

Innverknad av vaksine og vasstemperaturar ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase på virvelmineralisering og danning av virveldeformasjonar hjå atlantehavslaks (*Salmo salar* L.) haustsmolt

Ane Grini



**Master i natur, helse og miljøvern spesielt tilrettelagt for bioingeniørar, 60 studiepoeng
Utført ved Havforskningsinstituttet i Matre**



Tittel:	Innverknad av vaksine og vasstemperaturar ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase på virvelmineralisering og danning av virveldeformasjonar hjå haustmolt av atlanterhavslaks (<i>Salmo salar</i> L.)
Nøkkelord:	Ryggvirvlar, deformasjonar, kompresjonar, mineralisering, vekst, vasstemperaturar
Forfattere/	Ane Grini
Studentnr.:	050401
Fagkode:	
Oppgavetype:	Mastergrad
Studiepoeng:	60
Studium:	Master i natur, helse og miljøvern spesielt tilrettelagt for bioingeniørar
Konfidensiell:	



Forord

Dette studiet vart utført ved Havforskningsinstituttet i Matre, og vart finansiert av faggruppereproduksjon og vekst.

Først og fremst vil eg gjerne takke Per Gunnar Fjelldal ved Havforskningsinstituttet for å ha skaffa til vege oppgåva for meg, og for å ha vert ein fantastisk rettleiar. Han har ikkje berre vert ein utruleg kjelde til informasjon og alltid tatt seg tid til å svare på spørsmål, men har òg vert ein sann inspirasjonskjelde. Hans alltid positive syn på ting, og grundige innsikt i arbeidsfeltet, har vert ein stor støtte gjennom dei to åra eg har vert på forskingsstasjonen.

Ein stor takk går til Tom Hansen som har tatt seg av alt det økonomiske ved forsøket, gjort det mogleg for meg å dra på møter og konferansar, og lest og kommentert oppgåva mi.

Eg vil òg takke Arne Berg og Frode Oppedal som har vert behjelpelige med statistiske problem. Eg har og satt stor pris på all hjelpa eg har hatt frå Per Gunnar Fjelldal, Arne Berg, Tom Hansen, Karen Såtendal, Lise Dyrhovden og Grethe Torsheim ved prøveuttaka. Takk til alle tilsette ved Havforskningsinstituttet i Matre for å ha gitt meg eit godt arbeidsmiljø.

Ekstra varme tankar går til Ida Lillefjord, Frode Oppedal, Per Gunnar Fjelldal og Grethe Urdal for å tatt så godt i mot meg frå første dag i Matre, og for å ha vert så gode vener i tida etter det. Takk òg til Ulla Nordgarden, Jannicke Vigen, Mette Remen og Marita Larsen, som har skapt eit godt miljø på brakka.

Til slutt vil eg gjerne takke Jan Heggenes, som har vert min rettleiar ved Høgskulen i Bø i Telemark, og som kommenterte det siste utkastet av oppgåva.

Matre, 17. Juni 2008, Ane Grini

Innhald

Forord.....	1
Samandrag.....	5
1 Innleiing.....	6
1.1 Livssyklus og smoltifisering hjå atlanterhavslaks	6
1.2 Styring av vekst og smoltifisering i oppdrettsnæringa	6
1.3 Vaksinerings.....	7
1.4 Ryggsøyle og ryggvirvlar	8
1.5 Ryggdeformasjonar.....	9
2. Material og metode.....	12
2.1 Fiskestamme og oppdrettsforhold før forsøksstart.....	12
2.2 Eksperimentelt oppsett.....	12
2.3 Oppdrettsforhold ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase.....	14
2.4 Oppdrettsforhold i merd.....	14
2.5 Prøveuttak	15
2.6 Røntgenfotografering og analysing av virvelmorfologi.....	16
2.7 Måling av mineralinnhald og estimering av proteininnhald i virvlar	18
2.8 Måling av kalsium og fosfor i virvlar	18
2.9 Måling av kalsium og fosfor i serum	19
2.10 Statistiske analysar	19
3. Resultat	22
3.1 Vekst.....	22
3.1.1 Vekst under smoltifisering og tidleg sjøvassfase	22
3.1.2 Lengd, vekt og kondisjonsfaktor ved avslutning av forsøket.....	27
3.2 Mineralisering under smoltifisering og tidleg sjøvassfase.....	29

3.2.1 Mineralinnhald, mineralvektauke og proteinvektauke i virvlar	29
3.2.2 Kalsium og fosforinnhald i virvlar	32
3.2.3 Kalsium i serum	34
3.2.4 Fosfat i serum	36
3.3 Ryggvirvelmorfologi	38
3.3.1 Intervertebralrom og samanheng mellom intervertebralrom og mineralinnhald i virvlar	38
3.3.2 Lengd/diameterforhold og samanheng mellom lengd/diameterforhold og mineralinnhald i virvlar	44
3.4 Deformasjonar	49
3.4.1 Virveldeformasjonar ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase	49
3.4.2 Deformasjonar 42 veker etter sjøvassoverføring	52
4. Diskusjon	57
4.1 Metodediskusjon	57
4.1.1 Temperatur	57
4.1.2 Oksygen og pH	57
4.1.3 Måling av vekstparameter	58
4.1.4 Måling av mineralinnhald i ryggvirvlar	59
4.1.5 Måling av kalsium og fosfat i virvlar	60
4.1.6 Måling av kalsium og fosfat i blodprøvar	60
4.1.7 Deformasjonsundersøking, måling av lengd/diameterforhold og intervertebralrom	61
4.2 Resultatdiskusjon	62
4.2.1 Vasstemperaturen påverka veksten i ferskvatn, men ikkje i tidleg sjøvassfase	62
4.2.2 Mineralinnhaldet sank gjennom heile den eksperimentelle perioden, spesielt i den tidlege sjøvassfasen	63
4.2.3 Store intervertebralrom og små lengd/diameterforhold i virvlane korrelerte med dårleg mineraliserte virvlar	68

4.2.4 Temperaturregime var viktigare enn vaksinasjon på deformasjonsdanninga i virvlar	70
4.2.5 Samanfatta diskusjon	73
5. Referanseliste	75
Appendiks A: Eksperimentelt design	83
Appendiks B: Rådata	86
Virvelmorfologi.....	86
Deformasjonar	87
Appendiks C: Statistiske testar.	89
Vekst.....	89
Mineral	97
Virvelmorfologi.....	108
Deformasjonar	118
Appendiks D: Test av ulike avfeittingsmetodar	122

Samandrag

I oppdrett av atlantehavslaks er deformasjonar i ryggøyla tidvis eit stort problem, spesielt hos haustsmolt. Deformasjonane fører til kvalitetsmessig nedgradering av fisken og problem i fileteringsprosessen. Dette forsøket undersøkte korleis vass temperaturar under smoltifisering og tidleg sjøvassfase i interaksjon med inter-peritoneal vaksinasjon med en oljeadjuvant vaksine, påverka mineralisering og utvikling av deformasjonar i ryggvirvlar hjå haustsmolt. Haustsmolt vart oppdretta ved 16 °C og 10 °C dei siste seks vekene i ferskvatn (FV) og dei første seks vekene i saltvatn (SV), ved kontinuerleg lys i kar. Deretter vart fisken overført til naturleg lys i merd. Forsøket bestod av 4 temperaturregime (10 °C FV – 10 °C SV, 10 °C FV – 16 °C SV, 16 °C FV – 10 °C SV, 16 °C FV – 16 °C SV), med vaksinert og uvaksinert fisk i kvart regime. I løpet av ferskvassperioden (smoltifisering) hadde fisk ved høg temperatur raskast vekst og utvikla lågast mineralinnhald i virvlane. Under dei første seks vekene i saltvatn hadde fisk ved 16 °C og 10 °C lik vekst, og alle temperaturregima hadde mellom 10 % og 15 % reduksjon i mineralinnhaldet i virvlane. Radiologiske undersøkingar ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring syna at verken temperatur eller vaksinasjon hadde gitt ein signifikant effekt på utvikling av virveldeformasjonar ved desse tidspunkta. Palpering 42 veker etter sjøvassoverføring viste derimot at fisk som hadde fått 16 °C i den tidlege saltvassfasen hadde signifikant høgare innslag av individ med ytre teikn på virveldeformasjonar samanlikna med fisk som hadde fått 10 °C i den same perioden (høvesvis gjennomsnittleg 17,9 % mot 2,9 % for uvaksinert fisk og 22,8 % og 2,8 % for vaksinert fisk). Dei hadde òg signifikant høgare innslag av deformert fisk basert på røntgenundersøking (høvesvis 92,7 % mot 46,1 % for uvaksinert fisk og 89,1 % mot 52,9 % for vaksinert fisk), og signifikant fleire deformerte virvlar per deformert fisk. Det var ingen samanheng mellom mineralinnhaldet i ryggvirvlane seks veker etter sjøvassoverføring og innslaget av virveldeformasjonar 42 veker etter sjøvassoverføring, og heller ikkje mellom veksthastigheita i den tidlege sjøvassperioden og innslag av virveldeformasjonar 42 veker etter sjøvassoverføring.

Forsøket synar at vass temperaturen dei første seks vekene etter sjøvassoverføring er svært kritisk med tanke på ein normal utvikling av rygggraden hos haustsmolt, og at inter-peritoneal vaksinasjon med olje-adjuvant vaksine ikkje påverkar utvikling av virveldeformasjonar.

1 Innleiing

1.1 Livssyklus og smoltifisering hjå atlanterhavslaks

Atlantehavslaksen (*Salmo Salar* L) er ein anadrom beinfisk. Han veks opp i ferskvatn, der han oppheld seg i eitt til seks år (e.g. Metcalfe & Thorpe, 1990), før han gjennomgår ei rekke endringar som preadapterer han til eit marint liv. Endringane, som vert kalla smoltifisering, eller parr-smolt transformasjon, er både fysiologiske, morfologiske og åtferdsmessige (e.g. Hoar 1988). Endringane fiskane gjennomgår ved smoltifisering involverer blant anna at fiskane byrjar å symje med straumen (Folmar & Dichoff, 1980) og går over frå å vere botnlevande fisk til å bli pelagiske (Folmar & Dichoff, 1980, Hoar 1988). Parrmerkene, som er sterkt farga fingeravtrykkliknande pigmentflekker, forsvinn og fiskane får sølvfarga sider, mørk rygg og kvit buk. Kroppen vert slankare og meir straumlinjeforma (Hoar, 1998) ved at nedbrytinga av feitt aukar (Hoar, 1998) og at virvelsøyla til fiskane veks meir i haleregionen enn i bukregionen (Fjellidal et al., 2006). Fiskane utviklar hypo-osmoregulering, blant anna ved hjelp av auka Na⁺, K⁺- ATPase aktivitet over gjeller og tarm (Folmar og Dichoff, 1980). Igangsetjinga av parr-smolt transformasjonen vert styrt av endogene rytmar som vert synkronisert av ytre miljøfaktorar. Endring i daglengda er den viktigaste miljøfaktoren (e.g. Duston & Saunders, 1990), og laksen smoltifiserer slik at han kan vandre ut i saltvatn ein gong om våren (Hoar, 1988). I sjøen har atlantehavslaksen god tilgang på føde, og veks raskt. Etter eitt til tre år byrjar fiskane å bli kjønnsmodne (Klemetsen et al., 2003) og vandrar tilbake til fødeelva si for å gyte (Døving, 1992).

1.2 Styring av vekst og smoltifisering i oppdrettsnæringa

I oppdrett vert atlantehavslaksen heldt i kar fram til han er ferdig smoltifisert. Vekstraten i ferskvassfasen vert kontrollert ved hjelp av temperatur (Johnston & Saunders, 1981, Dwyer & Piper, 1987, Austreng et al., 1987, Solbakken et al., 1994), lys (Berg et al., 1992, Solbakken et al., 1994), avl (Gjedrem, 2000) og førsamansetjing (Grisledal-Helland & Helland, 1997). Tida frå befrukting av rogn til startfôring er avhengig av talet på døgngrader, og kan kortast kraftig ned ved å bruke høgare vass temperaturar (Hansen et al., 1998 c). Ved startfôringa om våren vert yngelen oppdretta under kontinuerleg lys (Berg et al., 1992) og ofte høge temperaturar (Hansen et al., 1998 b) for å auke veksten. Fiskene vert deretter oppdretta ved eitt av to lysregime for å produsere enten vårsmolt eller haustsmolt. Vårsmolten vert oppdretta ved naturleg lysregime frå sommaren eller tidleg på hausten, og smoltifiserer vanlegvis i mai påfølgjande år (Hansen et al., 1998 a). Haustsmolten vert derimot gitt ein kunstig vinter- og vårperiode, og smoltifiserer hausten same året som den vart klekt. Den

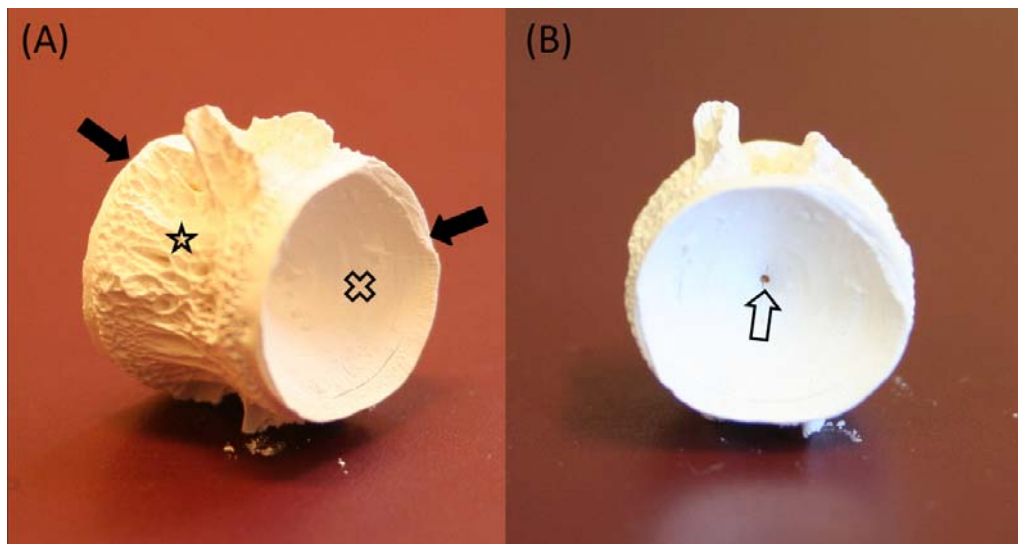
kunstige vinter- og vårperioden består vanlegvis av ca seks veker med 12 timar lys og 12 timar mørke per døgn og deretter ca seks veker med 24 timar lys per døgn (Bjørnsson et al. 2000). Når laksen er ferdig smoltifisert, vert den overført til merd i saltvatn, der matfisk produksjonen føregår. Avl (Gjedrem, 2000), førsamansetning (Grisdale-Helland og Helland, 1997), bruk av tilleggslys om vinteren og våren (Oppedal et al., 1997; 2005) og vass temperaturar ved oppdrett i lukka merder (Austreng et al., 1987, Handeland et al., 2008) kan brukast til å påverka veksten i matproduksjonen. Haustmolten, som smoltifiserer ca 7 månader før vårsmolten, veks raskare enn vårsmolten både under smoltifiseringa og den tidlege sjøvassfasen (Lysfjord et al., 2004, Fjellidal et al., 2006). Dei fleste settefiskanlegga i Noreg produserer både vårsmolt og haustmolt (Stefansson et al., 2005), og det vart i 2005 estimert at det vart satt ut ca 106 millionar vårsmolt og ca 56 millionar haustmolt i norske matfiskanlegg (Kjønhaug, 2006).

1.3 Vaksinerings

Merder er opne for det akvatiske miljø, og fiskane vert eksponert for patogener i sjøvassfasen. Grunna høg individtettleik og enkel vassboren transport, spreier sjukdomar seg lett i intensiv oppdrett (Sommerset et al., 2005). Vaksinerings er den viktigaste måten å førebygge mot infeksjonssjukdomar som t.d. furunkulose, IPN og vibrose (Berg et al., 2006 b), og er i dag ein integrert del i dei fleste lakseoppdrettsanlegga i Nord Europa og Nord Amerika (Sommerset et al., 2005). Laksen kan praktisk sett vaksinerast frå han er 20-30 g fram til fire veker før sjøvassoverføring, men det vert anbefalt å inkludere faktorar som temperatur og fiskestorleik med i planlegginga av vaksinerings tidspunkt (Berg et al., 2006 a). Den mest brukte metoden for å vaksinere laks på er ved injeksjon i bukhola (Berg et al., 2006 b). Det er vanleg å blande saman vaksiner mot fleire patogener til ei kombinasjonsvaksine (Berg et al., 2006 b). For å gi tilfredsstillandes vern mot ein del sjukdomar, som t.d. furunkulose, må vaksinen tilsettast olje-adjuvans (Midtlyng, 1996 a; b; c). Adjuvans er hjelpestoff som stimulerer til ein betre immunrespons etter vaksinerings. Bruken av olje-adjuvans tilsett vaksine mot furunkulose har ført til fleire biverknadar, blant anna skader på injeksjonsstaden (Midtlyng, 1996 a), intra-abdominale skader (Midtlyng et al., 1996 b; c) og redusert appetitt og vekst den første perioden etter vaksinerings (Midtlyng et al., 1996 a, Sørnum & Damsgård, 2004, Berg et al., 2006 a). I tillegg kan feil vaksineringsstrategi auke risikoen for utvikling av deformasjonar i virvelsøyla (Berg et al., 2006 a). Skjelettdeformasjonar i rygg søyla er tidvis eit stort problem, både etisk og økonomisk. Deformasjonane fører til kvalitetsmessig nedgradering av fisken, og skaper dessutan problem i fileteringsprosessen (Helland et al, 2005). Både av økonomiske og velferdsmessige grunnar, er det difor viktig å finne kva faktorar som påverkar deformasjonsdanninga.

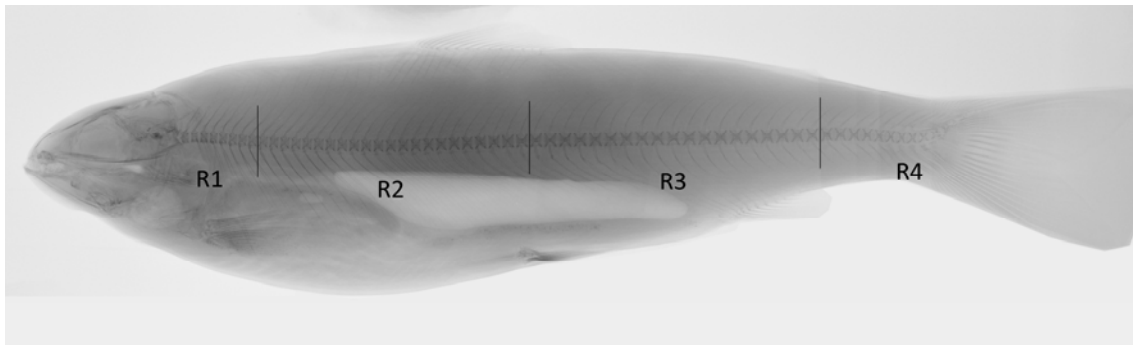
1.4 Ryggstøyle og ryggvirvlar

Ryggstøyle til atlantehavslaks består av 58-60 ryggvirvlar (Kacem et al., 1998), som vert halde saman ved hjelp av intervertebralligamentar (Nordvik et al., 2005). Virvlane er av beinvev, nærmare bestemt tre lag med kompakt bein og eit lag trabekulært bein. Det kompakte beinet dannar ein timeglasfasong som er innhol både framme og bak, og har eit holrom sentralt (Fig. 1). Dette gir virvlane ein låg beinmasse, noko som er viktig for å redusere negativ oppdrift (Casadevall et al., 1990). Ryggstrengen fyller holromma mellom virvlane, går gjennom opninga sentralt i virvlane og dannar eit samanhengande band gjennom heile ryggstøyle (Kryvi & Totland, 1997, Grotmol et al., 2003). Vevet fungerer som støytputer mellom virvlane (Kryvi & Totland, 1997). Det trabekulære beinet ligg omkring timeglasaset og gir virvlane ei sylindrisk form (Fig. 1) (Nordvik et al., 2005).



Figur 1: Bilete av ryggvirvlar frå atlantehavslaks frå sida (A) og forfra (B). (A) Stjerne markerer trabekulært bein, og kryss markerer kompakt bein. Svarte pilar peikar på randen av det kompakte beinet der lengdeveksten foregår. (B) Svart pil utan fyll peikar på holet ryggstrengen går gjennom.

Ryggvirvlane kan delast inn i fire regionar etter kriterium frå Kacem et al. (1998). Dei fire regionane er høvesvis fremre bukregion (region 1, virvel 1-8), bakre bukregion (region 2, virvel 9-30), fremre haleregion (region 3, virvel nr 31-49) og bakre haleregion (region 4, virvel 50-58) (Fig. 2). Bukregionane er plassert over bukhola og har ribber. Haleregionane ligg bak abdomen og hemalbogane har vakse saman. I tillegg har virvlane i fremre bukregion og bakre haleregionen skarpe morfologiske variasjonar, t.d. i lengd, diameter og tørrvekt, medan virvlane i bakre bukregion og fremre haleregion er meir homogene (Kacem et al., 1998).



Figur 2: Røntgenfotografi av laks. Biletet illustrerer dei fire regionane i ryggstøyla; R1: fremre bukregion, R2: bakre bukregion, R3: fremre haleregion og R4: bakre haleregion.

Beinvevet er samansett av ein organisk matriks, mineral, og beinceller (Meunier, 2002). Den organiske matriksen består hovudsakleg av kollagenfibre, som ligg ordna i ulike retningar i dei forskjellige laga (Nordvik et al., 2005). Mineraldelen i virvlane består hovudsakleg av kalsium og fosfat (Meunier, 2002). I tillegg finn ein små mengder natrium, magnesium og kalium og ein del spormetall. Den presise samansetjinga av krystallane i ryggvirvlane er ikkje kjent, men blir antatt å vere ein urein og meir eller mindre kalsiumrik form av hydroxyapatitt, $\text{Ca}^{2+}_{10}(\text{PO}_4^{3-})_6(\text{OH})_2$ (Hamada et al., 1995). Beincellene ein finn i virvlane er osteoblastar, osteocytter (Nordvik et al., 2005) og osteoclastar (Martens et al., 2008).

Dei to innarste laga av kompakt bein i virvlane vert danna ved mineralisering av kollagenrikt vev i og rundt ryggstrengen. Det trabekulære beinet derimot, og hovuddelen av det kompakte beinet, vert bygd opp gjennom direkte forbeining. På det trabekulære beinet er vekstsonene hovudsakleg plassert på dei ytste delane av beinet, medan dei er plassert på den fremre og bakre randen av det kompakte beinet (Fig. 1) (Nordvik et al., 2005). Den direkte forbeininga skjer ved at osteoblastar produserer og skil ut osteoid, som seinare vert mineralisert (Meunier, 2002, Witten et al., 2005) ved multiple mineraliseingsseter på kollagenfibrane (Lee & Glimcher 1989, Landis et al., 1996). Osteoidet er i seg sjølv mjuk og bøyeleg, og den mekaniske styrken i beinet er avhengig av mineralinnhaldet (Fjelldal et al., 2006).

1.5 Ryggdeformasjonar

Skjelettdeformasjonar opptre både i oppdrettsfisk og villfisk. Gill og Fisk (1966) rapporterte at omtrent 3 % av villfanga sjøvassmigrert stillehavslaks (tre artar undersøkt; *Oncorhynchus nerka*, *O. gorbuscha* og *O. keta*) syna deformerte virvlar ved røntgenfotografering, medan Fjelldal et al. (2006) ikkje fann nokon virveldeformasjonar blant 21 villfanga atlanterhavslaks. I oppdrettsanlegg frå Hardanger til Helgeland derimot, gav t.d. 2000-årsklassen med atlanterhavslaks ein

nedklasseringsrate grunna ryggdeformasjonar på 7,5 % (Djupvik, 2005). Basert på radiologiske undersøkingar av oppdrettslaks, har ulike studium vist ein prevalens av individ med deformerte ryggvirvlar på rundt 12 % omtrent eit år etter sjøvassoverføring (Witten et al., 2006, Fjellidal et al., 2007 a). Ved ytre undersøkingar ser ein berre dei mest alvorlege tilfella av virveldeformasjonar (Fjellidal et al., 2006). Desse kan sjåast som enten kurvaturar (Fjellidal et al., 2004, Wargelius et al., 2005) eller forkorting av ryggsøyyla i hovud-haleretninga (Kvallestad et al., 2000, Witten et al., 2005).

