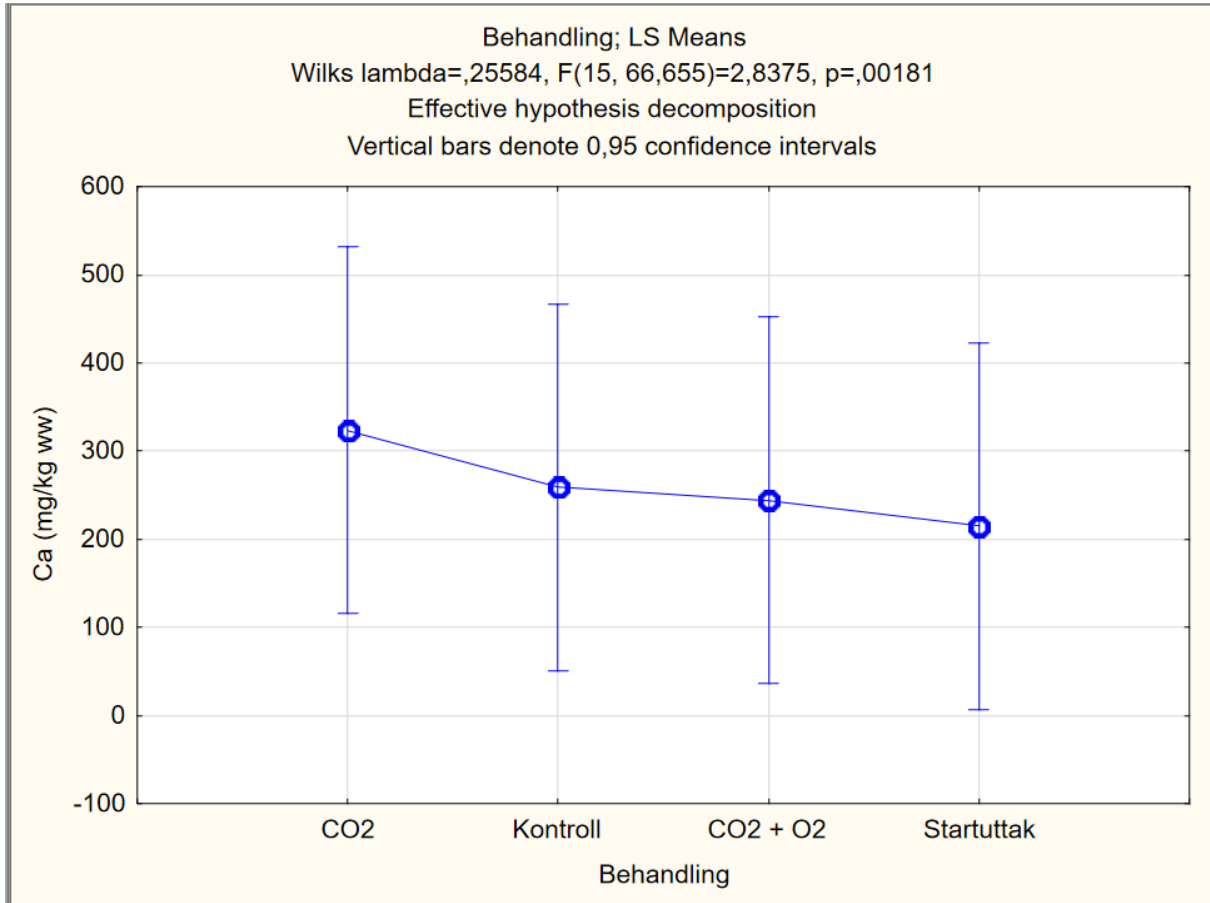
Univariate Tests of Significance for CSI (Spreadsheet35)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,432936	1	1,432936	2250,323	0,000000
Behandling	0,001687	2	0,000844	1,325	0,273873
Error	0,036296	57	0,000637		

Tukey HSD test; variable CSI (Spreadsheet29)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00064, df = 57,000				
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}
1	CO2	,15832	0,340821	0,999971
2	Kontroll	0,340821		0,344789
3	CO2 + O2	0,999971	0,344789	

### 7.3.4 Statistikk for mineralanalyser

## Ca

Enveis ANOVA og post hoc Tukey test for kalsiuminnhold i nyre ved sluttuttaket.