Utviklinga av deformasjonar kan starte gjennom heile livet til laksen (Wargelius et al., 2005, Witten et al., 2006, Fjellidal et al., 2007 a). Abnormale endringar i virvlar kan gi utslag i kompresjonar (Kvallestad et al., 2000, Berg et al., 2006 a, Fjellidal et al., 2006; 2007 a, Witten et al., 2005; 2006), ankyloser (Kvallestad et al., 2000, Fjellidal et al., 2006; 2007 a, Witten et al., 2006), dislokasjonar (Fjellidal et al., 2006; 2007 a, Sullivan et al., 2007 a) og kombinasjonar av desse (Fjellidal et al., 2006; 2007 a, Witten et al., 2006). Komprimerte halevirvlar er den hyppigast førekommande deformatsjonen hos oppdretta atlantehavslaksen (Witten et al., 2005, Berg et al., 2006 a; Fjellidal et al., 2008). Fisk med forkorting i bakre halvdel av ryggsøyyla vert kalla korthalar. Korthalar har høg kondisjonsfaktor, dvs redusert lengde i forhold til vekt, og auka kroppshøgde (Witten et al., 2005). Dei komprimerte virvlane er karakterisert av ein normal midtre del og abnormale endringar i fremre og bakre kant, der det kompakte beinet flater ut i staden for å behalde timeglasforma (Witten et al., 2005, Berg et al., 2006 a). Ulike studium indikerer at kompresjonar kan starte med endringar i vekstsona til det kompakte beinet (Fjellidal et al., 2006; 2007b), med endringar i det intervertebrale rommet (Kvallestad et al., 2000, Witten et al., 2005) eller med begge deler (Witten et al., 2005). Endringa i vekstsona til det kompakte beinet kan vere relatert til mjukt og dårleg mineralisert bein (Fjellidal et al., 2006; 2007 b), eller endra mekanisk belastning (Witten et al., 2005). Ankyloser er samanveksing av to eller fleire virvlar. Dette involverer både endring i vekstsonene til virvlane, og omdanning av det geleaktige ryggstrengvevet i intervertebralromma til brus som seinare vert mineralisert (Witten et al., 2006). Komprimerte virvlar vert enten meir komprimerte eller utviklar seg til ankyloser over tid (Fjellidal et al., 2007 a). Ankyloser kan og forverre seg over tid. Dette skjer ved at nabovirvlane til ankylosane vert dratt med i samanveksinga. På den andre sida er det og blitt vist at ankylosane kan bli remodelert til ein strukturelt sett normal virvel med fleire neuralboger (Witten et al., 2006). Dislokerte virvlar har vist seg å kunne gi opphav til kompresjonar og ankyloser over tid (Fjellidal et al., 2007 a).

Det har blitt utført mange studium for å finne årsakene til deformatsjonsdanninga hjå oppdretta atlantehavslaks. Fleire risikofaktorar har blitt påvist i tidlegare forsøk. Desse faktorane inkluderer blant anna genetisk disposisjon (McKay & Gjerde, 1986), inkubering av rogn ved høge

vasstemperaturar (Wargelius et al., 2005), liten smolt (Vågsholm & Djupvik, 1998), fosformangel (Bæverfjord & Åsgard, 1998, Vielma & Lall, 1998, Fjelldal et al., 2008), vaksinerings (Vågsholm & Djupvik, 1998, Berg et al., 2006 a) og bruk av haustsmolt (Fjelldal et al., 2006). Ved vaksinerings med olje-adjuvant vaksine er det t.d. vist at fiskestorleik og tidspunktet for vaksinerings er viktig (Vågsholm & Djupvik, 1998, Berg et al., 2006 a). Vasstemperaturen i den første perioden etter vaksinerings er òg blitt foreslått som ein miljøfaktor som kan påverke vaksineeffekten på deformasjonsdanninga hjå atlantehavslaks (Berg et al., 2006 a; b). Både felt- og eksperimentelle studiar har vist at det er ein høgare frekvens av ryggdeformasjonar hos laks produsert som haustsmolt enn som vårs smolt (Djupvik, 2005, Fjelldal et al., 2006). Det har òg blitt vist at haustsmolt har lågare mineralinnhald og mekanisk styrke i virvlane enn vårs smolt, og at det er ein signifikant korrelasjon mellom desse parameterane (Fjelldal et al., 2006). Vidare har Fjelldal et al. (2008) vist at eit suboptimalt mineralinnhald i dietten i den tidlege sjøvassperioden gir låg virvelstyrkje og lågt mineralinnhald i virvlane, og fører til utvikling av virvelkompresjonar i haleregionen hjå haustsmolt. I sambinding med det låge mineralinnhaldet som Fjelldal et al. (2006) fann i virvlane til haustsmolten, vart det òg funne høge plasmakonsentrasjonar av kalsium og fosfat. Då fleire forsøk har vist at mineralinnhaldet i plasma varierer med mineralinnhaldet i dietten (Vielma & Lall, 1998, Fjelldal et al., 2008) kan dette kan moglegvis skuldast auka mineralopptak frå diett og vatn i eit forsøk på å auke beinmineraliseringa, eller det kan vere eit resultat av auka beinremodellering hjå haustsmolt. Mineralinnhaldet i blodprøvar kan difor vere interessant i forbinding med å studere mineralbalansen og mineralopptaket til laks. Haustsmolt har høgare vasstemperatur enn vårs smolt både under smoltifisering og i den tidlege sjøvassfasen, og veks difor hurtigare enn vårs smolt i desse periodane. Det er difor mogleg at den høge deformasjonsraten hjå haustsmolt òg kan skuldast den raske veksten i dette tidsrommet (Fjelldal et al., 2005). Korleis vasstemperatur under smoltifisering og tidleg sjøvassfase påverkar utviklinga av virveldeformasjonar har ikkje vore undersøkt eksperimentelt, og heller ikkje korleis vaksinasjon verkar inn på dette.

Måla med dette forsøket var difor å undersøke i eit kontrollert eksperiment korleis vaksinasjon i kombinasjon med ulike temperaturregime gjennom smoltifisering og tidleg sjøvassfase påverkar (i) virvelmineralisering og mineralbalanse; (ii) virvelmorfologi og vekstmønsteret til virvelsøyla; og (iii) utviklinga av virveldeformasjonar.

2. Material og metode

Temperaturforsøket med haustsmolt av atlantehavslaks (*Salmo salar L.*) vart utført ved Havforskningsinstituttet i Matre, frå 04.09.2006 til 21.08.2007. For å belyse korleis vaksine i kombinasjon med ulike temperaturar påverka (i) virvelmineralisering og mineralbalanse; (ii) virvelmorfologi og vekstmønsteret til virvelsøyla; og (iii) utviklinga av virveldeformasjonar, vart tetraplikate grupper med vaksinert og uvaksinert haustsmolt oppdretta ved ulike temperaturregime gjennom dei 6 siste vekene før overføring til saltvatn og dei 6 første vekene etter overføring til saltvatn, og deretter oppdretta under like miljøforhold fram til slaktestorleik. Virvelmineralisering og mineralbalanse vart undersøkt under smoltifisering og tidleg sjøvassfase ved å måle mineralinnhald og kalsium og fosfor i virvlar, og kalsium og fosfor i serum. Virvelmorfologi og vekstmønster av virvelsøyla vart undersøkt ved å måle virvellengd, forhold mellom lengd og diameter på virvlane og storleik på intervertebralromma både ved smoltifisering, tidleg sjøvassfase og slakt. Utvikling av virveldeformasjonar vart undersøkt ved hjelp av røntgenundersøking ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase, og ved hjelp av palpering og røntgenundersøking ved slakt.

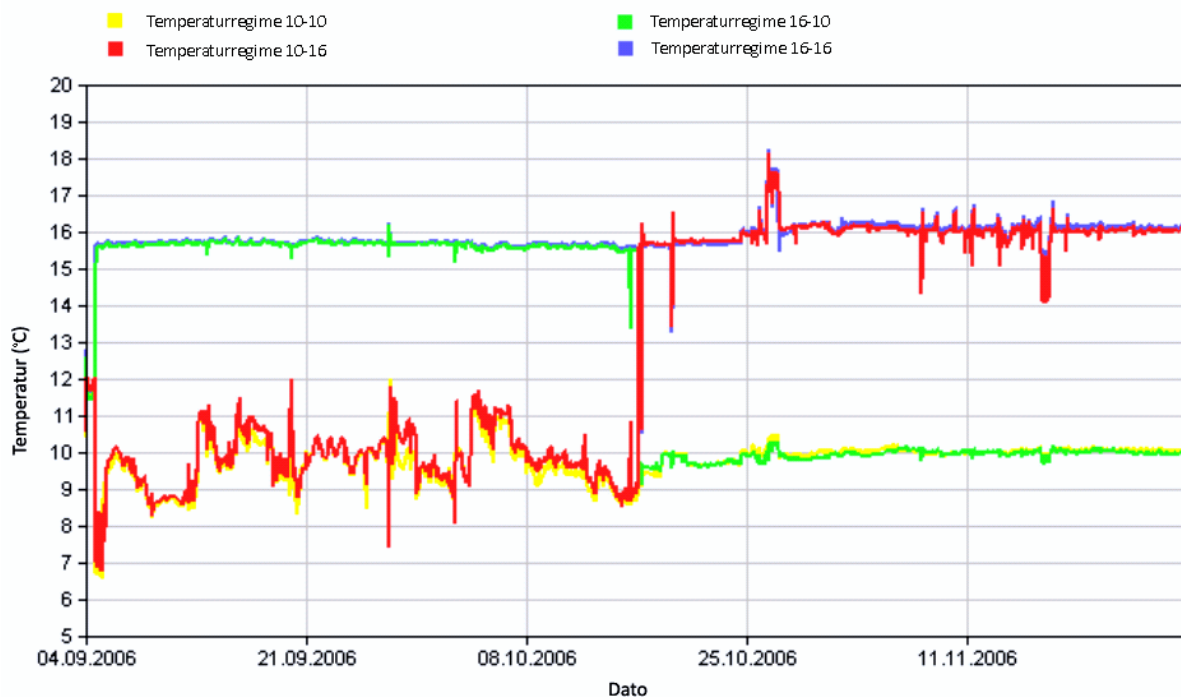
2.1 Fiskestamme og oppdrettsforhold før forsøksstart

Atlantehavslaksen som vart brukt i forsøket var av Mowi-stamme (FoMAS, 2006) frå Marin Harvest på Tysnes. Rogna vart inkubert på temperaturar mellom 2,4 – 7,9 °C. Fisken vart klekt i tidsrommet 03.02.06 - 10.02.06, og sett på startfôring 15.03.06. Fisken vart fôra til metting med vanleg kommersielt fiskefôr (appendiks A; Tab. A1). Etter ein vekstperiode på sju veker med kontinuerleg lys, fekk parren ein kunstig vinterperiode med 12 timar lys og 12 timar mørke. Vinterperioden varte i ni veker, fram til forsøksstart 04.09.06.

2.2 Eksperimentelt oppsett

Eksperimentet gjekk over 46 veker, først 12 veker med temperaturmanipulering og kontinuerleg lys i innandørs kar, og deretter 36 veker med naturlege lys og temperaturforhold i ein 12x12x12 m merd. Av dei 12 vekene med temperaturmanipulering, var dei seks første vekene i ferskvatn og dei seks neste i saltvatn. Ved forsøksstart vart 1936 parr med ei gjennomsnittsvekt på 36,25 g (\pm SD 3,58) tilfeldig fordelt på 16 kar, slik at det vart 121 fisk per kar. Fire kar vart sett på ca 10 °C i ferskvassperioden og deretter ca 10 °C i saltvassperioden, fire kar på ca 10 °C i ferskvassperioden og ca 16 °C i saltvassperioden, fire kar på ca 16 °C i ferskvassperioden og ca 10 °C i saltvassperioden, og fire kar på ca 16 °C i ferskvassperioden og ca 16 °C i saltvassperioden. Det let seg ikkje gjere å halde

temperaturane konstante over heile forsøksperioden, og dei registrerte temperaturane frå dei ulike temperaturregima er vist i Fig. 3. Halvparten av fisken i kvart kar vart vaksinert intra-peritonealt med 0,1 ml olje-adjuvant vaksine (Norvaks® Compact 6, batch nr 5912501, Intervet Norge AS, Bergen, Noreg) i buken. Den andre halvparten vart merka med feittfinneklipp for å skilje dei frå dei vaksinerte. Vaksineringa vart utført fire dagar etter forsøksstart. Etter dei 12 vekene i innandørs kar, vart fiskane bukfinneklipt for å skilje dei ulike temperaturregima frå kvarandre, og overført til ei 175 m³ merd på sjøen.



Figur 3: Temperaturar i forsøkskara som dei ulike eksperimentelle gruppene vart oppdretta ved. Alle kara innafør same temperaturregime fekk vatn frå same blandestokk, og hadde dermed same temperatur. Den låge ferskvasstemperaturen, som vart styrt ved å blande råvatn frå elva med små mengder oppvarma ferskvatn, varierte med temperaturane i elva. Ferskvatnet med høg temperatur, som var ei blanding av oppvarma ferskvatn og små mengder ikkje-temperert råvatn, og saltvatnet med låg temperatur, som var ei blanding av ikkje-temperert sjøvatn og mindre mengder oppvarma sjøvatn, varierte lite. Saltvatnet med høg temperatur, som var ei blanding av oppvarma saltvatn og små mengder ikkje-temperert saltvatn, hadde eit par små temperaturhopp grunna problem med temperaturreguleringa på oppvarma sjøvatn.

I resten av oppgåva vert dei eksperimentelle gruppene symbolisert som 10-10U, 10-10V, 10-16U, 10-16V, 16-10U, 16-10V, 16-16U og 16-16V etter kva temperatur dei fekk i høvesvis ferskvassfasen og den tidlege sjøvassfasen, og om dei var uvaksinert (U) eller vaksinert (V).

2.3 Oppdrettsforhold ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase

Dei 12 første vekene av forsøket vart utført i kvite, firkanta kar av storleik 1×1×1 m med lokk. Kwart kar hadde ei lyskjelde montert i lokket. Dei fire fyrste vekene vart det brukt ei 40W pære (OSRAM Classic A, OSRAM GmbH, Augsburg, Tyskland) og deretter to 18 W lysrøyr (OSRAM L 18W/840 LUMILUX, OSRAM GmbH, Augsburg, Tyskland). Pærene var ei reserveløysing som følgje av sein levering av lysrøyra, og vart bytta ut midt i forsøket grunna problem ved vasssprut. Forsøkshallen hadde tilgang på oppvarma, nedkjølt og ikkje-temperert ferskvatn og sjøvatn. Dei ulike vasstilførslane kunne blandast i ein blandestokk for å få den temperaturen ein ynskte (Fig. 3). Vatnet vart lufta i kolonnelufterar etter blandinga i blandestokken. Fire og fire kar fekk vatn frå same blandestokk, slik at parallelle kar fekk nøyaktig like vasstemperaturar. Vasstilførselen (appendiks A; Fig. A1), som vart målt ved å ta tida det tok for vatnet å stige 3 cm i karet etter nedtapping, vart justert slik at det var minimum 75 % O₂ i avløpet frå kvart kar (appendiks A, Tab. A2). pH i avløpsvatnet frå kvart kar vart målt ein gong i veka ved hjelp av pH-meter (MP 120, Mettler-Toledo international Incorporated, Greifensee, Sveits; appendiks A; Fig. A2). Kwart kar var utstyrt med ein fôringsautomat (ARVO-TEC T Drum 2000, Point Four Systems Incorporated, Coquitlam, Canada) som fôra kontinuerleg gjennom heile døgeret med eit kommersielt fôr (appendiks A; Tab. A1). Fôringsmengda var sett til 2,5 % av biomassen per dag, noko som var over metting. Eit datasystem (sentral driftskontroll, Normatic AS, Norfjordeid, Norge) målte kontinuerleg temperaturen i vatnet frå kvar blandestokk.

Det var låg daudleik i kara. I løpet av ferskvassperioden døydde ingen fisk i 10-10, 16-10 og 16-16 temperaturregima. Eit tilfelle der vasstraumen stoppa i omtrent 1 time grunna tekniske feil, førte til at 3 av 463 fisk frå 10-16 temperaturregimet hoppa ut av kara og døydde. For å unngå at oksygenivået vart for lågt vart det spylt ferskvatn frå brannslangane ned i kara, noko som sannsynlegvis verka stressande på fisken. I den tidlege sjøvassperioden døydde 1 av 364 fisk i 16-10 temperaturregimet og 4 av 324 fisk frå 16-16 temperaturregimet. Det var ingen kjente årsaker til desse dødsfalla.

2.4 Oppdrettsforhold i merd

All fisken som var igjen etter karperioden (1000 individ) vart overført til ei merd inst i Masfjorden 30.11.06. Merda var utstyrt med eit sentralfôringsssystem (ARE-126, modell 1999/2001 (oppgradert), Austevoll Elektro Mekaniske A/S, Austevoll, Noreg) som fôra to måltid per dag (60 % formengd om morgon og 40 % fôrmengd om ettermiddag) med eit kommersielt fôr (appendiks A; Tab. A1). Fôringsmengda vart justert etter temperatur og fiskestorleik. Frå overføring til merd til slutten av desember vart fôringsmengda haldt til mellom 2,0 og 2,4 % av biomassen per dag. Fram mot byrjinga

av august neste år vart fôringsmengda gradvis justert ned til rundt 1,4 %, og vart deretter haldt ved 0,8 % dei siste to vekene av forsøket. Ein tabell for utfôring som prosent av biomasse per dag er lagt ved i appendiks A, Tab A3. Kvar arbeidsdag vart sjøtemperaturane målt kvar heile meter frå 1 m djup til 10 m djup (YSI modell 30, YSI Incorporation, Ohio, USA). Ved overføringa var gjennomsnittstemperaturen frå 1 m til 10 m djup 9,7 °C. Frå desember til midten av mars (13.03.07) varierte den for det meste mellom 8 °C og 10 °C. Deretter sank temperaturen til mellom 6 °C og 8 °C fram til midten av mai (18.05.07), og auka så gradvis til 12 °C i slutten av juni (25.06.07). Temperaturane auka deretter raskt til rundt 14 °C, og i mesteparten av juli og august låg temperaturane mellom 14 og 16 °C (appendiks A, Fig. A3). I løpet av dei 36 vekene fisken gjekk i merd, døydde 9 av dei 1000 individa. Årsaka til dødsfalla er ikkje kjent, men daudleiken vart sett på som låg.

2.5 Prøveuttak

Det vart utført seks prøveuttak under forsøksperioden; (1) ved forsøksstart (seks veker før sjøvassoverføring), (2) tre veker før sjøvassoverføring, (3) ved sjøvassoverføring, (4) tre veker etter sjøvassoverføring, (5) seks veker etter sjøvassoverføring og (6) 42 veker etter sjøvassoverføring (Tab. 1). All kjønnsmoden fisk vart utelatt frå studiet.

Lengd og vekt vart målt ved forsøksstart, sjøvassoverføring, seks veker etter sjøvassoverføring og 42 veker etter sjøvassoverføring (Tab 1). Lengd vart målt som gaffellengd (lengd mellom snuta sitt yttste punkt og hakket i halefinna) til nærmaste millimeter. Vekta vart målt som våtvekt til nærmaste 10^{-2} g. I dei første uttaka (1,3 og 5) var fiskane bedøvd med benzocain (40 mg L^{-1}) (Benzoak® Vet, A.C.D. SA, Braine-L'alleud, Belgia) før måling, og sloppe tilbake i kara. Ved siste uttak (42 veker etter sjøvassoverføring) vart fiskane avliva med eit slag til hovudet før måling.

Kondisjonsfaktor vart berekna ved $100V / L^3$

der V = vekt i gram og L = gaffellengde i cm (Bagenal & Tesch, 1978).

Spesifikk vektauke, SGR vart berekna som $(e^G - 1) * 100$ (Houde & Scheckter, 1981),

der $G = (\ln V_2 - \ln V_1) / (t_2 - t_1)$, der V_2 og V_1 er gjennomsnittleg vekt ved dag t_2 og t_1 (Bagenal & Tesch, 1978). Sesifikk vektauke vert berre kalla vektauke i resten av oppgåva.

Absolutt dagleg lengdevekst, mm dag^{-1} , vart berekna som $(L_2 - L_1) / (t_2 - t_1)$,

der L_2 og L_1 er gjennomsnittleg gaffellengde ved dag t_2 og t_1 (Ricker, 1979). Absolutt dagleg lengdeveksten vert berre kalla lengdevekst i resten av oppgåva.

I dei fem første uttaka vart det tatt blodprøvar av eit utval fisk for kalsium og fosfatanalysar (Tab. 1). Fisken vart bedøvd, målt for lengde og vekt, tatt blodprøve av og avliva med eit slag mot hovudet. Blodprøvene vart sentrifugert på 2500 rpm i 10 min (Jouan A14 microfuge and rotor med 188 mm diameter, Jouan, St-Herblain, Frankrike) ved romtemperatur. Serumet vart separert innan fire timar, og deretter fryst ned på -20 °C for seinare analysar.

Ved forsøksstart, sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring vart det tatt ut fisk til røntgenfotografering og mineralanalysering av ryggvirvlar (Tab. 1). Desse fiskane vart fryst ned på -20 °C for seinare analysing.

Ved sluttuttaket (42 veker etter sjøvassoverføring) vart fisk undersøkt for ytre teikn på ryggvirveldeformasjonar ved hjelp av palpering. Fisk med ytre teikn på ryggdeformasjonar vart klassifisert som fisk med deformasjonar i fremre del av ryggsøyla (mellom bakre kant av gjellelokket og bakre kant av ryggfinna) og fisk med deformasjonar i bakre del av ryggsøyla (bak bakre kant av ryggfinna) (sjå døme i Fig. 26). Det vart òg tatt ut fisk til røntgenfotografering (Tab. 1).

Tabell 1: Tabellen viser talet av høvesvis vaksinert og uvaksinert fisk som vart brukt til ulike undersøkingar og vevsprøvar per temperaturregime per prøvetidspunkt. Tala i parentes er talet på undersøkt fisk per kar. Veke angir veke før/etter sjøvassoverføring.

Dato	04.09.06	25.09.06	16.10.06	06.11.06	27.11.06	21.08.07
Veke	-6	-3	0	3	6	42
Lengd og vekt	128* (32)	16 (4)	131-154 (31-39)	16 (4)	153-162 (35-41)	68-94
Blodprøvar	39**	16 (4)	16 (4)	16 (4)	16 (4)	
Virvelprøvar	39**		16 (4)		16 (4)	
Røntgen	39**		32 (8)		32 (8)	48-54
Palpering						68-94

*Fisken var fordelt på temperaturregime, men enno ikkje vaksinert. Talet angir totalt mengd fisk tatt ut per temperaturregime.

**Fisk tatt ut rett fordeling i temperaturregime (0-uttak).

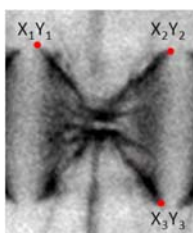
2.6 Røntgenfotografering og analysing av virvelmorfologi

Fisk frå ferskvassfasen og tidleg sjøvassfase som skulle røntgenfotograferast (Tab. 1) vart tatt ut av frysaren, tint over natt og filetert ved hjelp av skalpell (Carbon steel surgical blades no 10, Swann-Moston limited, Østerrike). Fisk frå sluttuttaket (veke 42) vart filetert fersk ved hjelp av kniv. Deretter vart rygggradene lagra over natt på kjøll (4 °C) i isoporkassar og røntgenfotografert neste dag. Bileta vart tatt med eit berbart røntgenapparat (Collimax x-ray collimator, modell R-120 H, collimax

corporation, Tokyo, Japan). Til røntgenbileta under smoltifisering og den tidlege sjøvassfasen vart det brukt ein 30 × 40 cm film (Kodak M100, KODAK S.A., Paris, Frankrike), som vart eksponert 15 gongar med 50 mAs og 40 kV. Røntgenapparatet var plassert 100 cm over filmen. 42 veker etter sjøvassoverføring var ryggskylene så lange at bileta måtte takast på to 30 x 40 cm filmar (FUJIFILM IX 50, FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan). Røntgenapparatet var plassert 122 cm over filmen, som vart eksponert to gonger med 50 mAs og 68 kV. Negativa vart framkalla manuelt ved hjelp av ein manuell framkallar (Cofar Cemat C56D, Arcore (MI), Italia) med Kodak Professional framkallar- og fikseringsvæske (KODAK S.A., Paris, Frankrike). Bileta vart deretter digitalisert ved skanning (Epson expression 10000 XL, Seiko Epson Corp., Nagano-Ken, Japan) og arbeidd vidare med i Adobe Photoshop 6 (Adobe systems incorporated, San Jose, California, USA).