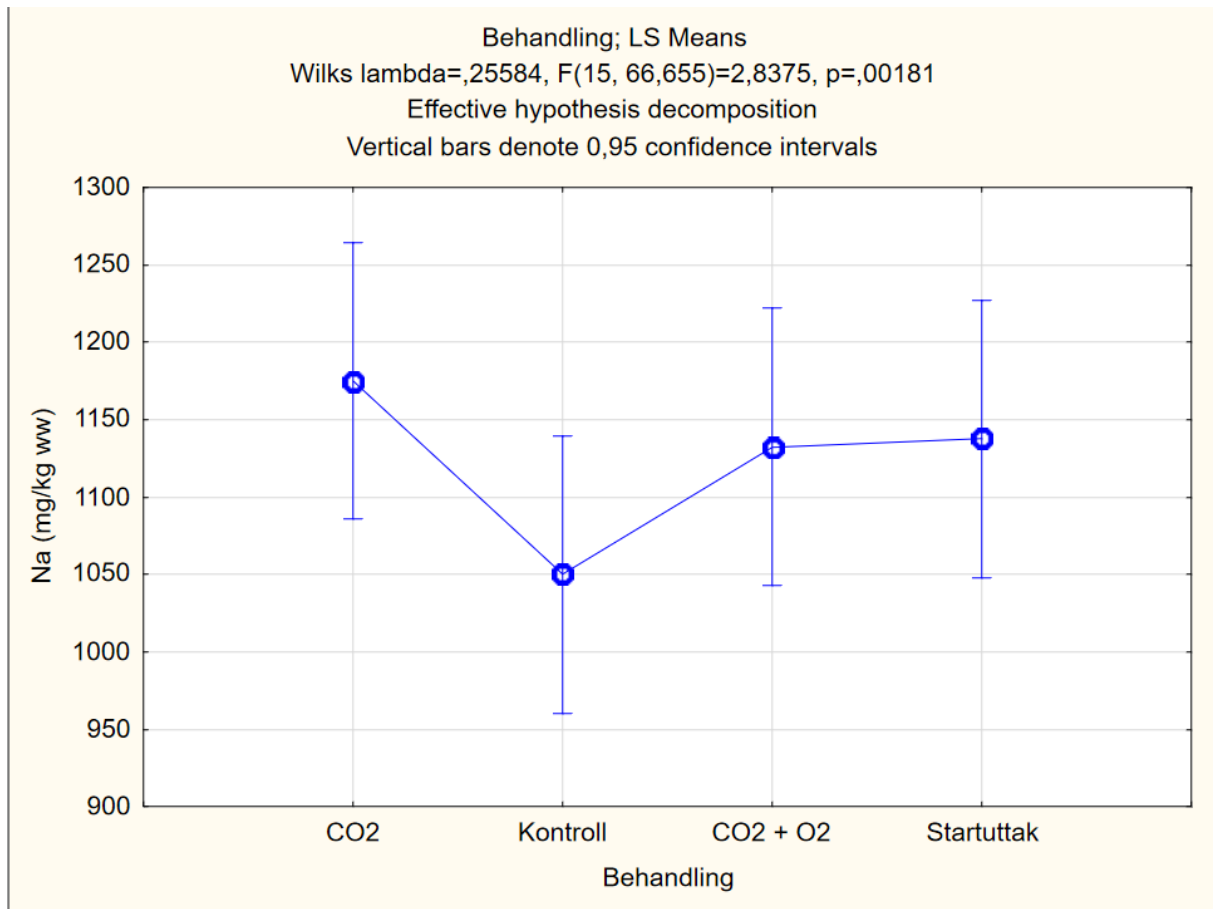


Tukey HSD test; variable Ca (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 82698,, df = 28,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}	{4}
		323,75	258,88	244,00	215,00
1	CO2		0,968900	0,944583	0,873270
2	Kontroll	0,968900		0,999637	0,989984
3	CO2 + O2	0,944583	0,999637		0,997095
4	Startuttak	0,873270	0,989984	0,997095	

# Na

Enveis ANOVA og post hoc Tukey test for natriuminnhold i nyre ved sluttuttaket.

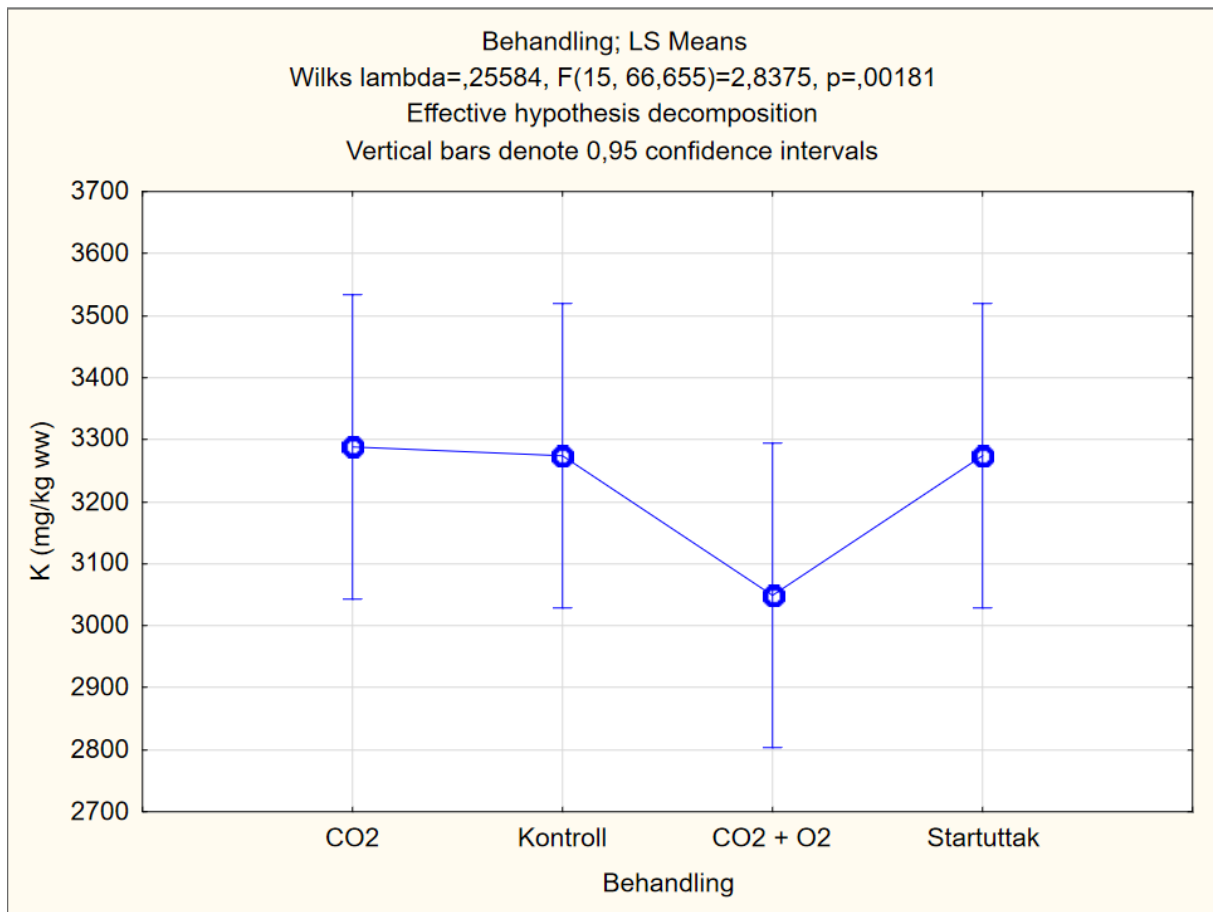


Tukey HSD test; variable Na (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 15261,, df = 28,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}	{4}
1	CO2	1175,0			
2	Kontroll	0,203649	1050,0		
3	CO2 + O2	0,900855	0,548851	1132,5	
4	Startuttak	0,929042	0,499954	0,999826	1137,5

# K

Enveis ANOVA og post hoc Tukey test for kaliuminnhold i nyre ved sluttuttaket.

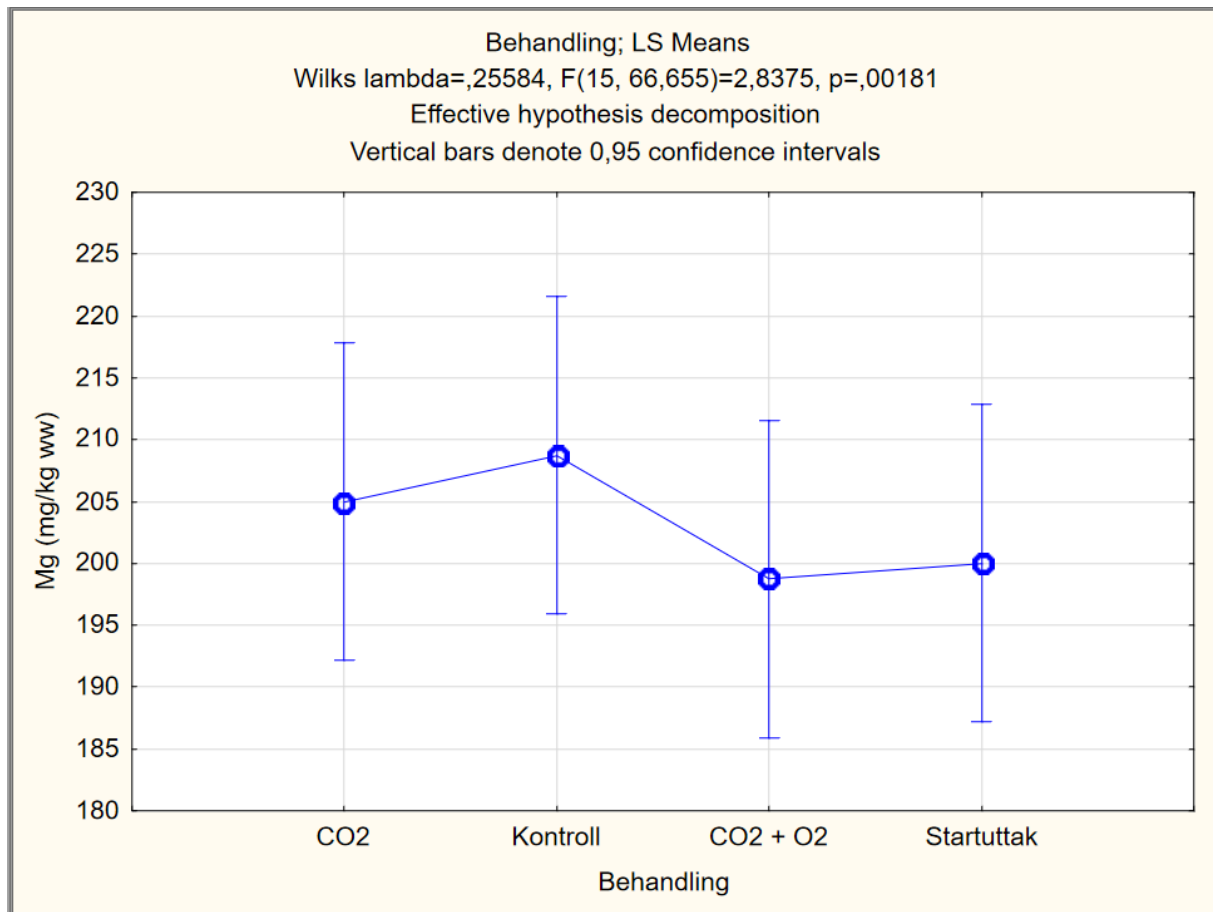


Tukey HSD test; variable K (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 1150E2, df = 28,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}	{4}
		3287,5	3275,0	3050,0	3275,0
1	CO2		0,999868	0,509311	0,999868
2	Kontroll	0,999868		0,553999	1,000000
3	CO2 + O2	0,509311	0,553999		0,553999
4	Startuttak	0,999868	1,000000	0,553999	