All røntgenfotografert fisk vart undersøkt for deformasjonar. Virvlar som ikkje hadde den typiske X forma på røntgenbileta (sjå døme i Fig. 4 & 27 A), men såg meir ut som II,][eller K, vart klassifisert som komprimerte (sjå døme i Fig. 27 B, C, D & E) (Witten et al., 2005, Fjellidal et al., 2007 a). Virvlar utan mellomrom på røntgenbileta vart klassifisert som ankyloser (sjå døme i Fig. 27 D, E & F) (Witten et al., 2006. Fjellidal et al., 2007 a). Dislokasjonar, virvlar som låg ute av stilling (sjå døme i Fig. 27 F), vart berre registrert frå sluttuttaket 42 veker etter sjøvassoverføring, då det var uvisst korleis gjentatt frysing og tining ved dei første uttaka påverka stabiliteten til ryggraden. Deformasjonane vart notert etter individ, virvelregion og virvelnummer.

All fisken som vart røntgenfotografert ved forsøksstart (veke -6), og halvparten av fisken som vart røntgenfotografert ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6), vart undersøkt for endringar i virvelmorfologi og mineralinnhald. Forholdet mellom virvellengd (i hovud mot hale retning) og virveldiameter (dorso-ventral), og lengd av intervertebralrom, vart målt frå røntgenbileta i ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental health, Bethesda, Maryland, USA) og rekna ut ved hjelp av Pytagoras setning frå XY-koordinatar (Fig. 4): Virvellengd (VL): $((X_2-X_1)^2+(Y_2-Y_1)^2)^{0,5}$, Virveldiameter (VD): $((X_3-X_2)^2+(Y_3-Y_2)^2)^{0,5}$, Lengd intervertebralrom (M): $((X_{1\text{ virvel }2}-X_{2\text{ virvel }1})^2+(Y_{1\text{ virvel }2}-Y_{2\text{ virvel }1})^2)^{0,5}$. Ryggskylulengd: sum av individets virvellengder og intervertebralromlengder.



Figur 4: Plassering av XY-koordinatar på røntgenbilete av ryggvirvel.

2.7 Måling av mineralinnhald og estimering av proteininnhald i virvlar

Virvel nr 40-43 vart dissekert ut og vaska grundig med neglebørste og varmt (~40 °C) vatn til alt synleg bindevev og muskulatur var fjerna. Hemalbogane og ryggstrengen vart fjerna med skalpell (Carbon steel surgical blades no 11, Swann-Moston limited, Østerike). Virvlane frå kvar fisk vart samla til ein prøve, avfeitta i 20 ml 2:1 volumforhold aceton-kloroformløysning (inspirert av Chappard et al., 2006, utarbeida på Havforskningsinstituttet av Ane Grini etter utprøving av fleire avfeittingsmiddel, Appendiks D). Deretter vart virvlane tørka i 100 °C over natt og brent i muffelomn (modell L 40/11/P320, Nabertherm GmbH, Bremen , Tyskland; 115 °C i 0,5 t, 540 °C i 4 t, og 750 °C i 6 t) i forbrente diglar. Virvlane vart vegd til nærmaste 10^{-2} mg (XS204, Mettler-Toledo international Incorporated, Greifensee, Sveits) etter tørking og etter brenning. Ryggvirvlane består av feitt, protein, mineral og beinceller (Nordvik et al. 2005), så etter vasking, avfeittning og tørking skal det berre vere protein, mineral og litt beinceller igjen av virvlane. Brenninga i muffelomnen fjernar alt av organisk materiale, slik at det berre er mineral igjen. Mineralvekta vert difor gitt av vekta på oska, medan proteinvekta vert estimert som differansen mellom tørrvekta og mineralvekta (Fjelldal et al., 2007 a).

Mineralinnhald vart bestemt som $(\text{oskevekt} * 100) / (\text{tørrvekt})$ (Fjelldal et al., 2007 a).

Mineralvektauke og estimert proteinvektauke vart berekna ut frå høvesvis gjennomsnittleg mineralvekt per kar og gjennomsnittleg estimert proteinvekt per kar etter formelen for vektauke:

$(e^G - 1) * 100$ (Houde & Scheckter, 1981), der $G = (\ln \text{ til sluttvekta} - \ln \text{ til startvekta}) / \text{dagar}$.

2.8 Måling av kalsium og fosfor i virvlar

Oske frå brente virvlar vart løyst opp i 65 % salpetersyre, HNO_3 (100 μl per mg oske), og sett i varmeskap ved 50 °C i ein time for at alt skulle løyse seg opp (Persson et al., 1997). Prøvane vart deretter justert for pH og fortynna 1:35 med 0,357 M natriumhydroksid, NaOH. Alle prøvane vart samla i ein stor pose og fryse ned på -20 °C før vidare analysering.

Kalsium vart målt i flatbotna 96-brønnsplater (9017 EIA/RIA plate, Corning Incorporated, New York, USA) ved hjelp av ein kalsiumreagenspakke (QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (DICA- 500), BioAssay System, Hayward, California, USA) og ein platelesar (Sunrise-basic Tecan, Tecan Austria GmbH, Grödig, Østerike). Både standardar, prøvar og kontrollar vart målt i duplikate brønnsplater, og prøvar med prosentavvik ($(\text{differanse} / \text{gjennomsnitt}) * 100$) over 8 vart målt på nytt. Standardane (5000 μM , 4000 μM , 3000 μM , 2000 μM , 1500 μM , 1000 μM og 500 μM) og kontrollane (750 μM , 2500 μM , 4500 μM)

vart laga ved å fortynne ein 5000 μM kalsiumkloridløysing (CaCl_2) med destillert vatn. Reagenskittet inneheldt fenolsulphonephthalein, eit fargestoff som danna eit blåfarga kompleks med fritt kalsium. Intensiteten av blåfargen, som er direkte proporsjonal med kalsiumkonsentrasjonen i prøven, vart målt spektrofotometrisk ved 612 nm etter 30 min inkubasjon i romtemperatur. Alle prøvane vart målt i tilfeldig rekkefølge for å minimere påverknadane av eventuelle skilnader mellom målingane.

Fosforprøvane vart fortynna 1: 120 vidare frå den pH-justerte fortynninga (totalt fortynna 1: 4200 frå salpetersyreløysinga) og målt i flatbunna 96-brønnsplater (9017 EIA/RIA plate, Corning Incorporated, New York, USA) ved hjelp av ein fosforreagenspakke (QuantiChrom™ Phosphate Assay Kit (DIPI-500), BioAssay System, Hayward, California, USA) og same platelesar som kalsiumprøvane. Standardar, blank, prøvar og kontrollar vart målt i duplikate brønner, og prøvar med prosentavvik over 8 vart målt på nytt. Standardane (20 μM , 15 μM , 10 μM , 5 μM) og kontrollane (7,5 μM , 12,5 μM , 17,5 μM) vart laga ved å fortynne ein 30 μM kaliumfosfatløysing (K_3PO_4) med destillert vatn. Reagenskittet inneheld ammoniummolybdate ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) og malakitt ($\text{CuCO}_2 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$), som saman lagar eit stabilt, grønfarga kompleks med uorganisk fosfat, PO_4^{3-} . Intensiteten av grønfargen vart målt spektrofotometrisk ved 620 nm etter 25 min inkubasjon i romtemperatur. Alle prøvane vart målt i tilfeldig rekkefølge.

2.9 Måling av kalsium og fosfor i serum

Fritt kalsium og uorganisk fosfat vart målt i høvesvis ufortynna serum og 1:400 fortynning med destillert vatn, med same utstyr og framgangsmåte som beinprøvane.

2.10 Statistiske analysar

Statistiske analysar vart utført i STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Alle målte data vart sjekka for normalfordeling ved hjelp av grafisk presentasjon av frekvensfordeling og p-p plot (observert akkumulert distribusjon mot forventa akkumulert distribusjon), og testa for homogen varians med Levenes test.

Lengd, vekt, kondisjonsfaktor, mineralinnhald i virvlar, kalsium og fosfor i blodprøvar og virvlar, og molart Ca/P-forhold i virvlar, vart testa med hierarkisk tovegs ANOVA med individ nøsta i kar.

Virvelmorfologi ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase (lengd/diameterforhold av virvlane og lengda på intervertebralrommet) vart analysert som snitt per region per fisk, med hierarkisk tovegs ANOVA og individ nøsta i kar. Intervertebralrom mellom virvel nr 40 og 44 ved sluttuttak (veke 42) vart

analysert med hierarkisk tovegs ANOVA med individ nøsta i kar, på gjennomsnittleg intervertebralrom per individ. Lengd/diameterforhold i virvlane 42 veker etter sjøvassoverføring vart analysert med hierarkisk tovegs ANOVA med individ nøsta i kar, på arcsinus transformert gjennomsnittleg lengd/diameterforhold i virvel nr 40 – 43 per individ. Lengd/diameterforholdet vart transformert for å få data normalfordelt. Dette vart gjort for å sleppe å analysere fleire ikkje-parametriske einvegs testar. Då rådata ikkje var normalfordelt, vart likevel data presentert i figur med median som mål middelverdi, og 25 – 75 persentilar og minimum og maksimumverdiar som spreining. I alle dei nemnde statistiske testane var individ den eksperimentelle eininga. Lengdevekst, vektauke, mineralvektauke og proteinvektauke i virvlar vart testa med tovegs ANOVA frå gjennomsnittverdiane til parallellane (kara). ANOVA vart brukt sjølv om kravet om homogen varians ikkje alltid var oppfylt (appendiks C, tabell C11; C27; C34 og C41). Dette vart gjort fordi ANOVA er ganske robust mot brot på denne føresetnaden så lenge det er tilnærma lik prøvestorleik i alle gruppene (Hatcher & Stepanski, 1994). Eit signifikansnivå på $p < 0,05$ vart brukt i alle analysane. Ved signifikante resultat i ANOVA testane, vart Newman-Keuls test nytta for å samanlikne gruppene. For å syna kva grupper som var, eller ikkje var, signifikant forskjellige frå kvarandre, vart gjennomsnitt som var signifikant forskjellige frå kvarandre merka med ulike små bokstavar. Til dømes er middelverdiar merka med "a" signifikant større enn middelverdiar merka med "b", medan middelverdiar merka med "ab" ikkje er signifikant forskjellig frå nokon av dei. I tilfeller der ANOVA-testar syna signifikant effekt av enten temperatur eller vaksine, medan Newman-Keuls test ikkje gav signifikant forskjell mellom gruppene (sannsynlegvis fordi multiple samanlikningstestar tar i betraktning at fleire enn to gjennomsnitt vert samanlikna) vart alle gjennomsnitta merka med same bokstav.

Korrelasjon mellom intervertebralrom og mineralinnhaldet i virvlane, og korrelasjon mellom lengd/diameterforhold og mineralinnhald i virvlane vart utført med Pearson produkt-moment korrelasjon.

Innslaget av fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar, og innslaget av fisk med virveldeformasjonar basert på røntgenundersøking, vart analysert mot ein nullhypotese om ingen forskjell med Pearsons kji-kvadrattest. Effekten av temperatur vart testa på vaksinert og uvaksinert fisk kvar for seg, og effekten av vaksine vart testa på kvar temperaturregime for seg. Dersom temperaturregima viste signifikant forskjellig fordeling vart temperaturregima testa mot kvarandre med 2×2 Pearson kji-kvadrattest og sekvensielle Bonferronikorrigerede p-verdiar.

Mengd deformerte virvlar per individ vart analysert med fleire ikkje-parametriske einvegs variansanalysar i mangel på alternative ikkje-parametriske tovegs analysar i statistikkprogrammet. Effekten av temperatur vart analysert med Kruskal-Wallis test for vaksinert og uvaksinert fisk kvar for seg. Dersom p-verdien var signifikant vart temperaturregima testa mot kvarandre med ein multiple median-samanlikningstest. Effekten av vaksine innafor kvart temperaturregime vart testa med Man-Witney U-test. 42 veker etter sjøvassoverføring vart mengd deformerte virvlar pr individ berre analysert hjå deformert fisk. Dette vart gjort for å unngå at signifikante forekjellar i innslaget av deformerte individ skulle påverke resultatet.

3. Resultat

3.1 Vekst

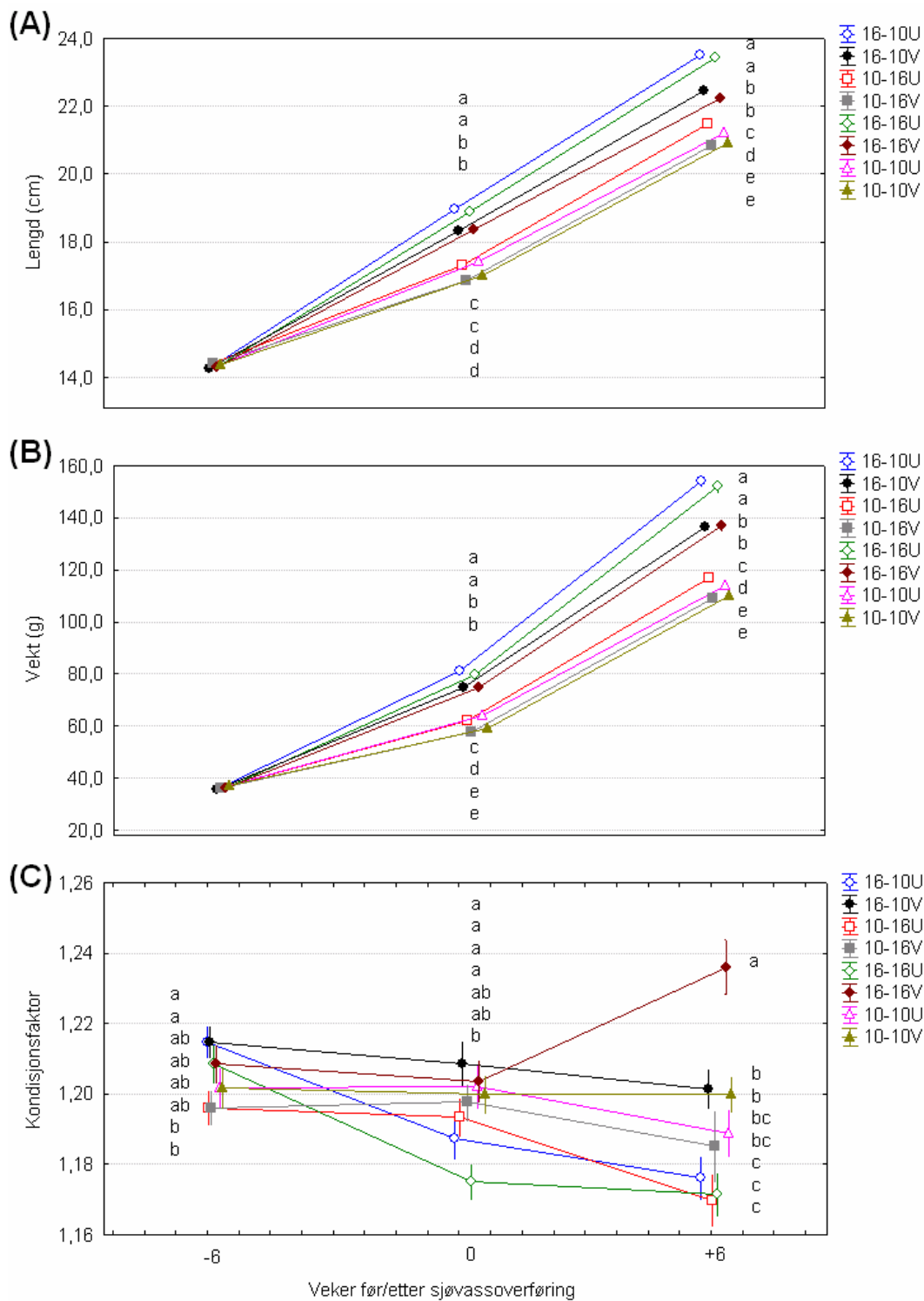
3.1.1 Vekst under smoltifisering og tidleg sjøvassfase

Ved forsøksstart (veke -6) var det ingen signifikant forskjell i lengd og vekt mellom dei ulike temperaturregima (Fig. 3 A, B og Tab. 2). Kondisjonsfaktoren derimot, var signifikant høgare i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 temperaturregimet (Fig. 5 C).

Ved sjøvassoverføring (veke 0) hadde både temperatur og vaksine gitt ein signifikant effekt på lengd og vekt (Fig. 5 A, B, Tab. 2). Både høvesvis uvaksinert og vaksinert fisk var signifikant lengre og tyngre i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima, og vaksinert fisk var signifikant kortare og lettare enn uvaksinert innafor alle temperaturregima (Fig. 5 A, B). Vaksinerings, men ikkje temperatur, hatt ein signifikant effekt på kondisjonsfaktoren (Fig. 5 C, Tab. 2). Det hadde og vore eit signifikant samspel mellom temperatur og vaksineeffektane (Tab. 2), slik at vaksinerings hadde ein tendens til å auke kondisjonsfaktoren hjå fisk som vart haldt på 16 °C, medan det ikkje hadde nokon effekt hjå fisk som vart haldt ved 10 °C i ferskvassperioden. Det var likevel berre i 16-16 temperaturregimet at forskjellen mellom vaksinert og uvaksinert fisk var signifikant (Fig. 5 C).

Tabell 2: p-verdiar frå ANOVA-test på lengd, vekt og kondisjonsfaktor ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. Seks veker før sjøvassoverføring vart vekstparametrane analysert med einvegs ANOVA, då fiskane ikkje var vaksinerte ved dette tidspunktet. Ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring vart parametrane analysert med tovegs ANOVA. Ved alle tidspunkta vart individ nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar. Fullstendige statistiske testar for lengd, vekt og kondisjonsfaktor er vist i appekdiaks C, Tab. C1-C6.

Analytt	Variabel	Veke før/etter sjøvassoverføring		
		-6	0	6
Lengd	Temperatur	0,0597	0,0000	0,0000
Lengd	Vaksine		0,0000	0,0000
Lengd	Interaksjon		0,4988	0,0079
Vekt	Temperatur	0,0914	0,0000	0,0000
Vekt	Vaksine		0,0000	0,0000
Vekt	Interaksjon		0,6616	0,0121
K-faktor	Temperatur	0,0266	0,1569	0,0183
K-faktor	Vaksine		0,0018	0,0000
K-faktor	Interaksjon		0,0249	0,0033



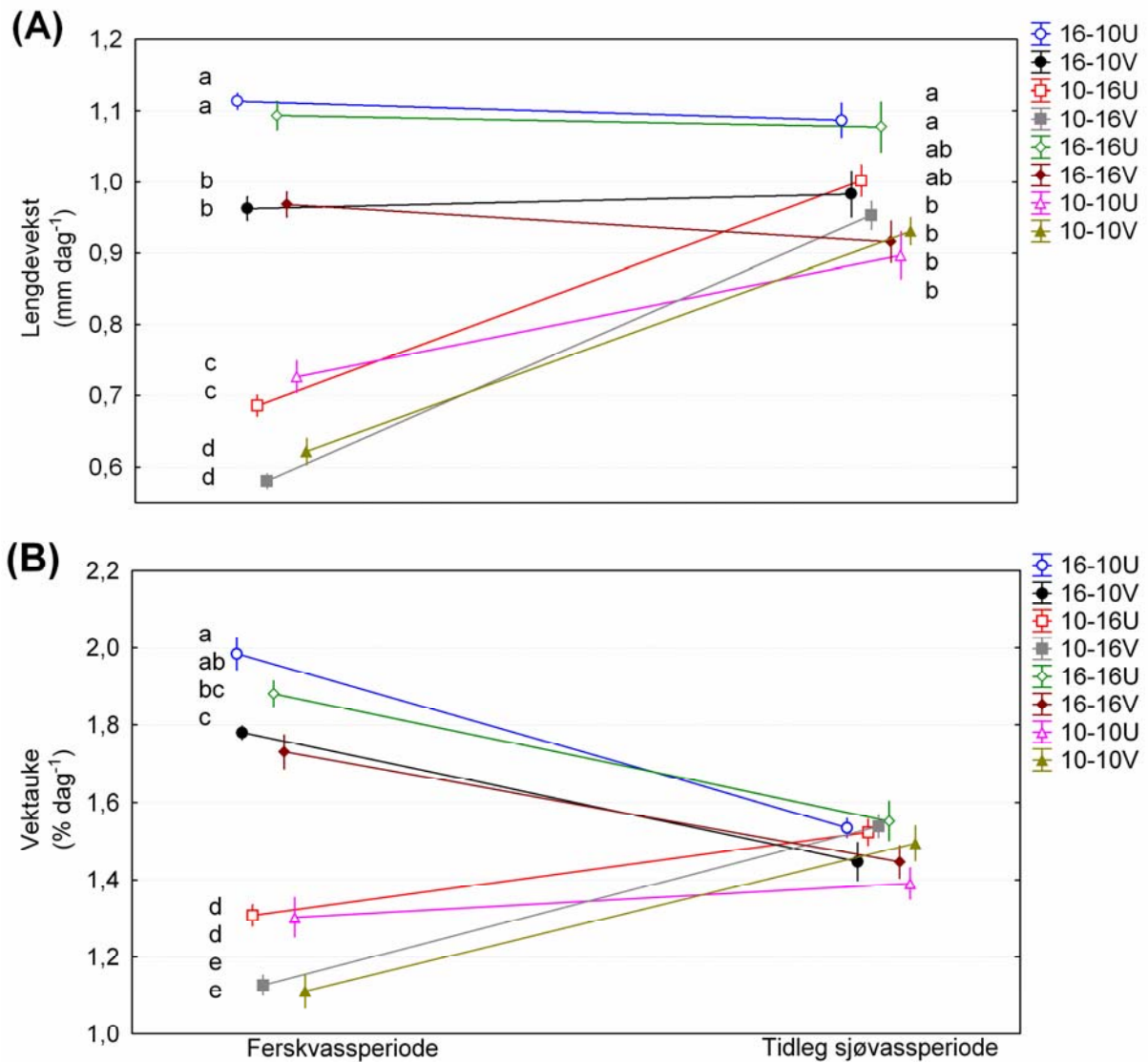
Figur 5: Lengd (A; gjennomsnitt \pm S.E.), vekt (B; gjennomsnitt \pm S.E.) og kondisjonsfaktor (C; gjennomsnitt \pm S.E.) hjå haustsmolt ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase (n = 128 ved veke -6, og 131 – 162 i veke 0 og veke +6). Då fisken ikkje var vaksinert ved forsøksstart, vert vaksinerte grupper vist som identiske med uvaksinerte innafor i temperaturregima i veke -6. Gjennomsnitt med same små bokstavar innafor ei gitt veke er ikkje signifikant forskjellig ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

Seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) hadde både temperatur og vaksine hatt ein signifikant effekt på lengd og vekt (Fig. 5 A, B, Tab. 2). Både høvesvis uvaksinert og vaksinert fisk i 16-16 og 16-

10 temperaturregima var signifikant lengre og tyngre enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima. I tillegg var uvaksinert fisk i 10-16 temperaturregimet signifikant lengre enn uvaksinert fisk i 10-10 temperaturregimet. Innafor alle temperaturregima var framleis dei uvaksinerte fiskane lengre enn dei vaksinerte, og bortsett frå i 10-10 temperaturregimet var dei og tyngre enn dei vaksinerte fiskane (Fig. 5 A, B). Det hadde òg vore ein signifikant interaksjon mellom vaksine og temperatureffektane (Tab. 2), slik at vaksining påverka lengd og vekt meir i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima. Både temperatur og vaksine hadde ein signifikant effekt på kondisjonsfaktoren (Fig. 5 C, Tab. 2). I tillegg var det ein signifikant interaksjon mellom variablane (Tab. 2), slik at vaksine hadde ein mykje større effekt på kondisjonsfaktoren hjå 16-16 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima. For uvaksinert fisk gav ikkje ulike temperaturregime nokon signifikant effekt på kondisjonsfaktoren, medan hjå vaksinerte fisk hadde 16-16 temperaturregimet signifikant høgare kondisjonsfaktor enn dei andre regima. I 16-16 og 16-10 temperaturregima hadde vaksinert fisk signifikant høgare kondisjonsfaktor enn uvaksinert, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk i 10-10 og 10-16 temperaturregima (Fig. 5 C).

Hovudpunkta frå vekstparametrane kan oppsummerast med at fisk frå 16-16 og 16-10 temperaturregima var lengre og tyngre enn 10-10 og 10-16 temperaturregima ved både sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring og at vaksinert fisk i 16-16 temperaturregimet hadde signifikant høgare kondisjonsfaktor enn dei andre gruppene seks veker etter sjøvassoverføring. Av mindre viktig grad var i tillegg uvaksinert fisk for det meste lengre og tyngre enn vaksinert fisk innafor temperaturregima både ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring.

I perioden mellom seks veker før sjøvassoverføring og sjøvassoverføring (ferskvassperioden) hadde både temperatur og vaksine ein signifikant effekt på veksthastigheit målt som lengdevekst (mm dag^{-1}) og vektauke ($\% \text{ dag}^{-1}$) (Fig. 6 A, B, Tab. 3). Både høvesvis uvaksinert og vaksinert fisk hadde signifikant høgare lengdevekst og vektauke i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima, og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare lengdevekst og vektauke enn vaksinert innafor temperaturregima (Fig. 6 A, B).



Figur 6: Veksthastigheit (gjennomsnitt \pm S.E) ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase, uttrykt som (A) lengdevekst (mm dag^{-1}) og (B) vektauke ($\% \text{ dag}^{-1}$). Ferskvassperioden består av dei siste seks vekene før sjøvassoverføring (veke -6 - 0), og i tidleg sjøvassperiode består av dei første seks vekene etter sjøvassoverføring (veke 0 - +6). Lengdeveksten og vektauken vart basert på gjennomsnitt per kar ($n = 4$), då det ikkje vart brukt individmerka fisk. Gjennomsnitt med same små bokstavar innafor ferskvassperioden og sjøvassperioden er ikkje signifikant forskjellig ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

I perioden mellom sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring (tidleg sjøvassperiode) hadde både temperatur og vaksine ein signifikant effekt på lengdevekst, men ikkje på vektauke (Tab. 3, Fig. 6 A, B). Hjå vaksinert fisk gav ikkje ulike temperaturregime nokon signifikant effekt på lengdevekst, men hjå uvaksinert fisk hadde 16-10 og 16-16 temperaturregima signifikant høgare lengdevekst enn 10-16 og 10-10 regima (Fig. 6 A). Det var og ein signifikant interaksjon mellom temperatur og vaksinasjonseffektane (Tab. 3), ved at vaksining hadde tendens til å redusere lengdevekst i alle temperaturregima bortsett frå 10-10 regimet. Det var likevel ingen signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk i nokon av temperaturregima (Fig. 6 A).

Tabell 3: p-verdiar frå tovegs ANOVA-test på veksthastigheiter dei siste seks vekene i ferskvassperioden og dei første seks vekene i sjøvassperioden. Fullstendige statistiske testar for lengdevekst og vektauke er lagt ved i appendiks C, tabell C7-C10.

Analytt	Variabel	Tidleg	
		Ferskvassperiode	sjøvassperiode
Lengdevekst (mm dag ⁻¹)	Temperatur	0,0000	0,0018
Lengdevekst (mm dag ⁻¹)	Vaksine	0,0000	0,0014
Lengdevekst (mm dag ⁻¹)	Interaksjon	0,4801	0,0113
Vektauke (% dag ⁻¹)	Temperatur	0,0000	0,2036
Vektauke (% dag ⁻¹)	Vaksine	0,0000	0,5231
Vektauke (% dag ⁻¹)	Interaksjon	0,9010	0,0529

I ferskvassperioden kan hovudresultata frå veksthastigheita difor oppsummerast med at både vaksinert og uvaksinert fisk vaks betre ved 16 grader (16-16 og 16-10 temperaturregima) enn ved 10 grader (10-10 og 10-16 temperaturregima). Uvaksinert fisk vaks signifikant betre enn vaksinert fisk innafor temperaturregima. I den tidlege saltvassperioden var forskjellane i veksthastigheit derimot svært små.

3.1.2 Lengd, vekt og kondisjonsfaktor ved avslutning av forsøket

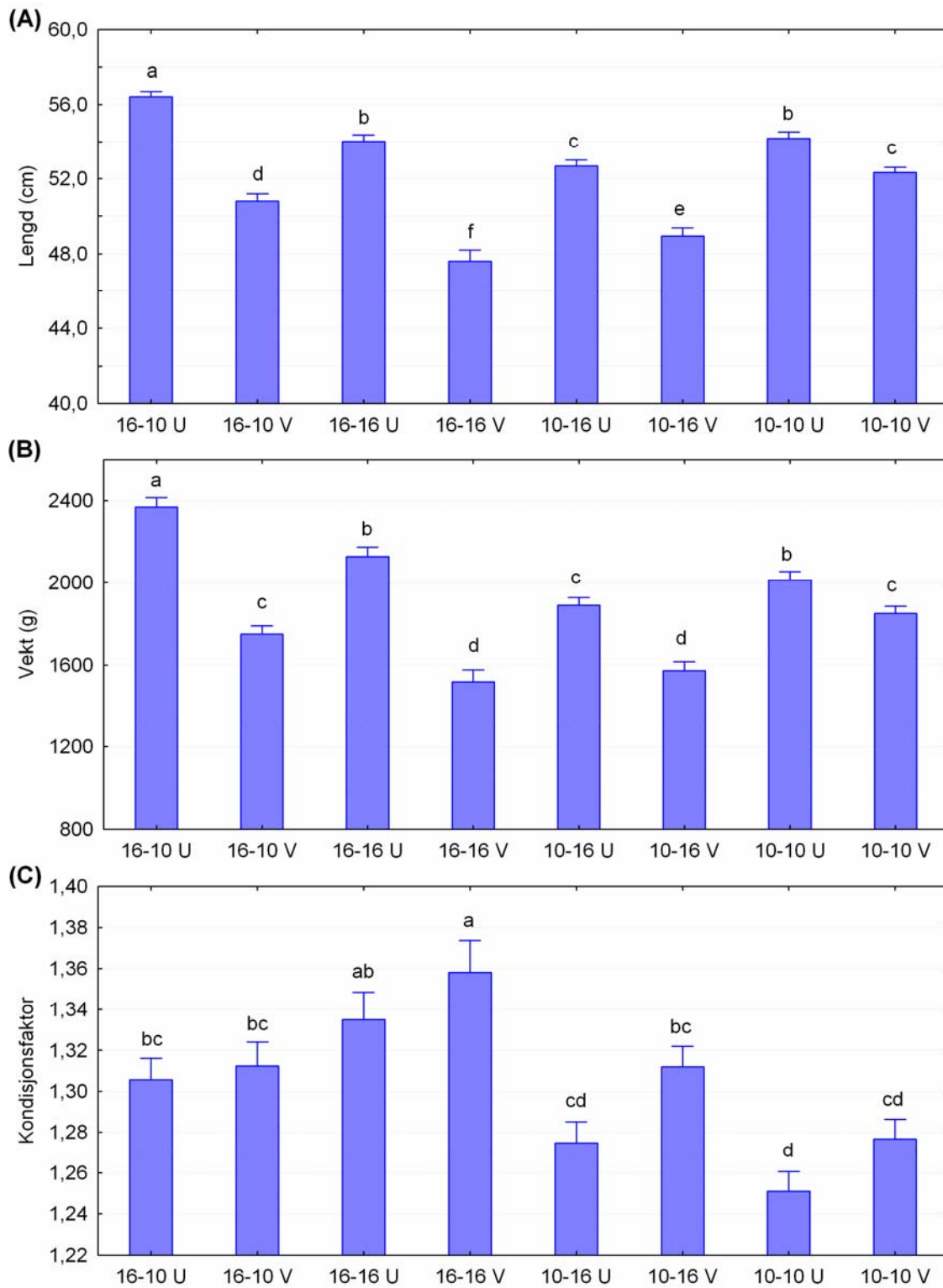
Både temperatur og vaksine gav ein signifikant effekt på både lengd og vekt 42 veker etter sjøvassoverføring (Fig. 7 A, B, Tab. 4). Det var òg eit signifikant samspel mellom variablane (Tab. 4), slik at vaksine såg ut til å redusere lengd og vekt i større grad dess lengre tid fiskane vart oppdretta ved 16 °C. Uvaksinert fisk var signifikant lengre og tyngre i 16-10 regimet enn i dei andre temperaturregima, og signifikant kortast og lettast i 10-16 regimet. Vaksinert fisk var signifikant lengst i 10-10 temperaturregimet, signifikant lengre i 16-10 regimet enn i 10-16 og 16-16 regima, og signifikant kortast i 16-16 temperaturregimet. Vaksinert fisk var signifikant lettare i 10-16 og 16-16 temperaturregima enn i 10-10 og 16-10 temperaturregima. Innafor alle temperaturregima var uvaksinert fisk signifikant lengre og tyngre enn vaksinert (Fig. 7 A, B).

Både temperatur og vaksine hadde ein signifikant effekt på kondisjonsfaktoren (Fig. 7 C, Tab. 4). Vaksinert fisk hadde signifikant høgare kondisjonsfaktor i 16-16 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima. Uvaksinert fisk hadde signifikant høgare kondisjonsfaktor i 16-16 temperaturregimet enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima, og i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 temperaturregimet. Innafor temperaturregima var det ein svak tendens til at vaksinert fisk hadde høgare kondisjonsfaktor enn uvaksinert, men det var ingen signifikante forskjellar (Fig. 7 C).

Tabell 4: p-verdiar frå tovegs ANOVA-test på lengd, vekt og kondisjonsfaktor 42 veker etter sjøvassoverføring. Fullstendige statistiske testar for lengd, vekt og kondisjonsfaktor er lagt ved i appendiks C, tabell C1-C6.

Analytt	Variabel	p-verdi
Lengd	Temperatur	0,0000
Lengd	Vaksine	0,0000
Lengd	Interaksjon	0,0000
Vekt	Temperatur	0,0000
Vekt	Vaksine	0,0000
Vekt	Interaksjon	0,0000
K-faktor	Temperatur	0,0000
K-faktor	Vaksine	0,0044
K-faktor	Interaksjon	0,5839

Hovudpunkta frå vekstresultata 42 veker etter sjøvassoverføring kan oppsummerast med at var uvaksinert fisk signifikant lengre og tyngre enn vaksinert fisk innafor temperaturregima. Vaksinert fisk var signifikant lettare og kortare i 16-16 og 10-16 temperaturregima enn i 10-16 og 10-10 regima, og hadde signifikant høgare kondisjonsfaktor i 16-16 regimet enn i dei andre temperaturregima.



Figur 7: Lengd (A; gjennomsnitt \pm S.E.), vekt (B; gjennomsnitt \pm S.E.) og kondisjonsfaktor (C; gjennomsnitt \pm S.E.) for forsøksfisken 42 uker etter sjøvassoverføring (n = 68 - 94). Gjennomsnitt med same små bokstavar er ikkje signifikant forskjellig ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

3.2 Mineralisering under smoltifisering og tidleg sjøvassfase

3.2.1 Mineralinnhald, mineralvektauke og proteinvektauke i virvlar

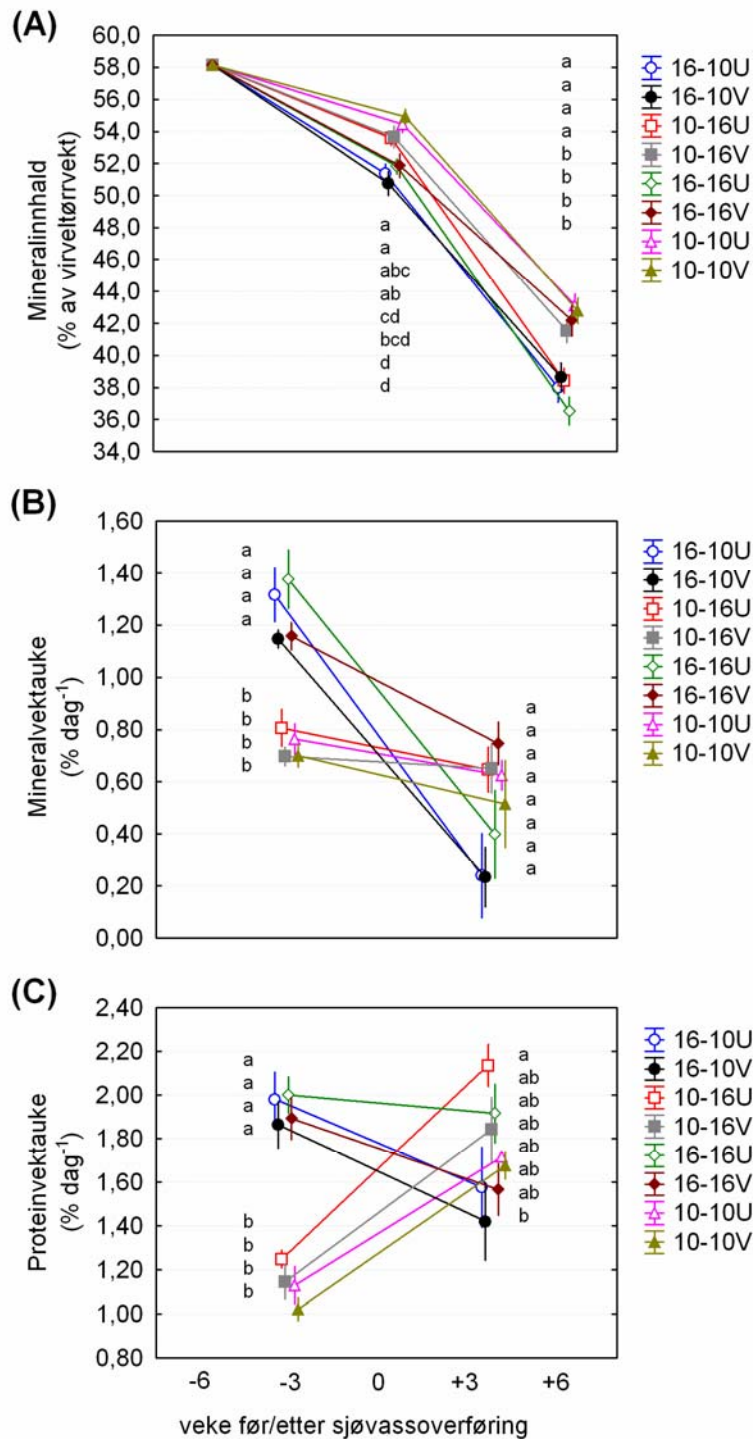
Mineralinnhaldet (som % av tørrvekt) i ryggvirvel nr 40-43 sank frå forsøksstart til sjøvassoverføring (Fig. 8 A). Ved sjøvassoverføring (veke 0) hadde temperatur, men ikkje vaksine gitt ein signifikant effekt på mineralinnhaldet (Tab. 5). Både høvesvis vaksinert og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare mineralinnhald i 10-10 temperaturregimet enn i 16-16 og 16-10 temperaturregima, og i 10-16 temperaturregimet enn i 16-10 temperaturregimet (Fig. 6 A).

Tabell 5: p-verdiar frå tovegs ANOVA-test for mineralinnhald (som % av tørrvekt) i ryggvirvlar ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Individ vart nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar.

Variabel	Veker etter sjøvassoverføring	
	0	6
Temperatur	0,0000	0,0001
Vaksine	0,9901	0,0012
Interaksjon	0,8300	0,0111

I perioden frå seks veker før sjøvassoverføring til sjøvassoverføring (ferskvassperioden) hadde både temperatur og vaksine ein signifikant effekt på mineralvektauken (% dag⁻¹) i virvlar (Fig. 8 B, Tab. 6). Både høvesvis vaksinert og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare mineralvektauke i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima. Innafor temperaturregima var det ingen signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk (Fig. 8 B). Temperatur, men ikkje vaksine, hadde ein signifikant effekt på proteinvektauken (% dag⁻¹) i virvlar (Fig. 8 C, Tab. 6). Både høvesvis vaksinert og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare proteinvektauke i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-16 og 10-10 regima (Fig. 8 C).

Seks veker etter sjøvassoverføringa hadde mineralinnhaldet i virvlane minka kraftig i alle regima (Fig. 8 A). Både temperatur og vaksine hadde gitt ein signifikant effekt (Tab. 5). Uvaksinert fisk hadde signifikant høgare mineralinnhald i 10-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima, medan hjå vaksinert fisk var det 16-10 temperaturregimet som skilte seg ut med signifikant lågare mineralinnhald enn dei andre temperaturregima (Fig. 8 A). Det var òg eit signifikant samspel mellom temperatur og vaksineeffektane (Tab. 5), slik at vaksininga hadde ein aukande effekt på mineralinnhaldet hjå gruppene som hadde høgast temperatur i sjøvassperioden. I 16-16 og 10-16 temperaturregima hadde vaksinert fisk signifikant høgare mineralinnhald enn uvaksinert, medan vaksine ikkje hadde nokon signifikant effekt i 10-10 og 16-10 temperaturregima. (Fig. 8 A).



Figur 8: Utvikling i mineral- og proteininnhaldet (snitt \pm SE) i ryggvirvel nr 40-43 ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. (A) Mineralinnhald (som % av virveltørrvekt) seks veker før sjøvassoverføring ($n = 39$), ved sjøvassoverføring ($n = 16$; 4 per kar) og seks veker etter sjøvassoverføring ($n = 16$; 4 per kar). Seks veker før sjøvassoverføring vert gjennomsnittet av heile fiskebestanden vist, då fisken ikkje hadde blitt fordelt på ulike grupper ved første prøvetaking. (B) Mineralvektauke (% dag⁻¹) i perioden mellom seks veker før sjøvassoverføring og sjøvassoverføring, og mellom sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Mineralvektauken vart estimert frå gjennomsnittet per kar ($n = 4$). (C) Proteinvektauke (% dag⁻¹) i perioden mellom seks veker før sjøvassoverføring og sjøvassoverføring, og mellom sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Proteinvekta vart estimert som tørrvekt – mineralvekt, og vekttauken frå gjennomsnitt per kar. Gjennomsnitt med same små bokstavar innafør ei gitt veke er ikkje signifikant forskjellig ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

Tabell 6: p-verdiar frå tovegs ANOVA-test for mineralvektauke og proteinvektauke dei siste seks vekene før sjøvassoverføring og dei første seks vekene etter sjøvassoverføring. Mineralvektauken og proteinvektauken vart rekna ut frå gjennomsnitt per kar, då fiskane i forsøket ikkje var individmerka. Fullstendige statistiske testar for mineralinnhald, mineralvektauke og proteinvektauke er lagt ved i appendiks C, tabell C12-C17.

Analytt	Variabel	Ferskvassperiode	Tidleg sjøvassperiode
Mineralvektauke (% dag ⁻¹)	Temperatur	0,0000	0,0134
Mineralvektauke (% dag ⁻¹)	Vaksine	0,0093	0,5020
Mineralvektauke (% dag ⁻¹)	Interaksjon	0,7066	0,3016
Proteinvektauke (% dag ⁻¹)	Temperatur	0,0000	0,0088
Proteinvektauke (% dag ⁻¹)	Vaksine	0,0920	0,0304
Proteinvektauke (% dag ⁻¹)	Interaksjon	0,9999	0,6323

I perioden mellom sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring (tidleg sjøvassperiode) hadde temperatur, men ikkje vaksine, ein signifikant effekt på mineralvektauken i virvlar (Tab. 6). Likevel var det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturregima (Fig. 8 B). Både temperatur og vaksine hadde ein signifikant effekt på proteinauken i virvlar (Tab. 6), men det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturregima for verken vaksinert eller uvaksinert fisk, og heller ikkje mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima (Fig. 8 C).

Oppsummeringsvis sank mineralinnhaldet i virvlane 3-7 % frå seks veker før sjøvassoverføring til sjøvassoverføring, og deretter 10-15 % frå sjøvassoverføring til seks veker etter sjøvassoverføring. I ferskvassperioden hadde 16-16 og 16-10 temperaturregima signifikant høgare proteinvektauke og mineralvektauke enn 10-10 og 10-16 temperaturregima. Det var likevel ein tendens til at mineralinnhaldet sank meir i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima i same periode. I den tidlege sjøvassperioden var det ingen forskjell i mineralvektauken, og svært liten forskjell i proteinvektauken. Bortsett frå uvaksinert fisk i 10-16 temperaturregimet og vaksinert fisk i 16-16 temperaturregimet, som utvikla høvesvis lågare og høgare mineralinnhald enn forventa, var det framleis ein tendens til at 10-10 og 10-16 temperaturregima hadde høgare mineralinnhald i virvlane enn 16-10 og 16-16 temperaturregima.

3.2.2 Kalsium og fosforinnhald i virvlar

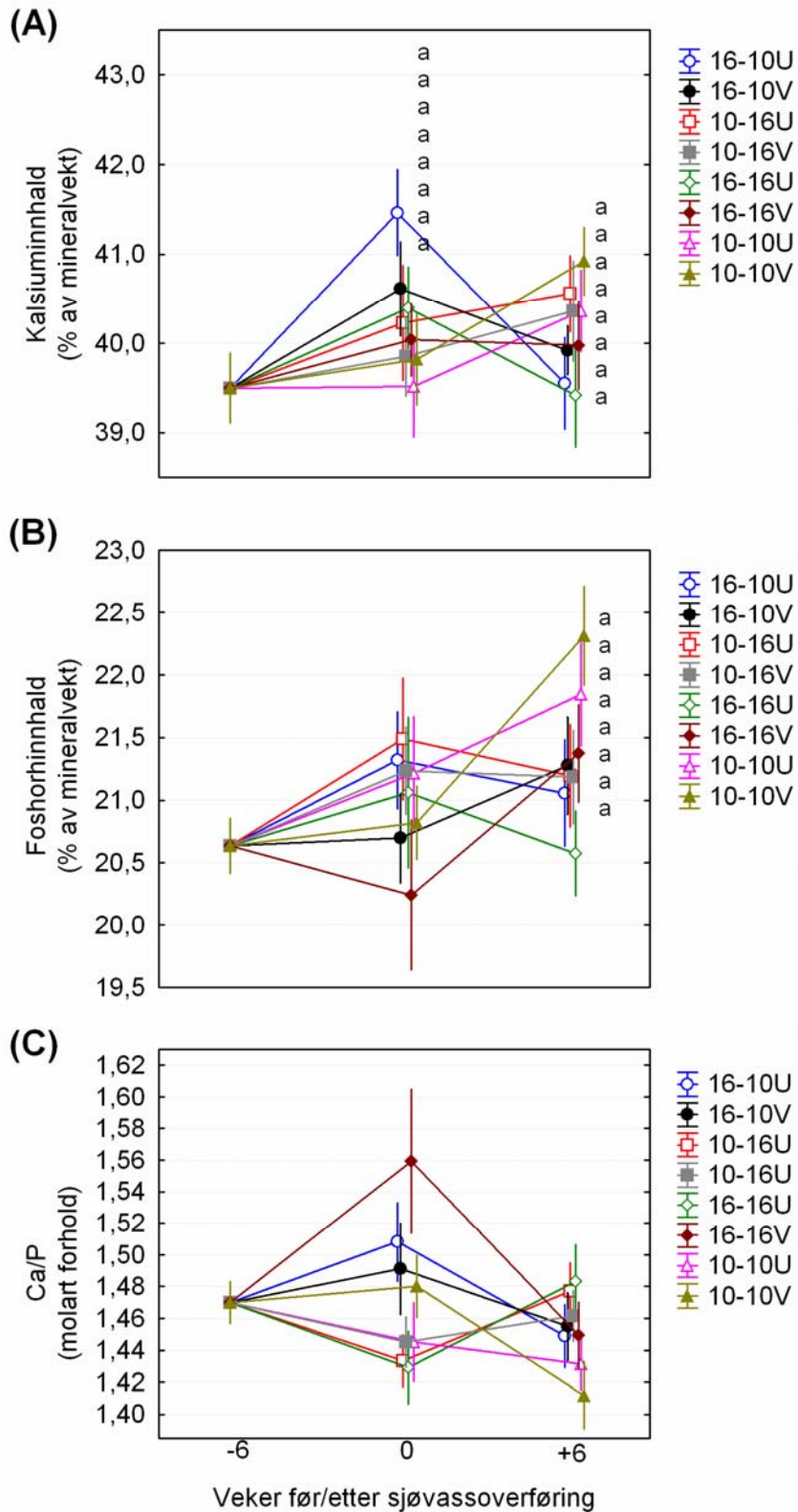
Ved sjøvassoverføring (veke 0) hadde temperatur, men ikkje vaksine, ein signifikant effekt på kalsiuminnhaldet (som % av mineralvekta) i ryggvirvlar (Fig. 9 A, Tab. 7). Likevel var det ingen signifikante forskjellar mellom temperaturregima, sjølv om det var eit svakt tildriv til at uvaksinert fisk hadde høgare kalsiuminnhald i 16-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima (Fig. 9 A). Verken temperatur eller vaksine hadde nokon signifikant effekt på fosforinnhaldet eller det molare kalsium/fosfor-forholdet i ryggvirvlar (Fig. 9 B, C, Tab. 7). Det var ein svak tendens til at vaksinert fisk hadde lågare fosforinnhald og høgare molart kalsium/fosfor-forhold i 16-16 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima (Fig. 9 B, C).

Seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) hadde temperatur, men ikkje vaksine, gitt ein signifikant effekt på kalsiuminnhaldet og fosforinnhaldet i virvlane (Tab. 7). Like fullt var det ingen signifikant forskjell mellom gruppene (Fig. 9 A, B). For det molare kalsium/fosfor-forholdet i virvlane hadde ingen av variablane nokon signifikant effekt (Tab. 7 og Fig. 9 C).

Tabell 7: p-verdiar frå tovegs ANOVA for kalsiuminnhald, fosforinnhald og molart kalsium/fosforforhold i ryggvirvlar ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Individ vart nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar. Fullstendig statistiske testar for kalsiuminnhald, fosforinnhald og molart kalsium/forsforforhold i virvlar er lagt ved i appendiks C, tabell C18-C22.

Analytt	Variabel	Veker etter sjøvassoverføring	
		0	6
Kalsiuminnhald (%)	Temperatur	0,0396	0,0468
Kalsiuminnhald (%)	Vaksine	0,3417	0,2514
Kalsiuminnhald (%)	Interaksjon	0,6126	0,6465
Fosforinnhald (%)	Temperatur	0,5508	0,0158
Fosforinnhald (%)	Vaksine	0,1296	0,1385
Fosforinnhald (%)	Interaksjon	0,9552	0,6583
Ca/P-forhold (molart)	Temperatur	0,2730	0,1643
Ca/P-forhold (molart)	Vaksine	0,0695	0,3936
Ca/P-forhold (molart)	Interaksjon	0,1043	0,8483

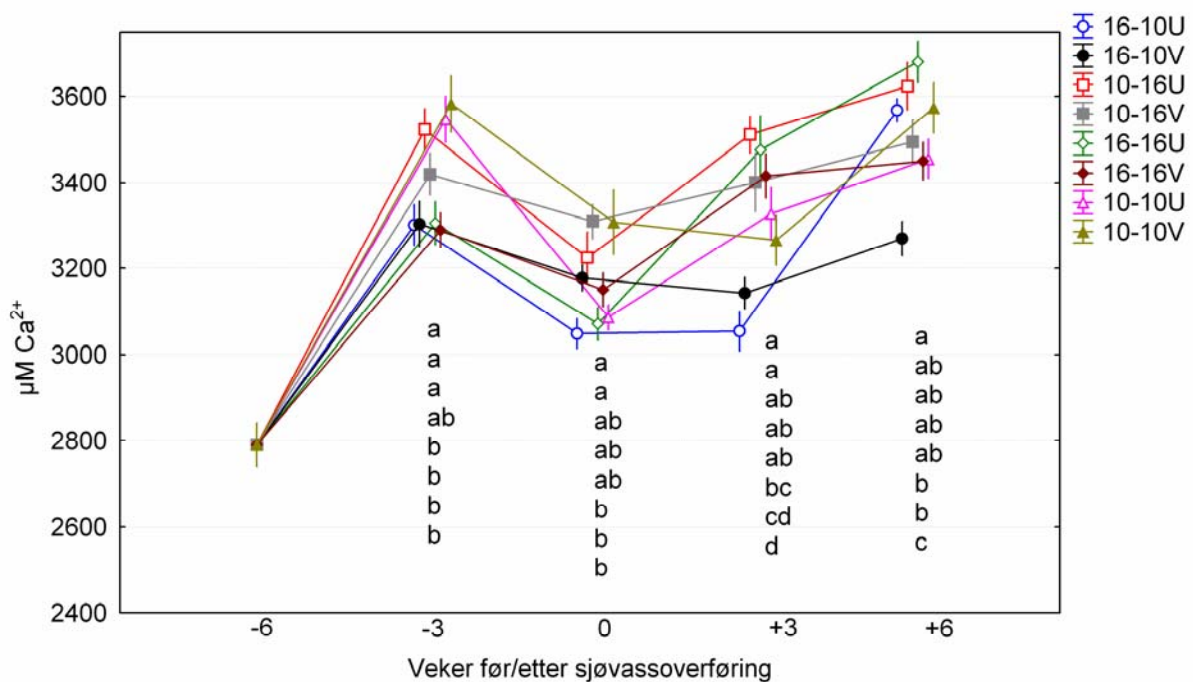
Oppsummeringsvis var det ingen signifikante forskjellar i kalsiuminnhaldet, fosforinnhaldet eller det molare kalsium/fosfor-forholdet mellom temperaturregima eller mellom vaksinert og uvaksinert fisk, verken ved sjøvassoverføring eller seks veker etter sjøvassoverføring.



Figur 9: Mineralstatus (gjennomsnitt \pm S.E.) i virvel nr 40-43, seks veker før sjøvassoverføring (n = 39), ved sjøvassoverføring (n \approx 16; 4 per kar), og seks veker etter sjøvassoverføring (n \approx 16; 4 per kar). (A) Kalsiuminnhald (% av mineralvekt), (B) fosforinnhald (% av mineralvekt), (C) molart kalsium/forfor-forhold. Seks veker før sjøvassoverføring vert gjennomsnittet av heile fiskebestanden vist, då fisken ikkje hadde blitt fordelt på ulike grupper ved første prøvetaking. Ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring varierte prøvestorleiken mellom 14 og 16, då nokre prøvar måtte forkastast grunna utfellingar.

3.2.3 Kalsium i serum

Kalsiumkonsentrasjonen i serum auka frå seks veker før sjøvassoverføring til tre veker før sjøvassoverføring (Fig. 10). Ved dette tidspunktet (veke -3) hadde temperatur, men ikkje vaksinerings, hatt ein signifikant effekt på kalsiumkonsentrasjonen (Tab. 8). Uvaksinert fisk hadde signifikant høgare kalsiumkonsentrasjon i 10-10 og 10-16 temperaturregima enn i 16-10 og 16-16 temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant høgare kalsiumkonsentrasjon i 10-10 temperaturregimet enn i 16-10 og 16-16 temperaturregima, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell mellom 10-16 temperaturregimet og dei andre regima (Fig. 10).



Figur 10: Kalsiumkonsentrasjon i serum (gjennomsnitt ± S.E) ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase (n = 39 i veke -6, n = 16; 4 per kar, i veke -3, 0, +3 og +6). I veke -6 vert gjennomsnittet av heile fiskebestanden vist, då fisken ikkje hadde blitt fordelt på ulike grupper ved første prøvetaking. Gjennomsnitt med same bokstavar innafor eit tidspunkt er ikkje signifikant ulike ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

Mot sjøvassoverføring (veke 0) sank kalsiumkonsentrasjonane igjen (Fig. 10). Både temperatur og vaksine hadde ein signifikant effekt på konsentrasjonen (Tab. 8), men det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturregima for verken vaksinert eller uvaksinert fisk. Innafor temperaturregima var det ein tendens til at vaksinert fisk hadde høgare kalsiumkonsentrasjon enn uvaksinert, men det var berre i 10-10 temperaturregimet at forskjellen var signifikant (Fig. 10).

Tabell 8: p-verdiar frå tovegs ANOVA for kalsiumkonsentrasjon i serum ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. Individua vart nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar. Fullstendige statistiske testar er lagt ved i appendiks C, Tab. C23-C24.

Variabel	Veker før/ etter sjøvassoverføring			
	-3	0	3	6
Temperatur	0,0000	0,0051	0,0009	0,0535
Vaksine	0,6180	0,0004	0,5741	0,0021
Interaksjon	0,6218	0,4690	0,6824	0,0050

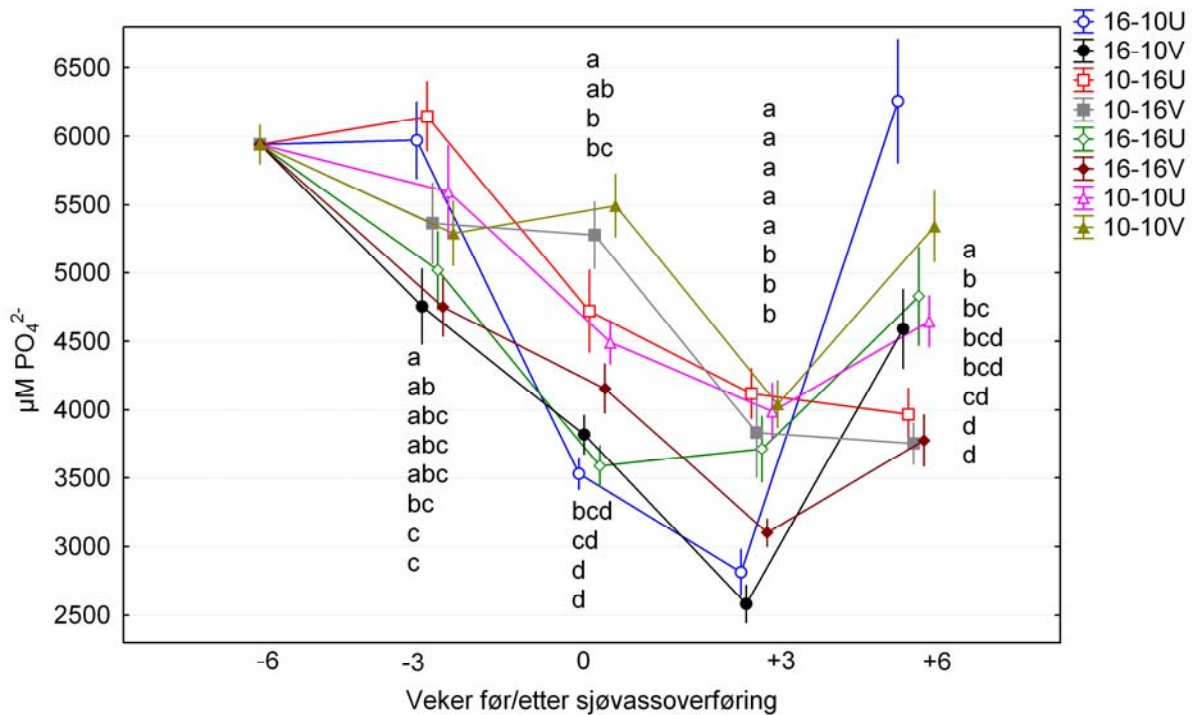
Frå sjøvassoverføringa steig kalsiumkonsentrasjonen igjen fram til seks veker etter sjøvassoverføring (Fig. 10). Tre veker etter sjøvassoverføringa (veke 3) hadde temperatur, men ikkje vaksine, gitt ein signifikant effekt på konsentrasjonen (Tab. 8). Uvaksinert fisk hadde signifikant lågare kalsiumkonsentrasjon i 16-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant lågare konsentrasjon i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 og 16-16 temperaturregimet. Vaksinert fisk i 10-10 temperaturregimet var ikkje signifikant forskjellig frå nokon av dei andre temperaturregima (Fig. 10).

Seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) hadde ikkje temperatur, men derimot vaksine, hatt ein signifikant effekt på kalsiumkonsentrasjonen i serum (Fig. 10, Tab. 8). Det var òg ein signifikant interaksjon mellom variablane (Tab. 8), slik at vaksine gav tildriv til auke i kalsiumkonsentrasjonen i 10-10 temperaturregimet og tildriv til reduksjon i dei andre temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant lågare kalsiumkonsentrasjon enn uvaksinert i 16-16 og 16-10 temperaturregima, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell i dei andre temperaturregima (Fig. 10).

Dei viktigaste resultatata frå kalsiumprøvane kan oppsummerast med at både vaksinert og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare kalsiumkonsentrasjon i 10-10 og 10-16 temperaturregima enn i 16-10 og 16-16 temperaturregima tre veker før sjøvassoverføring. Ved sjøvassoverføring var det eit svakt tildriv til det same. Vidare utover i sjøvassperioden hadde temperatur og vaksining derimot varierende effektar, og det var ingen klar samanheng mellom kalsiumkonsentrasjonen og behandlinga.

3.2.4 Fosfat i serum

Fosfatkonsentrasjonen i serum sank generelt sett hjå all fisken frå forsøksstart til tre veker etter sjøvassoverføring. Seks veker etter sjøvassoverføring hadde fosfatkonsentrasjonen i dei fleste gruppene gått opp igjen (Fig. 11).



Figur 11: Fosfatkonsentrasjon i serum (gjennomsnitt \pm S.E) ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase ($n = 39$ i veke -6, $n = 16$; 4 per kar, i veke -3, 0, +3 og +6). I veke -6 vart gjennomsnittet av heile fiskebestanden vist, då fisken ikkje hadde blitt fordelt på ulike grupper ved første prøvetaking. Gjennomsnitt med same bokstavar innafør eit tidspunkt er ikkje signifikant ulike ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

Tre veker før sjøvassoverføring (veke -3) hadde vaksine, men ikkje temperatur, gitt ein signifikant effekt på fosfatkonsentrasjonen i serum (Fig. 11, Tab. 9). Vaksinert fisk hadde signifikant lågare fosfatkonsentrasjon enn uvaksinert i 16-10 temperaturregimet, medan det ikkje var nokon signifikante forskjellar mellom vaksinert og uvaksinert fisk i dei andre temperaturregima (Fig. 11).

Tabell 9: p-verdiar frå tovegs ANOVA-test for fosfatkonsentrasjon i serum ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. Individua vart nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar. Fullstendige statistiske testar er lagt ved i appendiks C, Tab. C25-C26.

Variabel	Veker før/ etter sjøvassoverføring			
	-3	0	3	6
Temperatur	0,1060	0,0000	0,0000	0,0004
Vaksine	0,0127	0,0001	0,1143	0,0248
Interaksjon	0,4648	0,3238	0,5565	0,0104

Ved sjøvassoverføring (veke 0) hadde både temperatur og vaksine gitt ein signifikant effekt på fosfatkonsentrasjonen (Fig. 11, Tab. 9). Uvaksinert fisk hadde signifikant høgare fosfatkonsentrasjon i 10-10 og 10-16 temperaturregima enn i 16-16 og 16-10 temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant høgare fosfatkonsentrasjon i 10-10 temperaturregimet enn i 16-16 og 16-10 temperaturregimet, og i 10-16 temperaturregimet enn i 16-10 temperaturregimet. Innafor temperaturregima var det eit tildriv til at vaksinert fisk hadde høgare fosfatkonsentrasjon enn uvaksinert, men det var berre i 10-10 temperaturregimet at forskjellen var signifikant (Fig. 11).

Tre veker etter sjøvassoverføring (veke +3) hadde temperatur, men ikkje vaksine, hatt ein signifikant effekt på fosfatkonsentrasjonen (Fig. 11, Tab. 9). Uvaksinert fisk hadde signifikant lågare fosfatkonsentrasjon i 16-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima, medan vaksinert fisk hadde signifikant lågare fosfatkonsentrasjon i 16-10 og 16-16 temperaturregima enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima (Fig. 11).

Seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6) hadde både temperatur og vaksine hatt ein signifikant effekt på fosfatkonsentrasjonen (Fig. 11, Tab. 9). Uvaksinerte fisk hadde signifikant høgare fosfatkonsentrasjon i 16-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant høgare konsentrasjon i 10-10 temperaturregimet enn i dei andre regima (Fig. 11). Det var òg ein signifikant interaksjon mellom temperatur og vaksineeffekten (Tab. 9), slik at vaksinert fisk hadde signifikant lågare fosfatkonsentrasjon enn uvaksinert i 16-10 og 16-16 temperaturregima, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell i dei andre temperaturregima.

Oppsummeringsvis hadde temperatur ein signifikant effekt på fosfatkonsentrasjonen frå sjøvassoverføring til seks veker etter sjøvassoverføring, medan effekten av vaksininga var meir variabel. Frå tre veker før sjøvassoverføring og fram til tre veker etter sjøvassoverføring var det ein tendens til at både vaksinert og uvaksinert fisk hadde høgare fosfatkonsentrasjon i 10-10 og 10-16 temperaturregima enn i 16-16 og 16-10 temperaturregima. Seks veker etter sjøvassoverføring skilte dei uvaksinerte fiskane i 16-10 temperaturregimet seg ut ved å ha signifikant høgare fosfatkonsentrasjon enn dei andre gruppene.

3.3 Ryggvirvelmorfologi

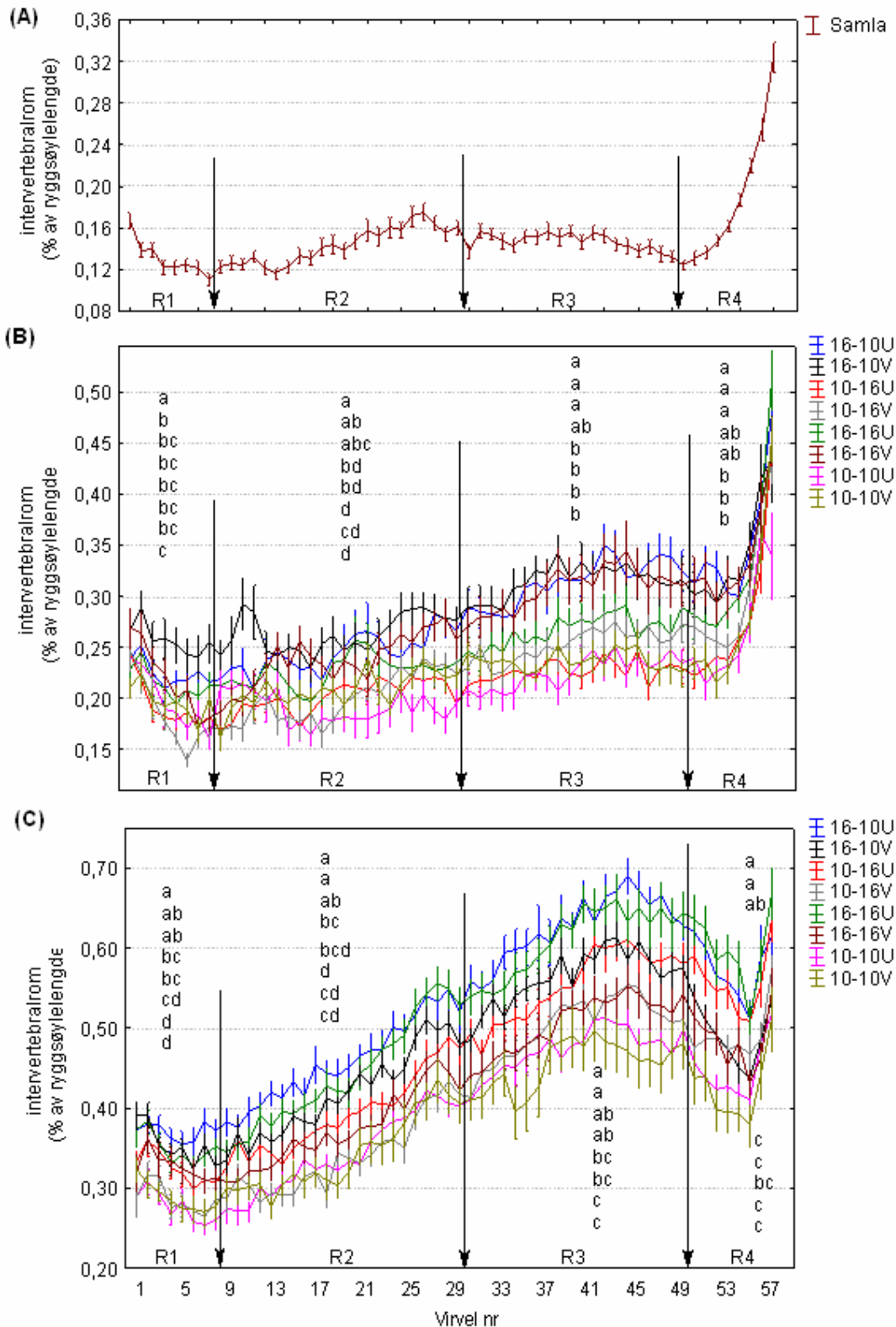
Rådata for virvellengd er lagt ved i appendiks B, Fig. B1.

3.3.1 Intervertebralrom og samanheng mellom intervertebralrom og mineralinnhald i virvlar

Intervertebralrom under smoltifisering og tidleg sjøvassfase

Intervertebralrommet auka ein del frå seks veker før sjøvassoverføring til sjøvassoverføring, og deretter kraftig til seks veker etter sjøvassoverføring, særleg i fremre og bakre haleregion (Fig. 12 A, B, C).

Ved sjøvassoverføring (veke 0) hadde temperatur, men ikkje vaksine hatt ein signifikant effekt på intervertebralrommet i fremre bukregion (Fig. 12 B, Tab. 10). Vaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet, og signifikant mindre intervertebralrom i 10-16 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima. Det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturregima hjå uvaksinert fisk (Fig. 12 B). I bakre bukregion hadde temperatur, men ikkje vaksine hatt signifikant effekt (Tab. 10). Både høvesvis uvaksinert og vaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima, medan 16-16 temperaturregimet ikkje var forskjellig frå nokon av dei andre temperaturregima (Fig. 12 B). I fremre haleregion hadde både temperatur og vaksine hatt signifikant effekt (Tab. 10). Uvaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima, medan 16-16 temperaturregimet ikkje var forskjellig frå nokon av dei andre temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima. Det var ingen signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima (Fig. 12 B). I bakre haleregion hadde temperatur, men ikkje vaksine, gitt ein signifikant effekt (Tab. 10). Uvaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima, medan 16-16 temperaturregimet ikkje var forskjellig frå nokon av dei andre. Vaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 og 16-16 temperaturregima enn i 10-10 temperaturregimet, medan 10-16 temperaturregimet ikkje var forskjellig frå nokon av dei andre (Fig. 12 B).



Figur 12: Intervertebralrom (som % lengd av total ryggøyelengd)(gjennomsnitt \pm S.E.) i ulike regionar i virvelsøyla; R1 (fremre bukregion, virvel nr 1-8), R2 (bakre bukregion, virvel nr 9-30), R3 (fremre haleregion, virvel nr 31-49) og R4 (bakre haleregion, virvel nr 50-58). (A) Intervertebralrom (gjennomsnitt for heile fiskebestanden, n = 39) seks veker før sjøvassoverføring. (B) Intervertebralrom (n = 16, 4 per kar) ved sjøvassoverføring. (C) Intervertebralrom (n = 16, 4 per kar) seks veker etter sjøvassoverføring. Små bokstavar angir signifikante forskjellar i gjennomsnittleg intervertebralrom per fisk per region mellom gruppene.

Oppsummeringsvis hadde temperatur ein signifikant effekt på intervertebralrommet i alle regionane ved sjøvassoverføring (veke 0). Høvesvis vaksinert og uvaksinert fisk hadde større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima over mesteparten av ryggspyla. Vaksinert og uvaksinert fisk i 16-16 temperaturregimet hadde for det meste intervertebralrom som låg mellom 16-10 temperaturregimet, og 10-10 og 10-16 temperaturregima i storleik.