# Mg

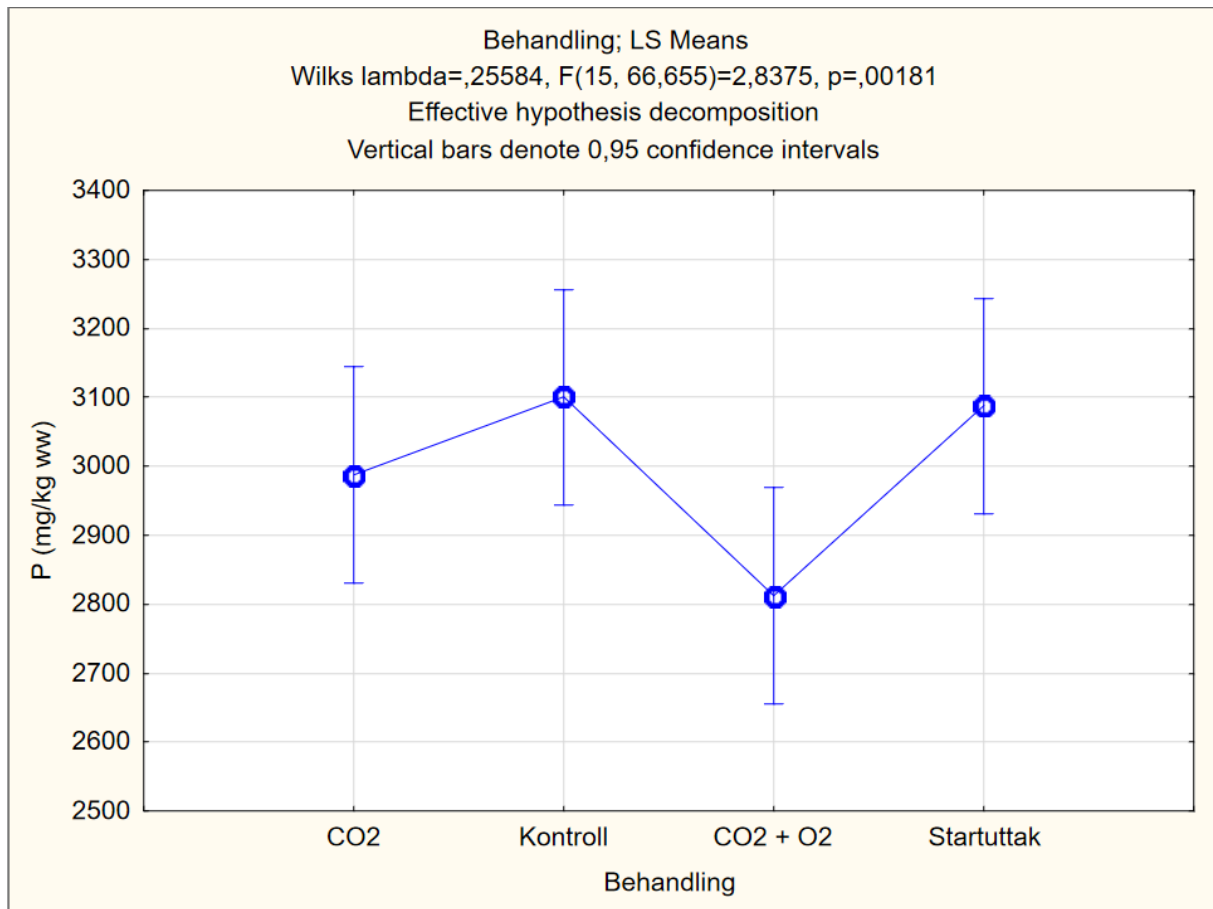
Enveis ANOVA og post hoc Tukey test for magnesiuminnhold i nyre ved sluttuttaket.



Tukey HSD test; variable Mg (mg/kg ww) (Spreadsheet23)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 313,39, df = 28,000					
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}	{4}
		205,00	208,75	198,75	200,00
1	CO2		0,974014	0,893898	0,941718
2	Kontroll	0,974014		0,674700	0,757140
3	CO2 + O2	0,893898	0,674700		0,999027
4	Startuttak	0,941718	0,757140	0,999027	

# P

Enveis ANOVA og post hoc Tukey test for fosforinnhold i nyre ved sluttuttaket.



Tukey HSD test; variable P (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = 46652,, df = 28,000

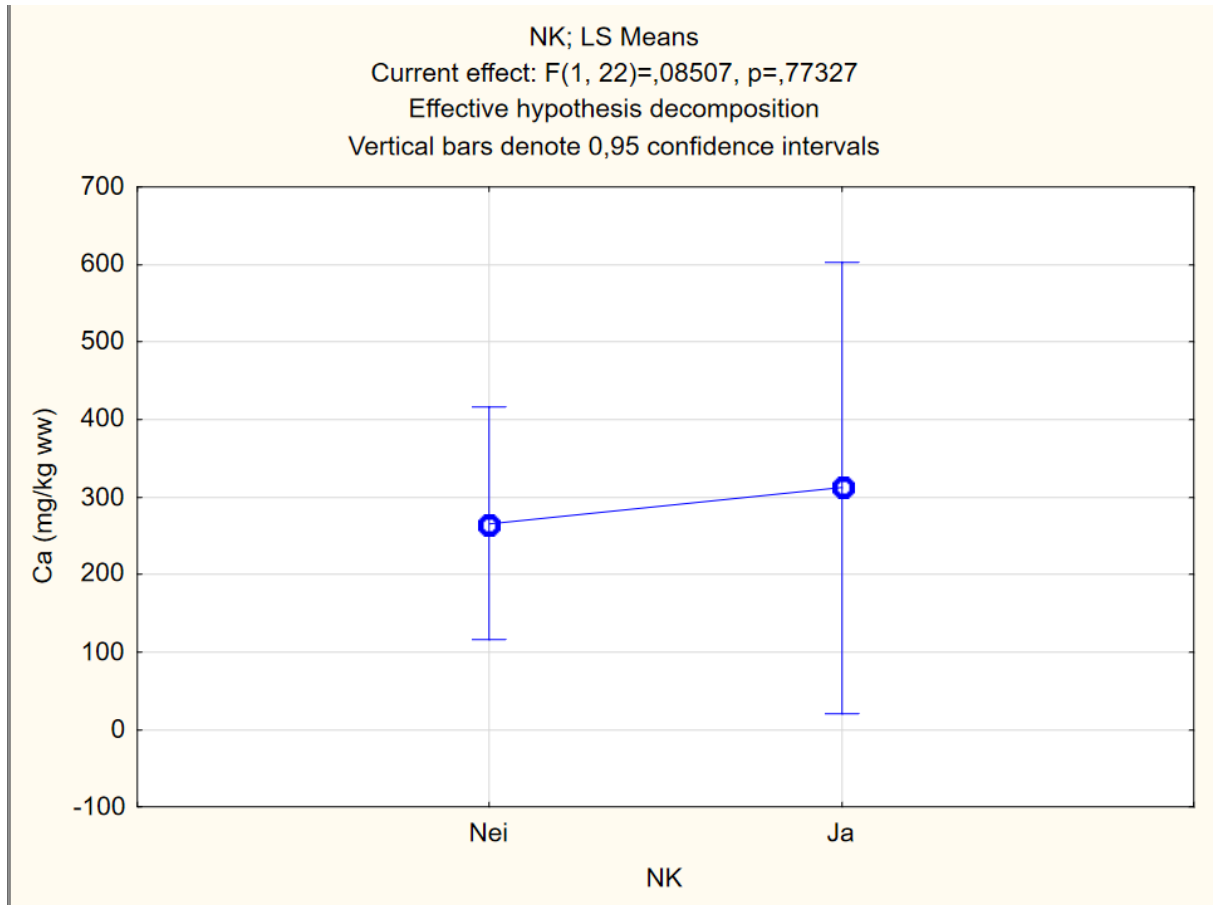
Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}	{4}
		2987,5	3100,0	2812,5	3087,5
1	CO2		0,726825	0,384014	0,791322
2	Kontroll	0,726825		0,058127	0,999492
3	CO2 + O2	0,384014	0,058127		0,074342
4	Startuttak	0,791322	0,999492	0,074342	



## Mineral NK mot ikke NK

### Ca

Enveis ANOVA med Univariate test of significance for kalsiuminnhold i nyre i fisk med og uten NK ved sluttuttaket.

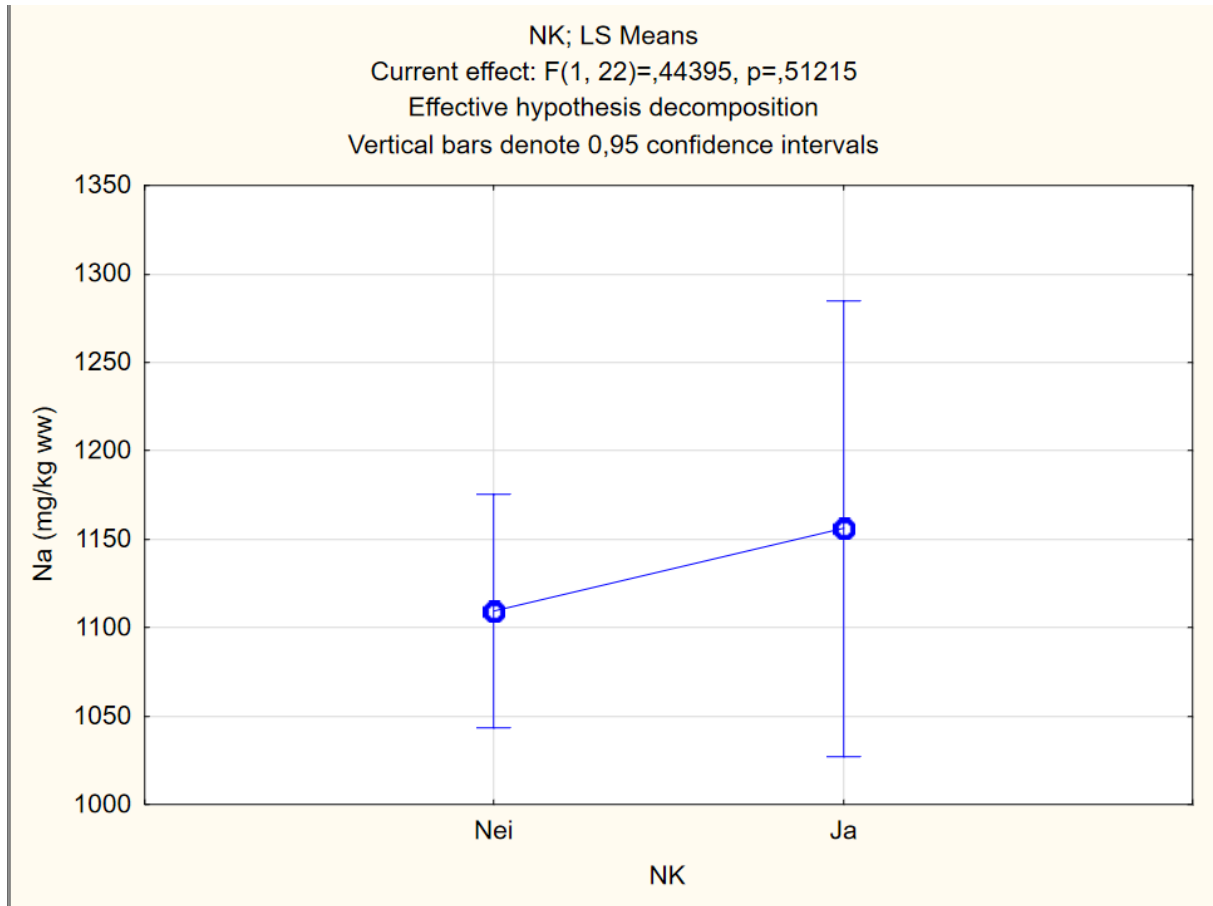


Univariate Tests of Significance for Ca (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1322175	1	1322175	13,39878	0,001376
NK	8395	1	8395	0,08507	0,773268
Error	2170933	22	98679		