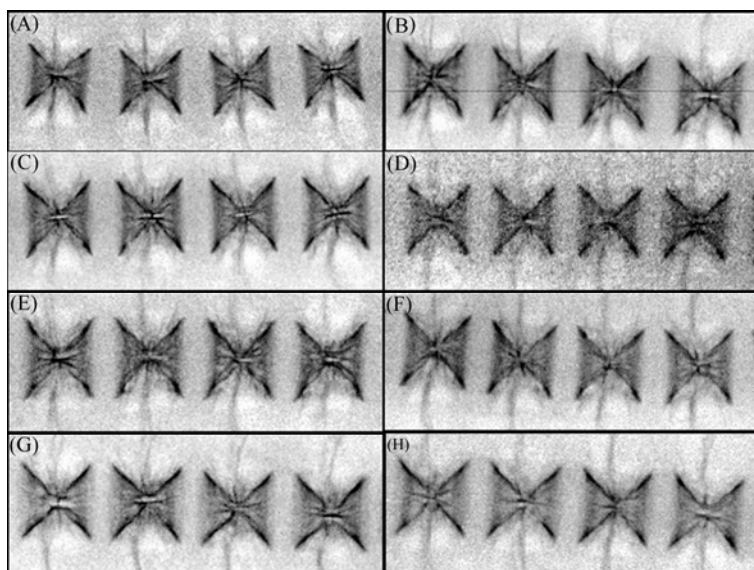
Tabell 10: p-verdiar frå tovegs ANOVA-test for intervertebralrom (som % av ryggspyllengd) ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Intervertebralromma vart gitt som snitt per fisk per region grunna store variasjonar over ryggspyla. Individua vart nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar. Fullstendige statistiske testar for intervertebralrom er lagt ved i appendiks C, Tab. C28-C31.

Region	Variabel	Veker etter sjøvassoverføring	
		0	6
Fremre bukregion (R1)	Temperatur	0,0013	0,0000
Fremre bukregion (R1)	Vaksine	0,4409	0,0290
Fremre bukregion (R1)	Interaksjon	0,3822	0,1339
Bakre bukregion (R2)	Temperatur	0,0000	0,0000
Bakre bukregion (R2)	Vaksine	0,0611	0,0011
Bakre bukregion (R2)	Interaksjon	0,6066	0,1632
Fremre haleregion (R3)	Temperatur	0,0000	0,0000
Fremre haleregion (R3)	Vaksine	0,0136	0,0004
Fremre haleregion (R3)	Interaksjon	0,2735	0,2250
Bakre haleregion (R4)	Temperatur	0,0000	0,0002
Bakre haleregion (R4)	Vaksine	0,1935	0,0001
Bakre haleregion (R4)	Interaksjon	0,4417	0,2546

Seks veker etter sjøvassoverføring hadde både temperatur og vaksine gitt ein signifikant effekt på intervertebralrommet i alle regionane (Fig. 12 C, Tab. 10). Døme på røntgenbilete av virvel nr 40-43 med tilstøytande intervertebralrom er vist i Fig. 13. I fremre bukregion hadde uvaksinert fisk signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 og 10-10 regima, og i 16-16 og 10-16 regima enn i 10-10 regimet. Vaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima, og i 16-16 temperaturregimet enn i 10-10 temperaturregimet. Det var ein ikkje-signifikant tendens til at uvaksinert fisk hadde større intervertebralrom enn vaksinert i 16-16, 16-10 og 10-16 temperaturregima. I bakre bukregion hadde uvaksinert fisk signifikant større intervertebralrom i 16-10 og 16-16 temperaturregima enn i 10-16 og 10-10 temperaturregima. Vaksinerte fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-16 og 10-10 regima, og i 16-16 regimet enn i 10-10 regimet. Slik som i fremre bukregion var det ein ikkje-signifikant tendens til at uvaksinert fisk hadde større intervertebralrom enn vaksinert i 16-16, 16-10 og 10-16 temperaturregima. I fremre haleregion

hadde uvaksinert fisk signifikant mindre intervertebralrom i 10-10 temperaturregimet enn i dei andre regima. Vaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 regimet, medan 10-16 og 16-16 regima ikkje var signifikant forskjellig frå nokon av dei andre temperaturregima. Det var tendensar til at uvaksinert fisk hadde større intervertebralrom enn vaksinert i 16-16, 16-10 og 10-16 temperaturregima, men det var berre i 16-16 regimet at forskjellen var signifikant. I bakre haleregion hadde uvaksinert fisk signifikant mindre intervertebralrom i 10-10 temperaturregimet enn i dei andre regima, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell mellom temperaturregima hjå vaksinert fisk. Uvaksinert fisk hadde signifikant større intervertebralrom enn vaksinert i alle temperaturregima bortsett frå 10-10 regimet (Fig. 12 C).

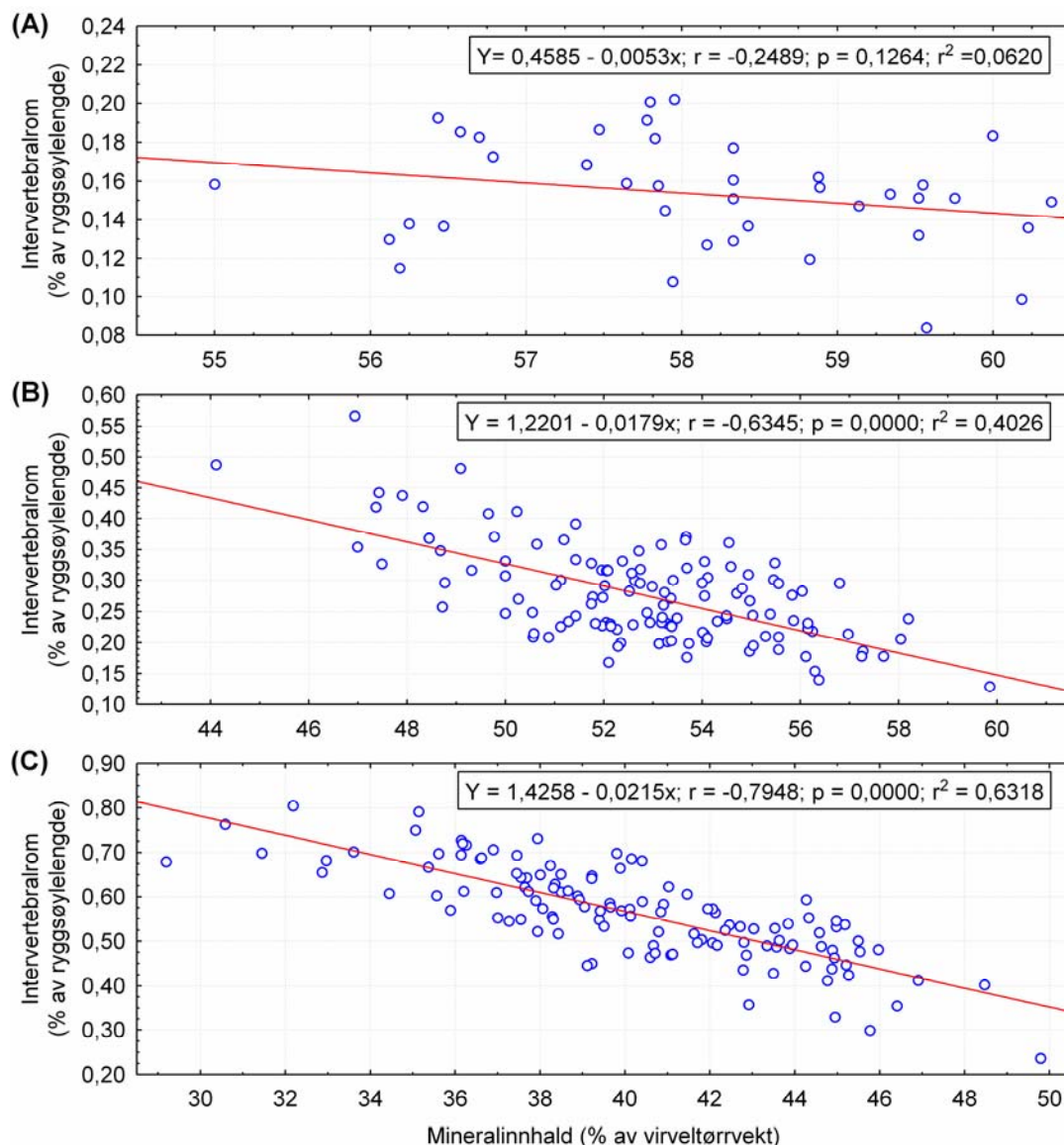
Oppsummeringsvis hadde både temperatur og vaksine gitt ein signifikant effekt på storleiken til intervertebralromma i alle regionane seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6). Både vaksinert og uvaksinert fisk hadde tendensar til å ha større intervertebralrom i 16-10, 16-16 og i mindre grad i 10-16 temperaturregiet, enn i 10-10 temperaturregimet. Bortsett frå i 10-10 temperaturregimet, var det tendensar til at uvaksinert fisk hadde større intervertebralrom enn vaksinert fisk innafør temperaturregima.



Figur 13: Røntgenbilette av virvel nr 40-43 seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6). Figuren viser intervertebralrom frå vaksinert og uvaksinert fisk med storleik nær gjennomsnittet for dei ulike temperaturregima. Bileta er sortert etter minkande intervertebralrom; (A) 16-10U, (B) 16-16U, (C) 16-10V, (D) 10-16U, (E) 16-16V, (F) 10-16V, (G) 10-10U og (H) 10-10V.

Samanheng mellom storleik på intervertebralrom og mineralinnhald i virvlar under smoltfisering og tidleg sjøvassfase

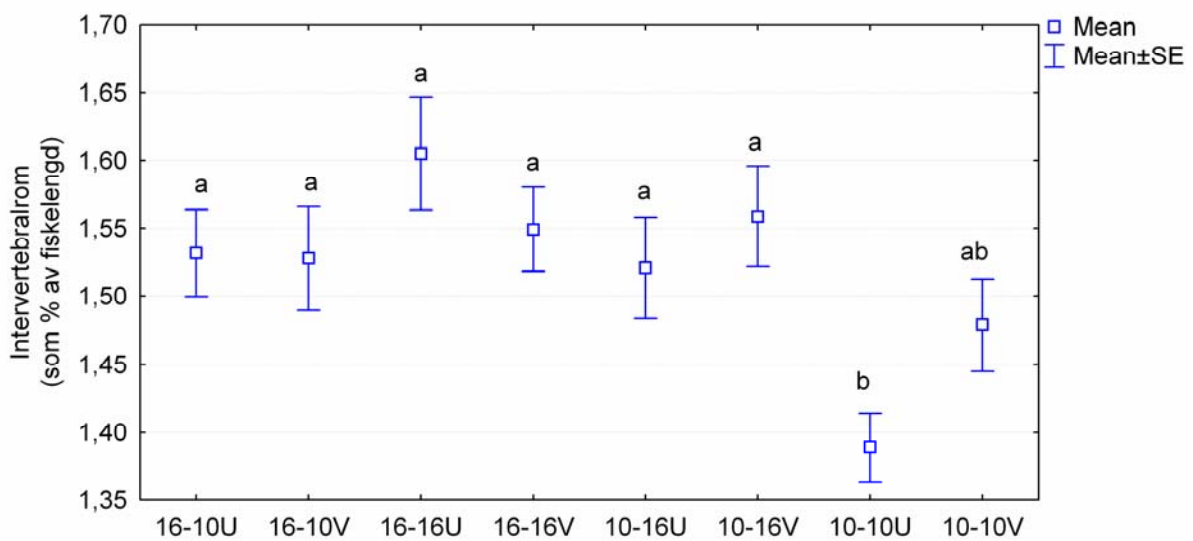
Det var ein signifikant negativ korrelasjon mellom storleiken på intervertebralromma og mineralinnhaldet i virvlane ved både sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring, men ikkje ved forsøksstart (Fig. 14 A, B, C). Ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring kunne høvesvis 40 % og 63 % av variasjonen i intervertebralromma forklarast med variasjon i mineralinnhaldet i virvlane.



Figur 14: Korrelasjon mellom mineralinnhald (% av virveltørrvekt) og intervertebralrom (% av ryggøylelengde) (A) seks veker før sjøvassoverføring, (B) ved sjøvassoverføring og (C) seks veker etter sjøvassoverføring. Mineralinnhaldet er målt som samleprøvar med virvel nr 40-43, og intervertebralrommet er gitt som gjennomsnittleg intervertebralrom mellom virvel nr 40-43.

Intervertebralrom 42 veker etter sjøvassoverføring

Intervertebralromma 42 veker etter sjøvassoverføring vart oppgitt som % av fiskelengd (gaffelleng) i staden for % av ryggspøylelengd, då berre deler av ryggspøyla vart analysert for virvellengd og intervertebralromlengd. Ved dette tidspunktet hadde temperatur, men ikkje vaksine, hatt ein signifikant effekt på storleiken av intervertebralromma mellom virvel nr 40 til 44 (Tab. 11). Uvaksinert fisk i 10-10 temperaturregimet hadde signifikant mindre intervertebralrom enn uvaksinert fisk i dei andre temperaturregima, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell mellom temperaturregima hjå vaksinert fisk (Fig. 15).



Figur 15: Gjennomsnittleg intervertebralrom som % av fiskelengd (\pm S.E.) per individ ($n = 48-54$) mellom virvel nr 40-44, 42 veker etter sjøvassoverføring. Ulike små bokstavar angir signifikant forskjellig gjennomsnittleg intervertebralrom mellom dei ulike behandlingane.

Tabell 11: p-verdiar frå tovegs ANOVA for intervertebralrom (som % lengd av fiskelengd) 42 veker etter sjøvassoverføring. Fullstendige statistiske testar er vist i appendiks C, Tab. C32-C33.

Variabel	p-verdi
Temperatur	0,0004
Vaksine	0,4928
Interaksjon	0,1952

3.3.2 Lengd/diameterforhold og samanheng mellom lengd/diameterforhold og mineralinnhald i virvlar

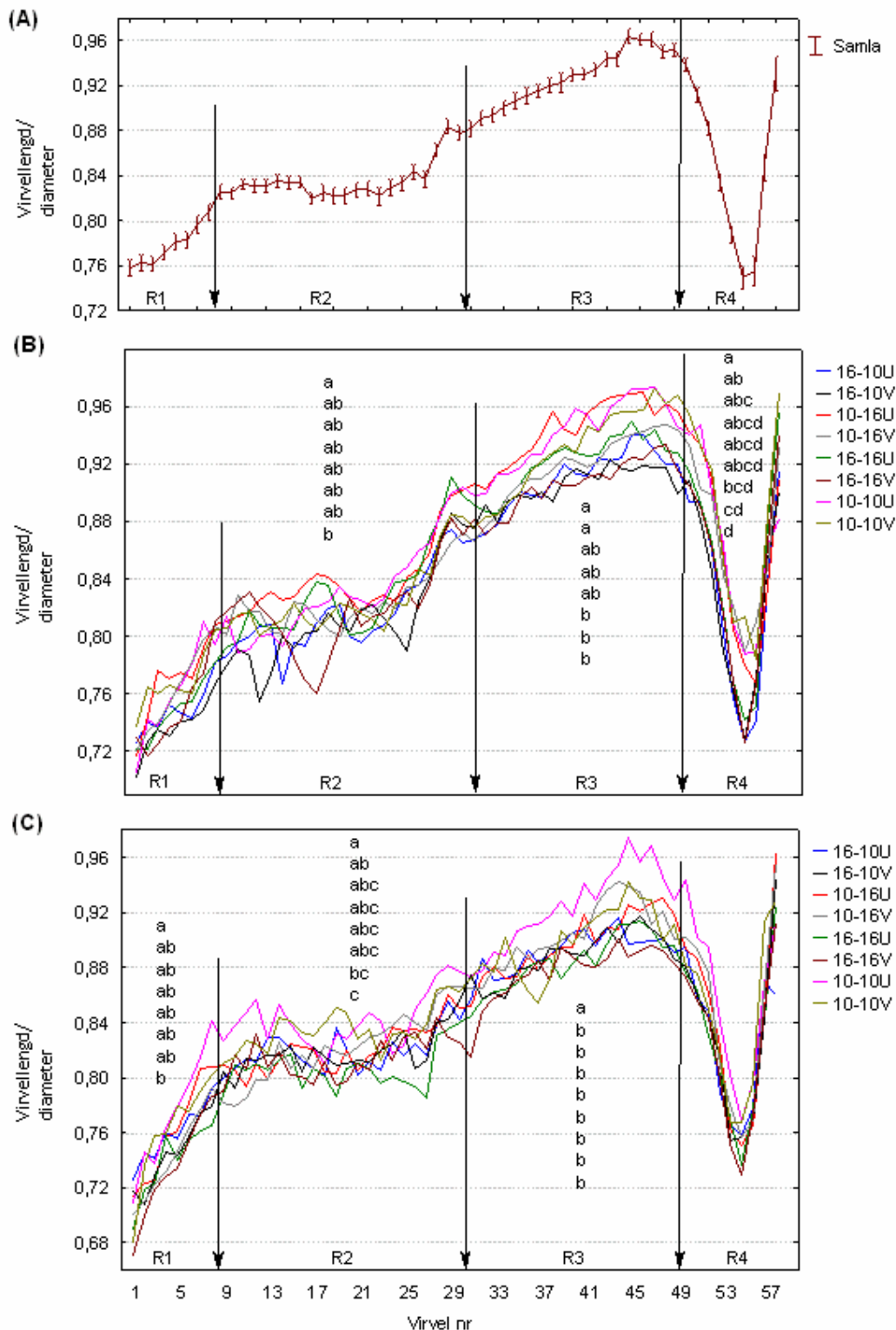
Lengd/diameterforhold hjå virvlar under smoltifisering og tidleg sjøvassfase

Forholdet mellom lengd og diameter (L/D-forhold) til ryggvirvlar hadde sterke regionale forskjellar i virvelsøyla (Fig. 16 A, B, C). Fremre haleregion hadde dei største L/D-forholda, medan fremre bukregion og bakre haleregion fekk dei minste L/D-forholda.

Ved sjøvassoverføring (veke 0) hadde verken temperatur eller vaksine gitt nokon signifikant effekt på L/D-forholdet i fremre bukregion (Fig. 16 B, Tab. 12). I bakre bukregion hadde både temperatur og vaksine hatt ein signifikant effekt (Tab. 12), men det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturregima for verken vaksinert eller uvaksinert fisk, og heller ikkje mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima (Fig. 16 B). I fremre haleregion hadde både temperatur og vaksine gitt ein signifikant effekt (Tab. 12). Uvaksinert fisk hadde signifikant lågare L/D-forhold i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 og 10-16 temperaturregimet, medan temperaturregima ikkje hadde gitt nokon signifikant effekt hjå vaksinert fisk. Det var ingen forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima (Fig. 16 B). I bakre haleregion hadde temperatur, men ikkje vaksine, gitt ein signifikant effekt (Tab. 12). Uvaksinert fisk hadde signifikant høgare L/D-forhold i 10-10 temperaturregimet enn i 16-10 temperaturregimet, medan det ikkje var nokon signifikant forskjell mellom dei andre temperaturregima. Vaksinert fisk hadde signifikant høgare L/D-forhold i 10-10 temperaturregimet enn i 16-10 og 16-16 temperaturregima (Fig. 16 B).

Tabell 12: p-verdiar frå tovegs ANOVA for lengd/diameterforhold til virvlar ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. Grunna store variasjonar over ryggøyyla, vart L/D-forholdet gitt som snitt per region per fisk. Individu vart nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar. Fullstendige statistiske testar for L/D-forhold ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase er lagt ved i appendiks C, Tab. C35-C38.

Region	Variabel	Veker etter sjøvassoverføring	
		0	6
Fremre bukregion (R1)	Temperatur	0,0538	0,0007
Fremre bukregion (R1)	Vaksine	0,7268	0,0089
Fremre bukregion (R1)	Interaksjon	0,8091	0,8571
Bakre bukregion (R2)	Temperatur	0,0215	0,0002
Bakre bukregion (R2)	Vaksine	0,0230	0,8864
Bakre bukregion (R2)	Interaksjon	0,7475	0,6210
Fremre haleregion (R3)	Temperatur	0,0000	0,0011
Fremre haleregion (R3)	Vaksine	0,0012	0,1428
Fremre haleregion (R3)	Interaksjon	0,3247	0,1752
Bakre haleregion (R4)	Temperatur	0,0000	0,0667
Bakre haleregion (R4)	Vaksine	0,4603	0,7831
Bakre haleregion (R4)	Interaksjon	0,6103	0,7838

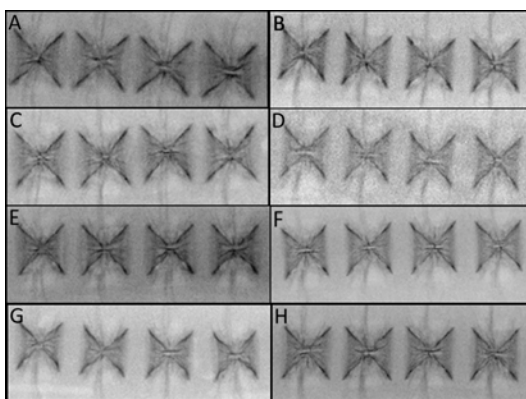


Figur 16: Virvellengd/diameterforhold i ulike regionar av virvelsøyla; R1 (fremre bukregion, virvel nr 1-8), R2 (bakre bukregion, virvel nr 9-30), R3 (fremre haleregion, virvel nr 31-49) og R4 (bakre haleregion, virvel nr 50-58). (A) Lengd/diameterforhold (gjennomsnitt for heile fiskebestanden \pm S.E, $n = 39$) seks veker før sjøvassoverføring. (B) Lengd/diameterforhold (gjennomsnitt, $n = 16$; 4 per kar) ved sjøvassoverføring. (C) Lengd/diameterforhold (gjennomsnitt, $n = 16$; 4 per kar) seks veker etter sjøvassoverføring. Gjennomsnitt med same bokstavar innafor dei ulike regionane er ikkje signifikant ulike ($p > 0,05$) ved Newman-Keuls test.

Samanfatta hadde høvesvis vaksinert og uvaksinert fisk i 10-10 og 10-16 temperaturregima ein tendens til å ha høgare, men ikkje alltid signifikant høgare, L/D-forhold enn vaksinert og uvaksinert fisk i 16-16 og 16-10 temperaturregima over heile ryggsøyla ved sjøvassoverføring (Fig. 16 B). I bakre bukregion og fremre haleregion var det ein tendens til at dei uvaksinerte fiskane hadde høgare L/D-forhold enn dei vaksinerte innafor temperaturregima, men forskjellane var ikkje signifikante.

Seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6) hadde både temperatur og vaksine gitt ein signifikant effekt på L/D-forholdet i fremre bukregion (Tab. 12), men det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturregima verken for vaksinert eller uvaksinert fisk, og heller ikkje mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima (Fig. 16 C). Figur 17 viser røntgenbilete av virvel nr 40-43 frå vaksinert og uvaksinert fisk med L/D-forhold nær gjennomsnittet for dei ulike temperaturregima. I bakre bukregion hadde temperatur gitt ein signifikant effekt (Tab. 12), og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare L/D-forhold i 10-10 temperaturregimet enn i 16-16 temperaturregimet (Fig. 16 C). Temperatur hadde og gitt ein signifikant effekt i fremre haleregion (Tab. 12), der uvaksinert fisk hadde signifikant høgare L/D-forhold i 10-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima (Fig. 16 C). Verken temperatur eller vaksine hadde gitt nokon effekt i bakre haleregion (Tab. 12).