# Na

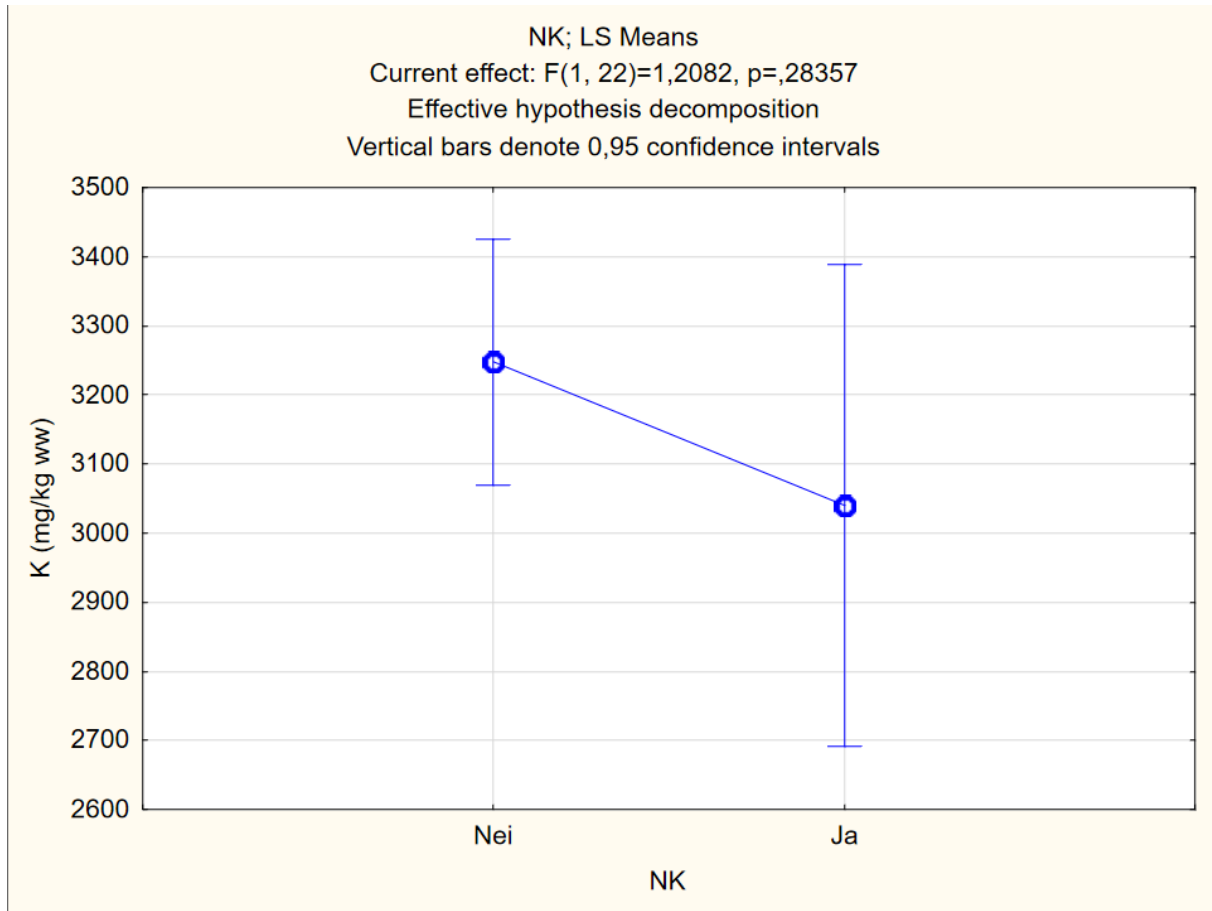
Enveis ANOVA med Univariate test of significance for natriuminnhold i nyre i fisk med og uten NK ved sluttuttaket.



Univariate Tests of Significance for Na (mg/kg ww) (Spreadsheet23)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	20315635	1	20315635	1052,587	0,000000
NK	8569	1	8569	0,444	0,512148
Error	424615	22	19301		