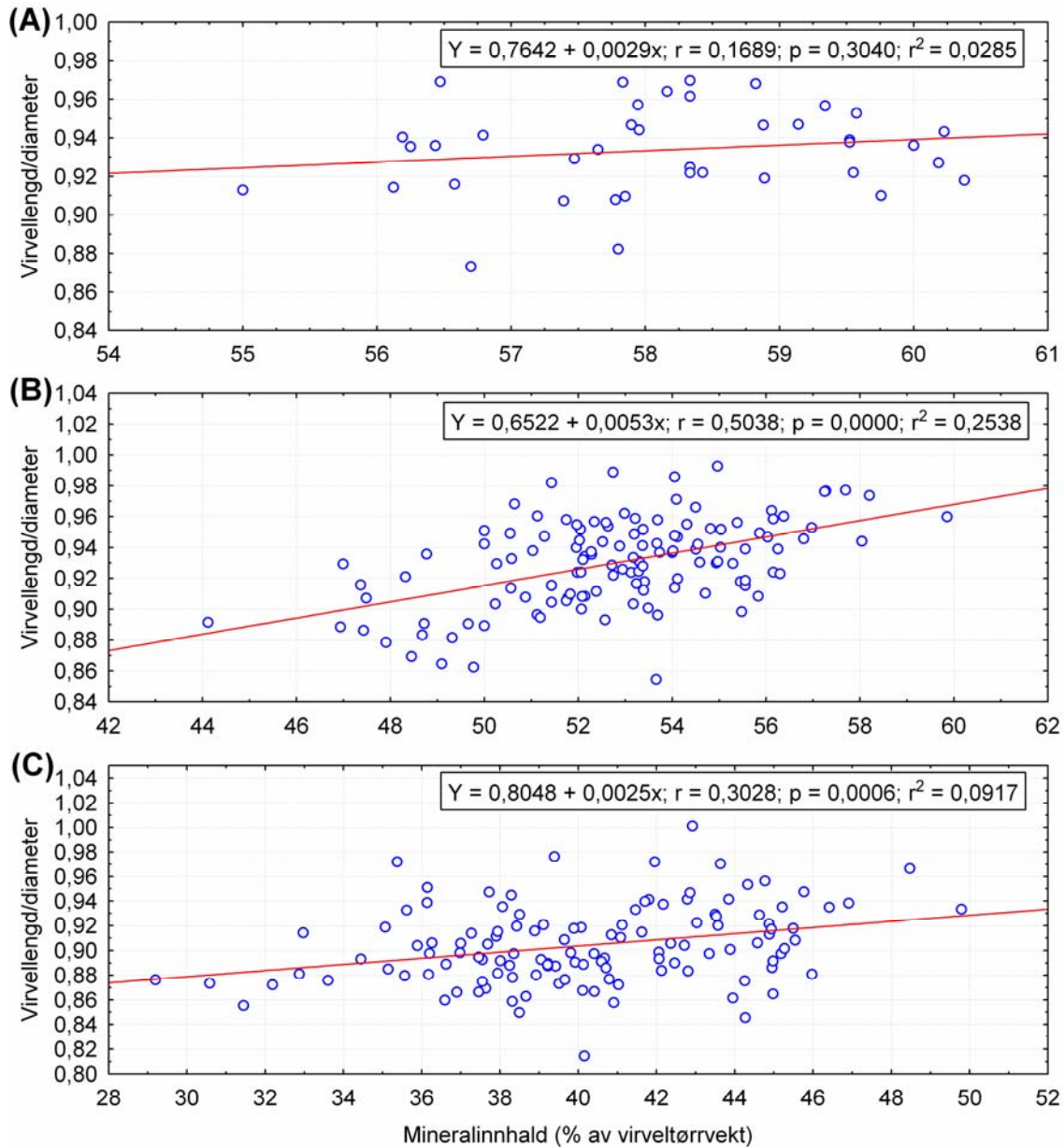
L/D resultatata frå seks veker etter sjøvassoverføring kan oppsummerast med at temperatur hadde gitt ein signifikant effekt i heile bukregionen og i den fremre haleregionen, medan vaksine berre hadde gitt ein signifikant effekt i fremre bukregion. Uvaksinert fisk i 10-10 temperaturregimet hadde signifikant høgare L/D-forhold enn både vaksinert og uvaksinert fisk frå alle dei andre temperaturregima i fremre haleregion. I resten av ryggsøyla var forskjellane i L/D-forholdet mindre, men der var like fullt ein svake tendens til at uvaksinert fisk i 10-10 temperaturregimet hadde høgare L/D-forhold enn dei andre temperaturregima.



Figur 17: Røntgenbilete av virvel nr 40-43 seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6). Figuren viser virvlar frå vaksinert og uvaksinert fisk med L/D-forhold nær gjennomsnittet for dei ulike temperaturregima. Bileta er sortert etter minkande L/D-forhold; (A) 10-10U, (B) 10-16V, (C) 10-10V, (D) 10-16U, (E) 16-10U, (F) 16-10V, (G) 16-16 U, (H) 16-16V.

Samanheng mellom lengd/diameterforhold og mineralinnhald i virvlar under smoltifisering og tidleg sjøvassfase

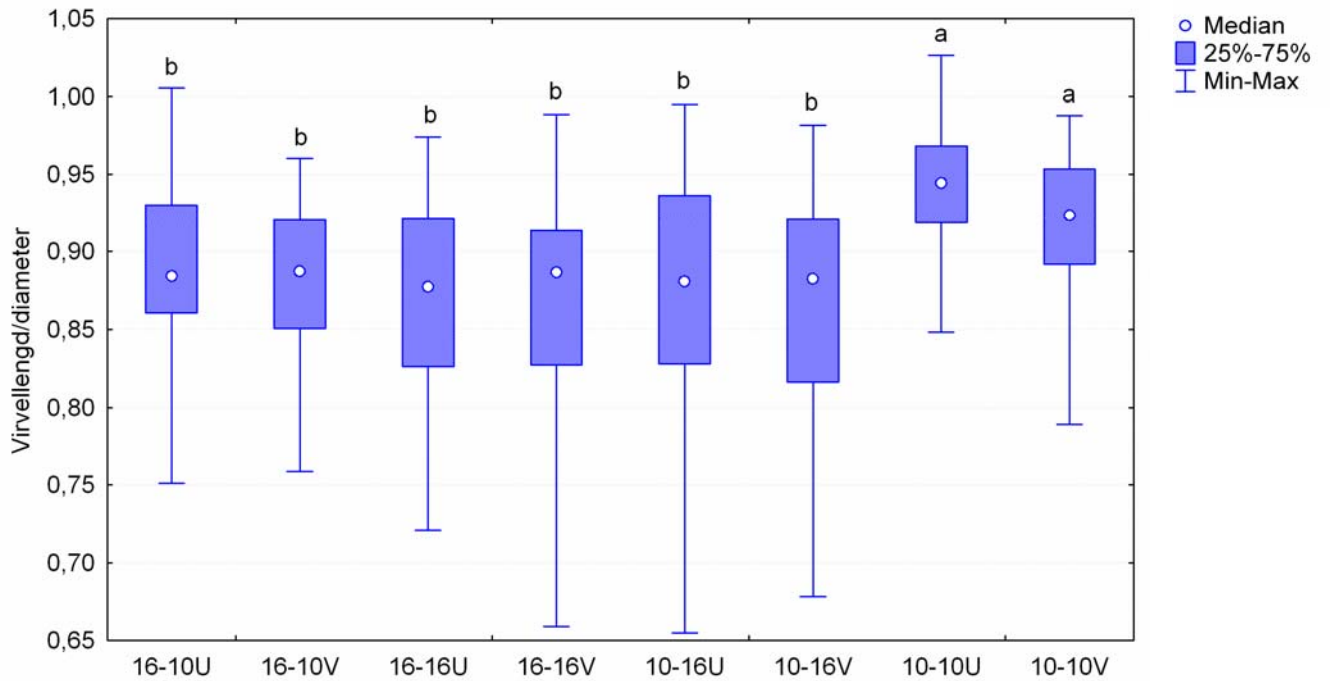
Det var ein signifikant positiv korrelasjon mellom lengd/diameterforholdet og mineralinnhaldet i virvlar både ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring, men ikkje ved forsøksstart (Fig. 18 A, B, C). Ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring kunne høvesvis 25 % og 9 % av variasjonen i virvellengd/diameterforholdet forklarast med variasjon i mineralinnhaldet i virvlane.



Figur 18: Korrelasjon mellom lengd/diameterforhold og mineralinnhald (som % av tørrvekt) i virvlar (A) seks veker før sjøvassoverføring, (B) ved sjøvassoverføring og (C) seks veker etter sjøvassoverføring. Lengd/diameterforholdet er gitt som gjennomsnittleg L/D-forhold til virvel nr 40-43 og mineralinnhaldet er målt som samleprøvar med dei same virvlane.

Lengd/diameterforhold hjå virvlar 42 veker etter sjøvassoverføring

Temperatur, men ikkje vaksine, hadde hatt ein signifikant effekt på det gjennomsnittlege L/D-forholdet i virvel nr 40-43, 42 veker etter sjøvassoverføring (Fig. 19, Tab. 13). Både vaksinert og uvaksinert fisk hadde signifikant høgare L/D forhold i 10-10 temperaturregimet enn i dei andre temperaturregima (Fig. 19).



Figur 19: Lengd/diameterforhold i virvel nr 40-43 (gjennomsnitt per individ, n = 48-54), 42 veker etter sjøvassoverføring. Ulike små bokstavar angir signifikant forskjellig ($p \leq 0,05$) L/D-forhold i gruppene, testa med Newman-Keuls test.

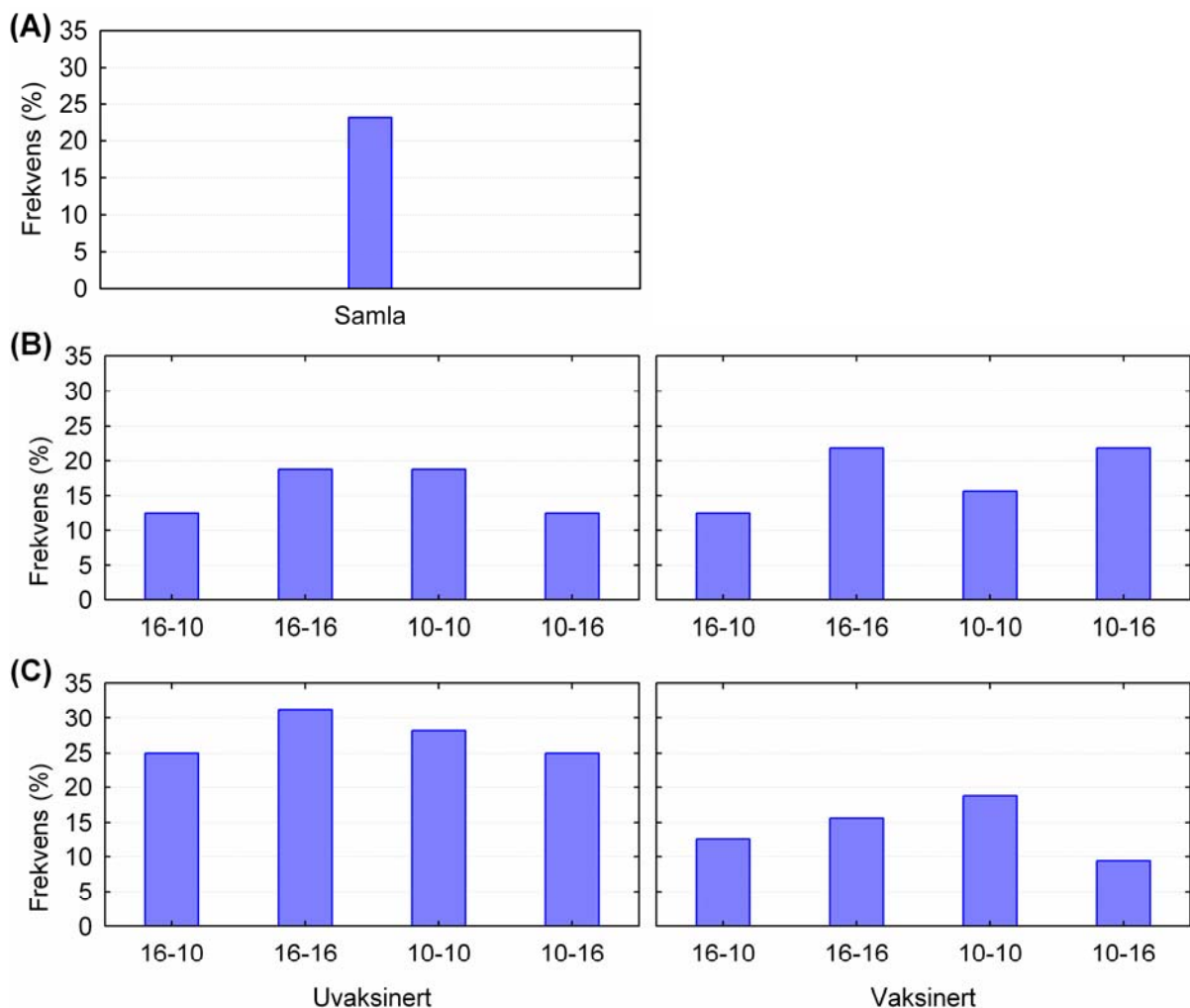
Tabell 13: p-verdiar frå tovegs ANOVA for L/D-forhold i virvel nr 40-43, 42 veker etter sjøvassoverføring. Analysen var utført på arcsinustransformerte gjennomsnittlege L/D-forhold per individ. Fullstendige statistiske testar for L/D-forholdet i virvel nr 40-43 42 veker etter sjøvassoverføring er lagt ved i appendiks C, Tab. C39-C40.

Variabel	p-verdi
Temperatur	0,0000
Vaksine	0,0503
Interaksjon	0,4175

3.4 Deformasjonar

3.4.1 Virveldeformasjonar ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase

Verken temperatur eller vaksine hadde gitt nokon signifikant effekt på innslaget av fisk med minst ein deformert virvel ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6) (Fig. 20, Tab. 14). Det var ein ikkje-signifikant tendens til at uvaksinert fisk hadde høgare innslag av deformerte individ enn vaksinert fisk seks veker etter sjøvassoverføring. Samla sett var prevalensen av fisk med virveldeformasjonar 23,0 % seks veker før sjøvassoverføring, 16,8 % ved sjøvassoverføring og 20,7 % seks veker etter sjøvassoverføring.



Figur 20: Innslag av individ med minst ein virveldeformasjon (ankylose eller kompresjon) seks veker før sjøvassoverføring (A) (n = 39), ved sjøvassoverføring (B) (n = 32; 8 per kar) og seks veker etter sjøvassoverføring (C) (n = 32; 8 per kar). Det var ingen signifikante forskjellar mellom temperaturregima eller mellom vaksinert og uvaksinert fisk.

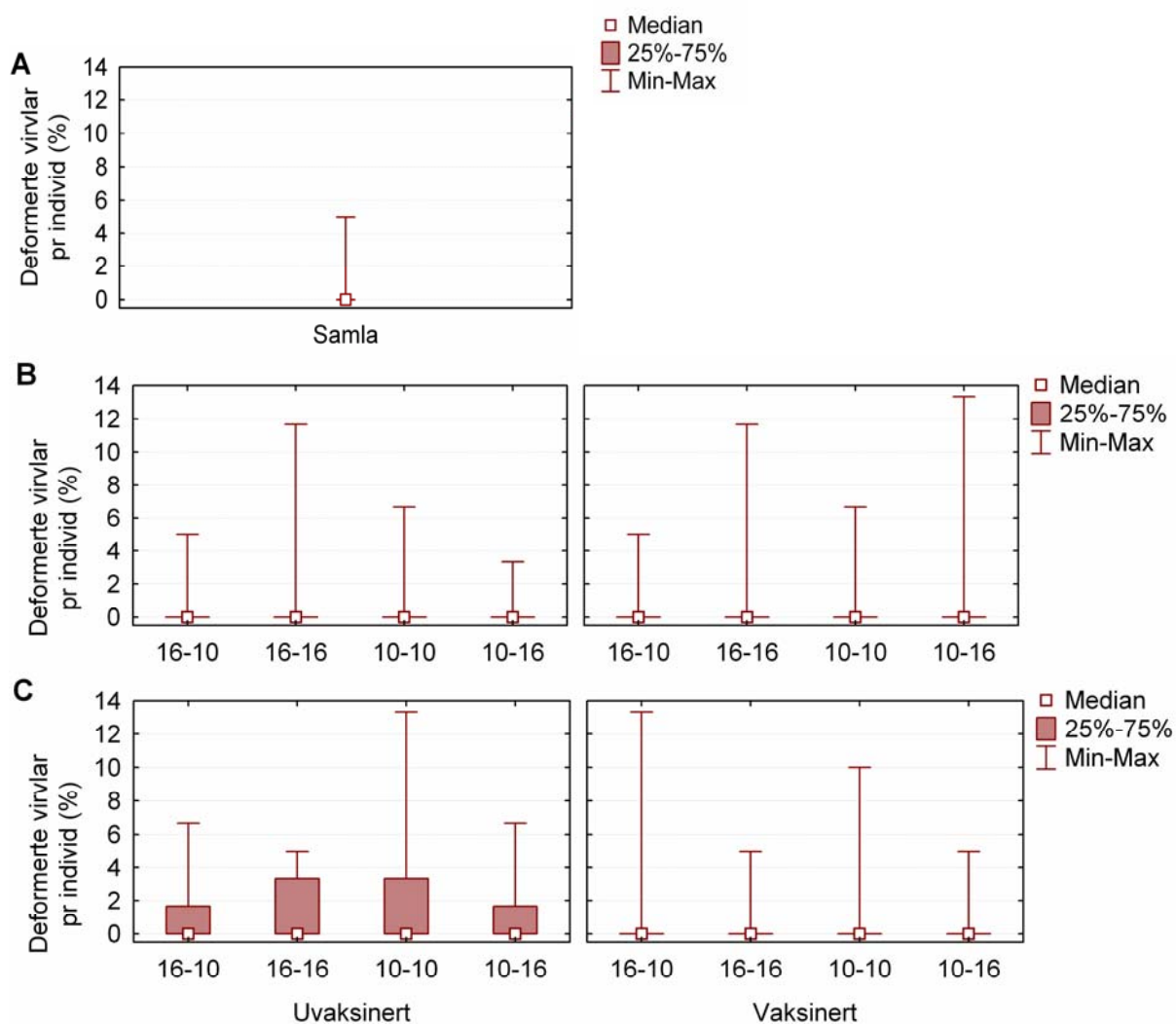
Tabell 14: p-verdiar frå Pearsons kji-kvadrattest for effekten av temperatur og vaksine på innslaget av fisk med ryggvirveldeformasjonar (ankylose og tydelege kompresjonar) ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6). p-verdiane angir sannsynet for at gruppene har lik frekvensfordeling. Fullstendige statistiske testar for innslaget av fisk med deformerte virvlar er lagt ved i appendiks C, tabell C42.

Veker etter sjøvassoverføring	Variabel	Testa på	p-verdi
0	Temperatur	Vaksinert fisk	0,6983
0	Temperatur	Uvaksinert fisk	0,8138
0	Vaksine	16-10 regime	1,0000
0	Vaksine	10-16 regime	0,3202
0	Vaksine	16-16 regime	0,7560
0	Vaksine	10-10 regime	0,7404
6	Temperatur	Vaksinert fisk	0,7308
6	Temperatur	Uvaksinert fisk	0,9334
6	Vaksine	16-10 regime	0,2002
6	Vaksine	10-16 regime	0,0976
6	Vaksine	16-16 regime	0,1401
6	Vaksine	10-10 regime	0,3760

Verken temperatur eller vaksine hadde gitt nokon signifikant effekt på innslag av deformerte virvlar per individ ved nokon av tidspunkta (Fig. 21, Tab 15). Seks veker etter sjøvassoverføring var det ein svak, ikkje signifikant tendens til at uvaksinert fisk hadde høgare innslag av deformerte virvlar pr individ enn vaksinert fisk.

Den samla frekvensen av deformerte virvlar var 0,90 % seks veker før sjøvassoverføring (veke -6), 0,76 % ved sjøvassoverføring (veke 0) og 0,98 % seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6). Seks veker før sjøvassoverføring (veke -6) var alle deformasjonane kompresjonar (sjå døme på røntgenbilete av kompresjon i Fig. 27 B & C). Ved sjøvassoverføring (veke 0) var 83,6 % av deformasjonane kompresjonar og 16,4 % ankyloser (sjå døme på røntgenbilete av ankylose i Fig. 27 D; E & F). Seks veker etter sjøvassoverføring (veke +6) var 18,5 % ankyloser og 81,5 % kompresjonar. Frekvensen av ankyloser og kompresjonar for vaksinert og uvaksinert fisk ved ulike temperaturregime, fordelt på ulike regionar av ryggsgøyla, er lagt ved i appendiks B, tabell B1.

Oppsummeringsvis hadde verken temperatur eller vaksine hatt nokon signifikant effekt på innslaget av individ med virveldeformasjonar eller innslaget av deformerte virvlar pr individ sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Innslaget av individ med deformerte virvlar auka heller ikkje frå forsøksstart til seks veker etter sjøvassoverføring.



Figur 21: Innslag av deformerte virvlar per fisk (A) seks veker før sjøvassoverføring (n = 39), (B) ved sjøvassoverføring (n = 32; 8 per kar) og (C) seks veker etter sjøvassoverføring (n = 32; 8 per kar). Det var ingen signifikante forskjellar mellom temperaturregima eller vaksinert og uvaksinert fisk.

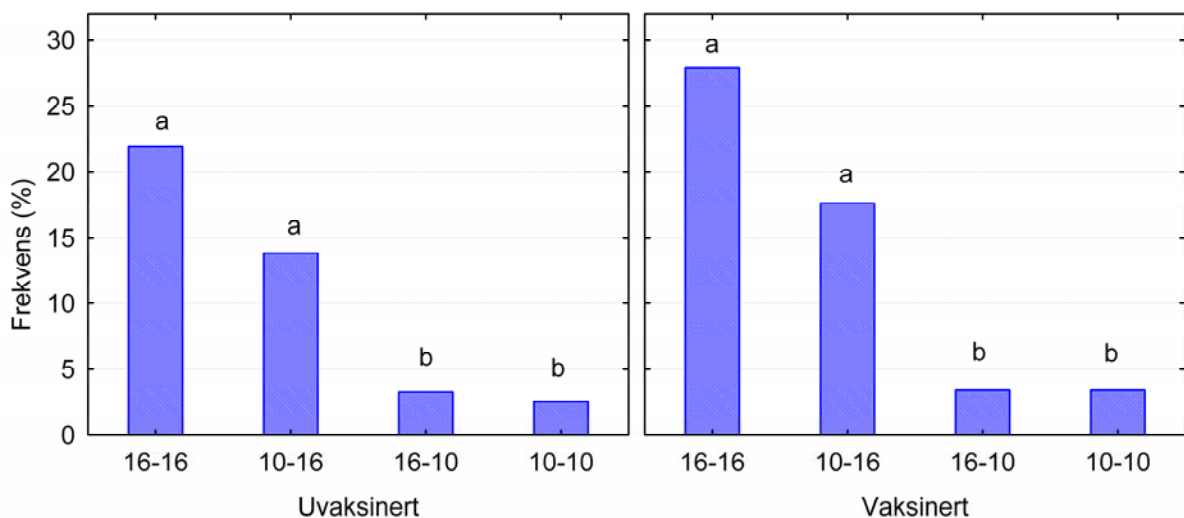
Tabell 15: Einvegs ikkje-parametriske ANOVA testar for prosent deformerte virvlar per individ ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Fullstendige statistisk testar for innslaget av deformerte virvlar per individ er lagt ved i appendiks C, tabell C43-C44.

Veker etter sjøvassoverføring	Variabel	Testa på	p-verdi	Signifikanstest
0	Temperatur	Vaksinert fisk	0,6611	Kruskal-Wallis test
0	Temperatur	Uvaksinert fisk	0,6868	Kruskal-Wallis test
0	Vaksine	16-10 regime	0,9839	Man-Witney U-test
0	Vaksine	10-16 regime	0,4441	Man-Witney U-test
0	Vaksine	16-16 regime	0,8720	Man-Witney U-test
0	Vaksine	10-10 regime	0,7883	Man-Witney U-test
6	Temperatur	Vaksinert fisk	0,7305	Kruskal-Wallis test
6	Temperatur	Uvaksinert fisk	0,9305	Kruskal-Wallis test
6	Vaksine	16-10 regime	0,3683	Man-Witney U-test
6	Vaksine	10-16 regime	0,2709	Man-Witney U-test
6	Vaksine	16-16 regime	0,2167	Man-Witney U-test
6	Vaksine	10-10 regime	0,5192	Man-Witney U-test

3.4.2 Deformasjonar 42 veker etter sjøvassoverføring

Ytre teikn på deformasjonar

Temperatur, men ikkje vaksine, hadde gitt ein signifikant effekt på innslag av fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar 42 veker etter sjøvassoverføring (Fig. 23, Tab. 16). Døme på fisk med og utan ytre teikn på deformasjonar er vist i figur 24. Både vaksinert og uvaksinert fisk hadde høgare innslag av ytre teikn på deformasjonar i 16-16 og 10-16 temperaturregima enn i 10-10 og 10-16 temperaturregima. I tillegg var det ein ikkje-signifikant tendens til at både vaksinert og uvaksinert fisk i 16-16 temperaturregima hadde høgare deformasjonsinnslag enn 10-16 temperaturregimet (Fig. 23).