# K

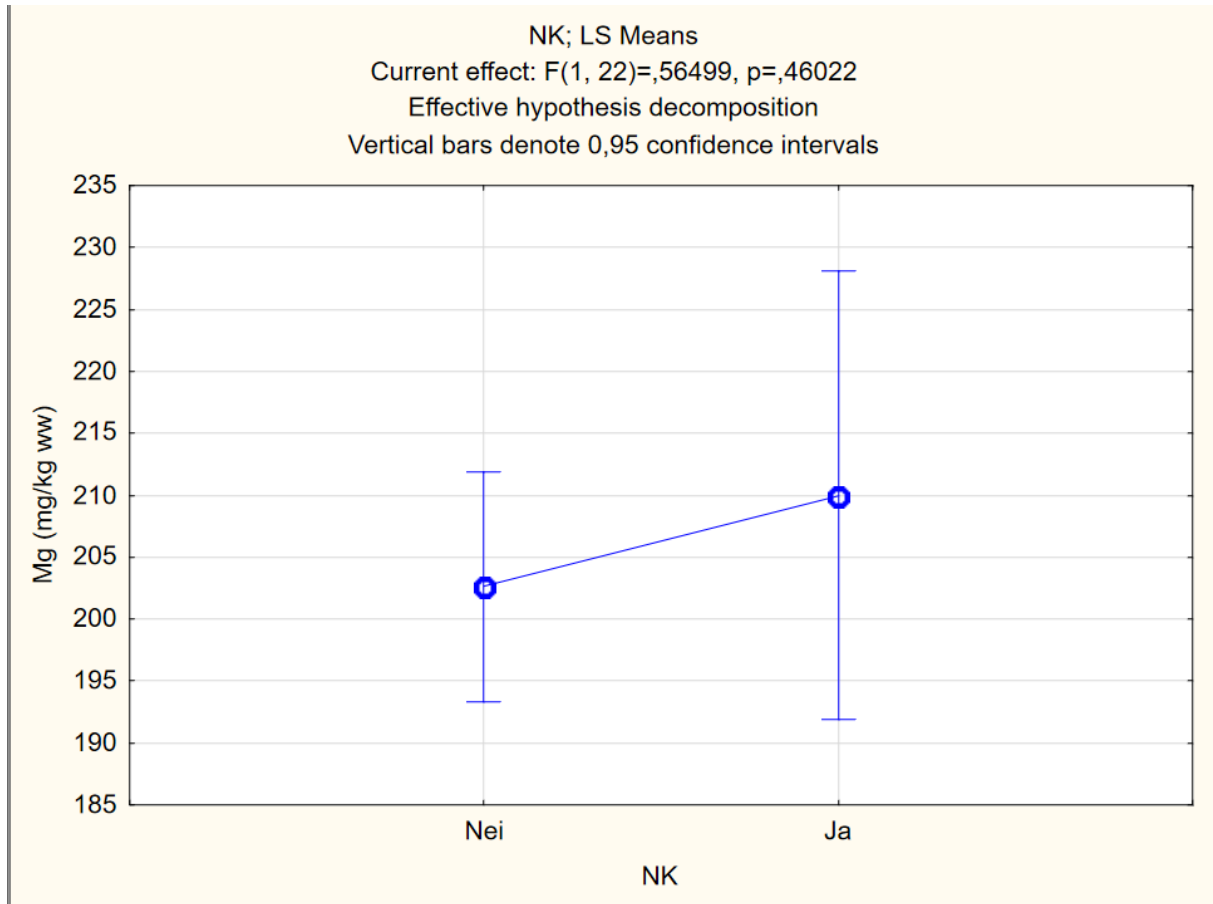
Enveis ANOVA med Univariate test of significance for kaliuminnhold i nyre i fisk med og uten NK ved sluttuttaket.



Univariate Tests of Significance for K (mg/kg ww) (Spreadsheet23)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	156476882	1	156476882	1110,707	0,000000
NK	170215	1	170215	1,208	0,283568
Error	3099368	22	140880		

# Mg

Enveis ANOVA med Univariate test of significance for magnesiuminnhold i nyre i fisk med og uten NK ved sluttuttaket.

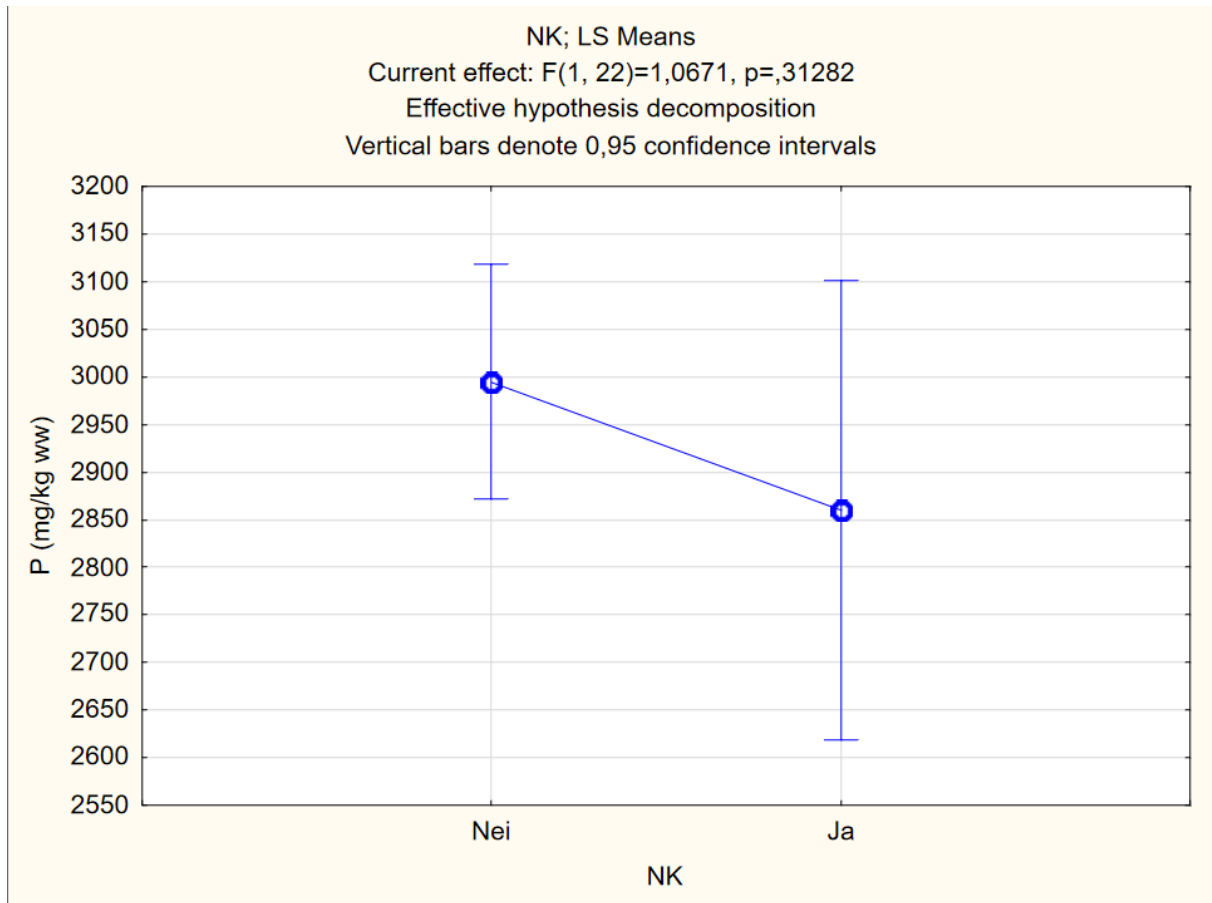


Univariate Tests of Significance for Mg (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>673964,9</b>	<b>1</b>	<b>673964,9</b>	<b>1771,807</b>	<b>0,000000</b>
NK	214,9	1	214,9	0,565	0,460223
Error	8368,4	22	380,4		

# P

Enveis ANOVA med Univariate test of significance for fosforinnhold i nyre i fisk med og uten NK ved sluttuttaket.



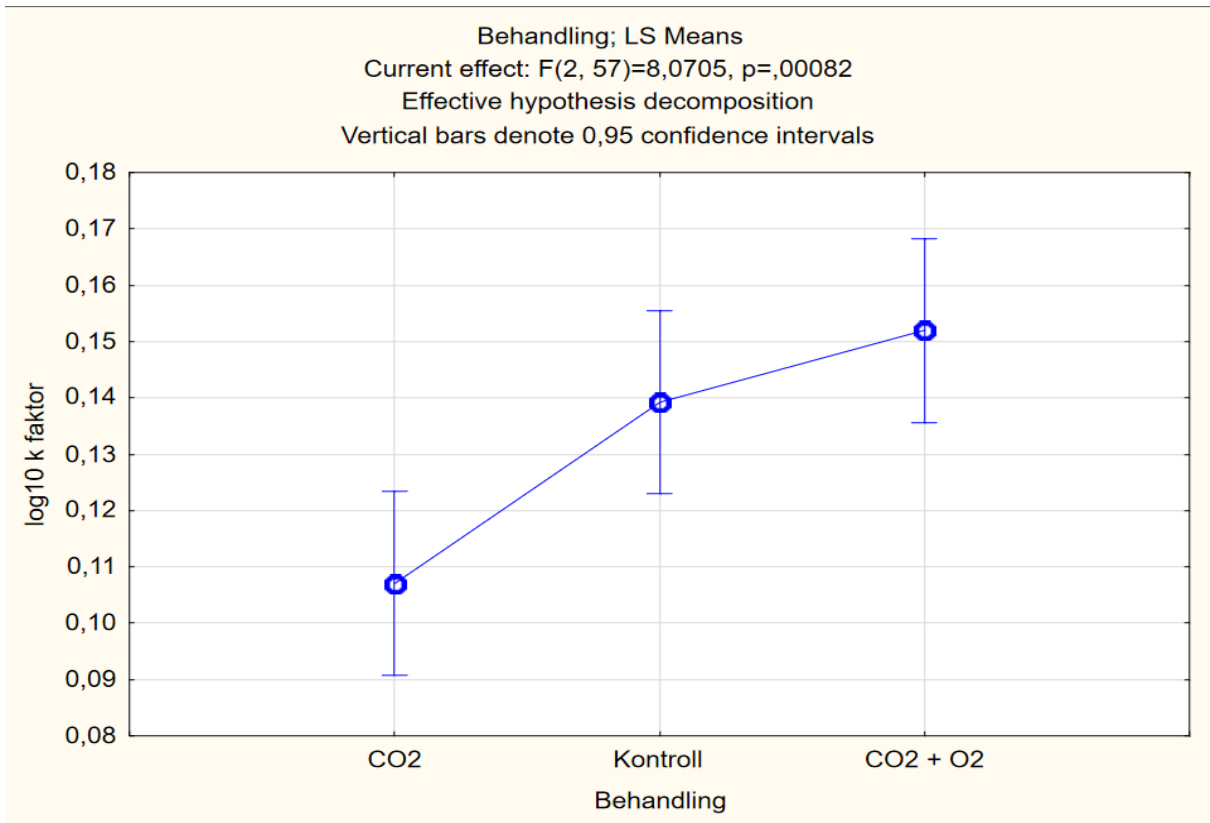
Univariate Tests of Significance for P (mg/kg ww) (Spreadsheet23)  
Sigma-restricted parameterization  
Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>135683526</b>	<b>1</b>	<b>135683526</b>	<b>2014,911</b>	<b>0,000000</b>
NK	71860	1	71860	1,067	0,312820
Error	1481474	22	67340		

### 7.3.5 Statistikk for k faktor

## K faktor

Enveis ANOVA med univariate test of significance og post hoc Tukey test for k factor ved sluttuttaket.



Univariate Tests of Significance for log<sub>10</sub> k faktor (Spreadsheet43)  
 Sigma-restricted parameterization  
 Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,057635	1	1,057635	797,2328	0,000000
Behandling	0,021413	2	0,010707	8,0705	0,000820
Error	0,075618	57	0,001327		

Tukey HSD test; variable log<sub>10</sub> k faktor (Spreadsheet43)  
 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
 Error: Between MS = ,00133, df = 57,000

Cell No.	Behandling	{1}	{2}	{3}
		,10708	,13925	,15197
1	CO2		0,019286	0,000850
2	Kontroll	0,019286		0,515014
3	CO2 + O2	0,000850	0,515014	