Figur 23: Innslag av individ med ytre teikn på virveldeformasjonar (n = 68 – 94), 42 veker etter sjøvassoverføring. Høvevis vaksinert og uvaksinert fisk med ulike små bokstavar har signifikant forskjellig deformasjonsinnslag mellom temperaturregima (testa med parvis Pearson kji-kvadrattest og sekvensell bonferronikorleksjon). Det var ingen signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima.

Tabell 16: p-verdiar frå Pearson Kji-kvadrattest for fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar 42 veker etter sjøvassoverføring. Effekten av temperatur vart testa for vaksinert og uvaksinert fisk kvar for seg, og effekten av vaksine vart testa for dei ulike temperaturregima kvar for seg. Fullstendige statistiske testar for fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar er lagt ved i appendiks C, tabell C45-C46.

Variabel	Testa på	p-verdi
Temperatur	Vaksinert fisk	0,0018
Temperatur	Uvaksinert fisk	0,0036
Vaksine	16-10 regime	0,9605
Vaksine	10-16 regime	0,8887
Vaksine	16-16 regime	0,5095
Vaksine	10-10 regime	0,1613

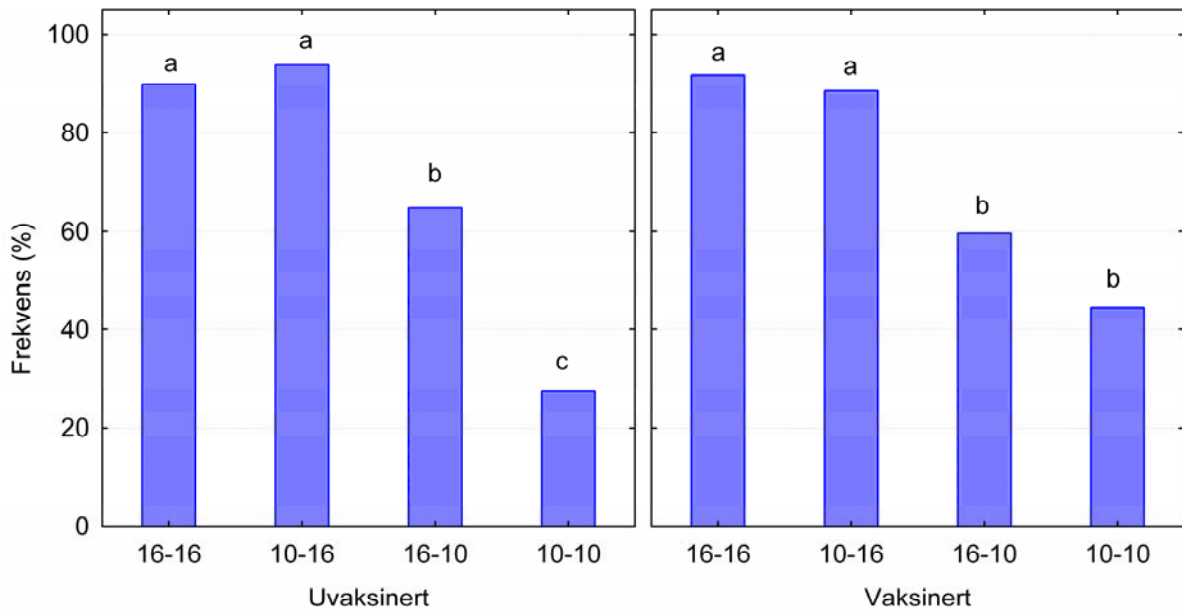


Figur 24: Fisk undersøkt for ytre teikn på virveldeformasjonar ved hjelp av palpering. (A) Fisk utan ytre teikn på virveldeformasjonar. (B) Fisk med deformasjonar lokalisert i bakre del av ryggspyla (bak bakre kant av ryggfinna). (C) Fisk med deformatsjon lokalisert i fremre del av ryggspyla (mellom bakre kant av gjellelokket og bakre kant av ryggfinna).

Av fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar var 77,6 % av deformasjonane lokalisert i bakre del av ryggspyla og 22,4 % i fremre del av ryggspyla (sjå døme i Fig. 24). Rådata for vaksinert og uvaksinert fisk ved ulike temperaturregime er lagt ved i appendiks B, tabell B2.

Deformasjonar basert på radiologiske undersøkingar

Temperaturregime hadde ein signifikant effekt på innslag av fisk med minst ein deformert virvel 42 veker etter sjøvassoverføring (Fig. 25, Tab. 17). Uvaksinert fisk hadde signifikant høgare innslag av deformert fisk i 16-16 og 16-10 temperaturregima enn dei andre regima, og i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 regimet. Vaksinert fisk hadde signifikant høgare innslag i 16-16 og 10-16 temperaturregima enn i 16-10 og 10-10 temperaturregima. Det var òg eit ikkje-signifikant tildriv til høgare innslag av deformert fisk i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 temperaturregimet (Fig. 25). Vaksine hadde ikkje nokon signifikant effekt innafor nokon av temperaturregima (Tab. 17).

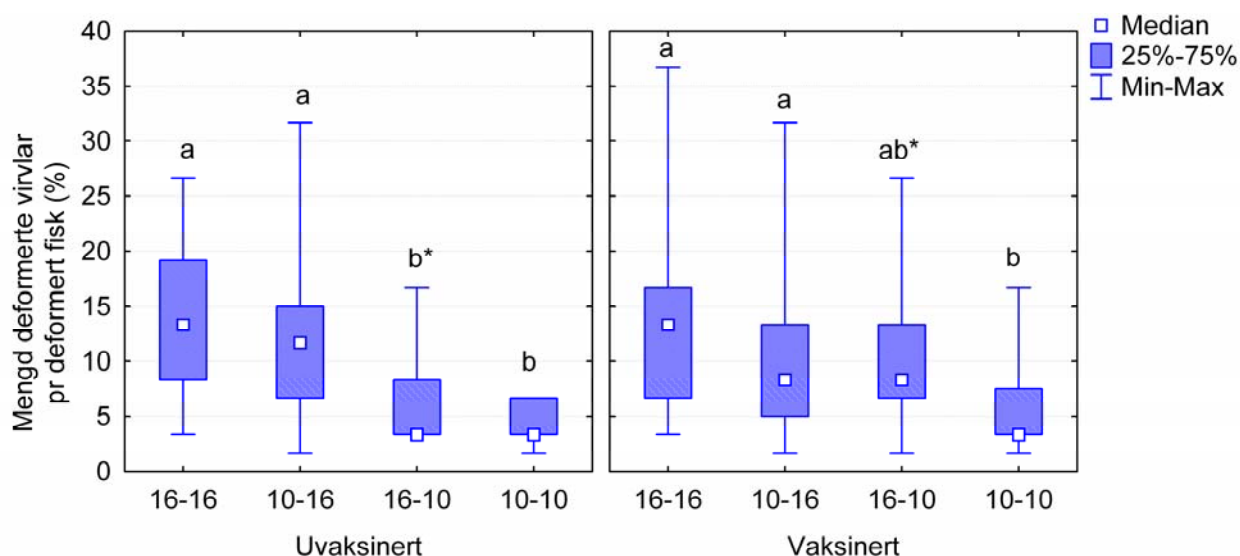


Figur 25: Innslag av fisk med virveldeformasjonar (n = 48 – 52), basert på røntgenundersøking, 42 veker etter sjøvassoverføring. Fisk med minst ein deformert virvel vart kategorisert som deformert. Høvevis vaksinert og uvaksinert fisk med ulike små bokstavar har signifikant forskjellig deformasjonsinnslag mellom temperaturregima (testa med parvis Pearson kji-kvadrattest og sekvensell bonferronkorreksjon). Det var ingen signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima.

Tabell 17: p-verdiar frå Pearson Kji-kvadrattest for fisk med minst ein virveldeformasjon, 42 veker etter sjøvassoverføring. Effekten av temperatur vart testa for vaksinert og uvaksinert fisk kvar for seg, og effekten av vaksine vart testa for dei ulike temperaturregima kvar for seg. Fullstendige statistiske testar for innslag av fisk med virveldeformasjonar er lagt ved i appendiks C, Tab. C47-C48.

Variabel	Testa på	p-verdi
Temperatur	Vaksinert fisk	0,0000
Temperatur	Uvaksinert fisk	0,0000
Vaksine	16-10 regime	0,5944
Vaksine	10-16 regime	0,3559
Vaksine	16-16 regime	0,7509
Vaksine	10-10 regime	0,0701

Temperatur hadde gitt ein signifikant effekt på mengd deformerte virvlar per individ hjå både vaksinert og uvaksinert fisk med minst ein deformert virvel (Fig. 26, Tab. 18), 42 veker etter sjøvassoverføring. Uvaksinerte fisk hadde signifikant høgare innslag av deformerte virvlar i 16-16 og 10-16 temperaturregima enn i 16-10 og 10-10 regima. Vaksinert fisk hadde signifikant høgare innslag av deformerte virvlar i 16-16 og 10-16 temperaturregimet enn i 10-10 regimet, medan individa i 16-10 temperaturregimet ikkje var signifikant forskjellig frå nokon av dei andre temperaturregima (Fig. 26). Vaksine hadde berre gitt effekt i 16-10 temperaturregimet (Tab. 18), der vaksinert fisk hadde signifikant fleire deformerte virvlar per individ enn uvaksinert (Fig. 26).

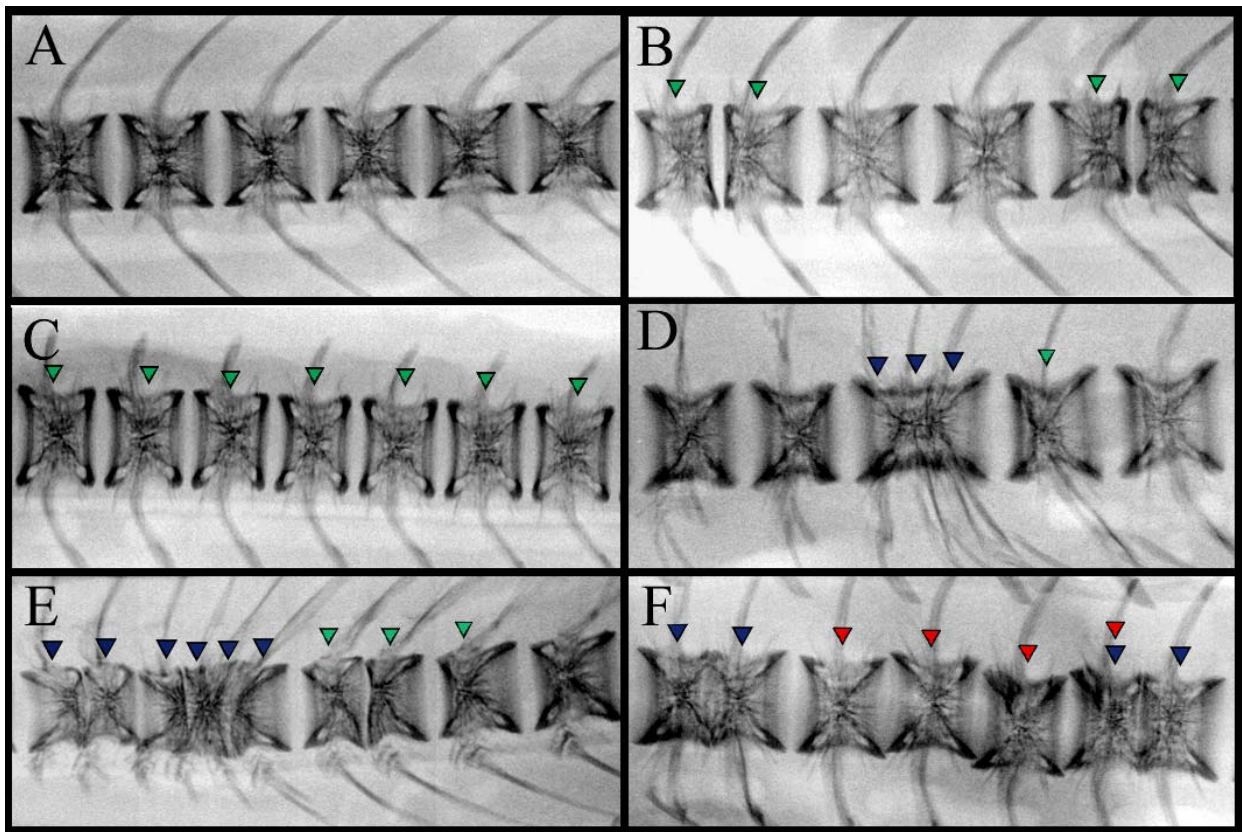


Figur 26: prosent deformerte virvlar per individ (n = 14 – 46) hjå fisk med virveldeformasjonar, 42 veker etter sjøvassoverføring. Ulike små bokstavar hjå høvesvis uvaksinert og vaksinert fisk angir signifikant forskjellig innslag av deformerte virvlar (Kruskal-Wallis test) mellom temperaturregima. * angir signifikant forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk innafor temperaturregima (Man-witney U-test).

Tabell 18: p-verdiar for effekten av temperatur og vaksine på mengd deformerte virvlar per deformert fisk, 42 veker etter sjøvassoverføring. Effekten av temperatur vart testa på uvaksinert og vaksinert fisk kvar for seg, og effekten av vaksine vart testa for kvar temperaturgruppe for seg. Fullstendige statistiske testar for mengd deformerte virvlar per individ hjå deformert fisk er lagt ved i appendiks C, tabell C49-C51.

Variabel	Testa på	p-verdi	Signifikanstest
Temperatur	Uvaksinert fisk	0,0000	Kruskal-Wallis test
Temperatur	Vaksinert fisk	0,0003	Kruskal-Wallis test
Vaksine	16-10	0,0039	Man-Witney U-test
Vaksine	10-16	0,0947	Man-Witney U-test
Vaksine	10-10	0,5251	Man-Witney U-test
Vaksine	16-16	0,6795	Man-Witney U-test

Av dei deformerte virvlane 42 veker etter sjøvassoverføring var 79,9 % kompresjonar, 18,5 % ankyloser og 1,7 % dislokasjonar (sjå døme på røntgenbilete Fig. 27). Frekvensen av dei ulike deformasjonstypane fordelt på ulike regionar for vaksinert og uvaksinert fisk i ulike temperaturregime er lagt ved i appendiks B, Tab. B1.



Figur 27: Røntgenbilde av normale og deformerte virvlar hjå haustsmolt 42 veker etter sjøvassoverføring. Komprimerte virvlar er indikert med grønne pilhovud, ankyloser med blå pilhovud og dislokasjonar med raude pilhovud. (A) Normale virvlar, nr 43-48 (B) Kompresjon i virvel nr 41-42 og virvel nr 45-46. (C) Kompresjon i virvel nr 40-46. (D) Ankylose og kompresjon i virvel nr 35-37 og kompresjon i virvel nr 38. (E) Ankylose og kompresjon i virvel nr 17-22 og kompresjon i virvel nr 23-25. (F) Ankylose i virvel nr 36-37, dislokasjon mellom virvel nr 38-41 og ankylose og kompresjon i virvel nr 41-42.

Oppsummeringsvis hadde 16-16 og 10-16 temperaturregima signifikant høgare innslag av individ med ytre teikn på virveldeformasjonar, signifikant høgare innslag av individ med minst ein deformert virvel, og for det meste signifikant fleire deformerte virvlar pr deformert fisk, enn 10-10 og 16-10 temperaturregima ved slakt. Det var òg ein tendens til at 16-10 temperaturregimet hadde høgare innslag av individ med minst ein deformert virvel enn 10-10 temperaturregimet. Vaksine hadde hatt svært liten eller ingen effekt på deformasjonsdanninga.

4. Diskusjon

4.1 Metodediskusjon

4.1.1 Temperatur

Vasstemperaturane som vart brukt i den eksperimentelle perioden vart valt på grunnlag av vekstresultat frå tidlegare forsøk. Ein ferskvasstemperatur på 16 °C har i fleire forsøk gitt den høgaste veksthastigheita, medan 10 °C har gitt ein meir moderat vekst (Johnston & Saunders, 1981, Austreng et al., 1987, Dwyer & Piper, 1987). Liknande vekstresultat har òg blitt vist i sjøvassperioden (Austreng et al., 1987, Handeland et al., 2008). Dei valte temperaturane er òg relevante med omsyn til kva temperaturar ein finn både i ferskvassfasen og sjøvassfasen i kommersiell oppdrett. Undersøkingar frå ei rekke norske settefiskanlegg frå 1999-2001 viste at vasstemperaturen i kar ei veke før sjøvassoverføring var mellom 3 °C og 16 °C (Åtland et al., 2007). I 2007 viste temperaturmålingar av overflatevatn mellom Bergen og Kirkenes temperaturar mellom 8 °C og 17 °C i august, mellom 8 °C og 14 °C i september, mellom 7 °C og 12 °C i oktober og mellom 4 °C og 10 °C i november (<http://data.nodc.no/termograf/>). Dette betyr at haustsmolt som vert sett ut tidleg om hausten kan oppleve 16 °C i den tidlege sjøvassfasen, medan haustsmolt som vert sett ut seinare sannsynlegvis får meir moderate temperaturar i denne perioden.

Grunna små dimensjonar på røyra som frakta vatn til blandestokkane, var det ikkje mogleg å berre bruke temperaturregulert vatn i eksperimentet. Dette gjorde det vanskeleg å halde temperaturane i kara stabile over heile ferskvassperioden, då det ikkje-tempererte vatnet varierte med utetemperaturane. Problemet var størst i 10 °C kara, då desse hadde størst del ikkje-temperert vatn. Parr vert utsett for liknande eller større temperaturvariasjonar i naturen, og det er lite truleg at temperaturvariasjonane verka stressande på fisken. I sjøvassperioden hadde kara som fekk 16 °C vatn eit par små temperaturhopp no og då. Årsaka til dette var at andre temperaturforsøk på forskingsstasjonen påverka temperaturen på det oppvarma vatnet i korte periodar. Variasjonane var like fullt ikkje større enn ± 2 °C. Data frå vertikale temperaturforskjellar og symjedjup i kommersielle oppdrettsanlegg på Vestlandet har indikert at laksen nokre plassar vert utsett for daglege temperatursvingingar heilt opp mot 8 °C (Johansson et al., 2007).

4.1.2 Oksygen og pH

Mattilsynet anbefalar ein pH på mellom 6,2 og 6,8 i innløpet, og ein oksygenmetting på mellom 80 – 100 % i utløpet frå laksefiskanlegg i ferskvassfasen (Mattilsynet, 2005). Både dei registrerte pH og oksygennivå låg for det meste innafor desse grensene, men i slutten av ferskvassperioden hadde eit par av temperaturregima eit oksygennivå ned mot 74 %. Det var inga teikn til at oksygenivåa i kara påverka veksten til fiskane i løpet perioden dei vart haldne i kar. Ikkje-optimale oksygenivå har vist

seg å kunne føre til redusert appetitt og vekst, og ved alvorlige tilfelle mistriksel og eventuell død (Staurnes et al., 1998).

Øg i sjøvassfasen er det anbefalt at oksygenmettinga ligg over 80 %. I eit studium der fire forskjellige anlegg vart observert, vart det likevel vist at to av anlegga hadde oksygennivå heilt ned mot 60 % somme stadar i merden (Johansson et al., 2007). Begynnande responsar for dårleg oksygennivå for marine anadrome laksefisk har blitt observert ved 78,5 % metting (Davis, 1975). Dei registrerte oksygennivåa i avløpsvatnet i dette forsøket låg for det meste mellom 75 % og 95 %. pH-verdiane haldt seg mellom 7,7 og 7,9 i alle kara. Dette er nær dei normale pH verdiane ein finn i sjøvatn, som er rundt 8 (Campbell, 1993). Etter overføring til merd vart det ikkje utført fleire oksygen- og pH-målingar, då all fisken var samla i same not.

4.1.3 Måling av vekstparameter

Vekta vart målt som våtvekt. Ulik mengd vatn på fisken vil dermed kunne påverke vektmålingane i mindre grad. For å minimere variasjonen i mengd vatn per fisk burde same person ha veid fisken under heile forsøket. Dette vart for det meste gjennomført innafor prøveuttaka, bortsett frå ved startuttaket (veke -6). Forekjellige personar som målte vekt, og små variasjonar i mengd vatn på fisken, kan moglegis vere årsaken til forskjellane ein såg i kondisjonsfaktoren ved dette uttaket (veke -6). Då fisken vart heilt tilfeldig fordelt i kara før lengd- og vekt vart målt, er det lite sannsynleg at det var ein faktisk biologisk forskjell mellom temperaturregima. Forskjellane i kondisjonfaktor ved startuttaket vert difor ikkje diskutert vidare i resultatdiskusjonen.

Det er ganske vanleg å svelte fisken før veking. Dette vart ikkje gjort i ferskvassfasen og den tidlege sjøvassfasen, då fôringa måtte blitt manuelt avslått i løpet av helga. Etersom fisken vart fôra kontinuerleg gjennom heile døgeret i denne perioden, vart heller ikkje forskjell i mageinnhald over tid rekna som eit problem. Etter at fisken vart overført til merd, vart dei haldt ved naturleg lys og berre fôra om dagen. Mage- og tarminnhald ville difor variere meir over tidsrommet prøveuttaket føregjekk, og fisken vart difor svelta i to døger før veking.

For å kunne diskutere korleis veksten i ulike tidsrom påverka parameter som t.d. beinmineralisering og deformasjonsdanning vart lengd og vektresultata nytta til å berekne dagleg lengdevekst og vektauke. Eit logaritmisk mål på vektauke (spesifikk vektauke, % dag⁻¹) vart valt i staden for absolutt vektauke (g dag⁻¹), då fisk aukar i vekt etter ein S-forma sesongmessig kurve (Ricker, 1979). Lengdeveksten vart derimot berekna som absolutt lengdevekst (lengdevekst, mm dag⁻¹), då det ikkje er vanleg å bruke logaritmiske vekstmål for lengd (Ricker, 1979).

4.1.4 Måling av mineralinnhald i ryggvirvlar

Mineralinnhaldet i virvlane vart målt som prosent mineralvekt av tørrvekt. Riktigheita av målingane var dermed avhengig av god reinsing og avfeitting av virvlane for å fjerne det som ikkje var beinvev, og fullstendig forbrenning av det organiske materialet.

Mellom virvlane var det til tider svært store mellomrom, spesielt hjå individ oppdretta ved 16 °C i ferskvatn. Det mjuke vevet mellom virvlane vart antatt å vere intervertebralligament og periostalligament, og vart dissekert bort. Det er mogleg at deler av dette vevet var ikkje-mineralisert osteoid (sjå diskusjon i kapittel 4.1.7). Dersom dei bortkutta delane faktisk var umineralisert osteoid, vil mineralinnhaldet i virvlane vere enda lågare, og forskjellane mellom temperaturregima vil vere større, enn kva som vart målt.

Kacem et al. (2000) fjerna vev frå ryggvirvlar ved å koke fisken lett og deretter børste virvlane reine i rennande vatn. Virvlane i vårt forsøk forsøket vart òg analysert for styrke, sjølv om det ikkje har blitt tatt med i denne oppgåva. Då det er vel kjent at høg temperatur kan denaturere protein, og dermed påverke styrken i beinet, vart det valt å ikkje koke fisken i dette forsøket. Virvlane vart i staden skrubba reine med neglebørste i lunka/varmt rennande vatn.

Det finnes mange metodar for å fjerne feitt frå bein. Fjellidal et al. (2004; 2005; 2006; 2007 b) avfeitta virvlar i heksanbad, Kacem et al. (1998; 2000) brukte ei blanding av aceton og trikloreten, Witten et al. (2006) og Gil Martens et al. (2006) nytta ei blanding av aceton og metanol, Clifton et al. (2008) brukte ammoniakk til å avfeitte ribbein frå sjøku, medan Chappard et al. (2006) brukte ei blanding av aceton og kloroform for å avfeitte menneskeknoklar. I ein test av utvalte avfeittingsmiddel, der heksan, ei blanding av aceton og kloroform, lut, ammoniakk, Zalo og Biotex vart utprøvd, vart det funne at blandinga av aceton og kloroform var det beste avfeittingsmiddelet (appendiks D). Metoden til Kacem et al. (1998; 2000) vart ikkje utprøvd grunna giftigheita til trikloreten (CAS nr 79-01-6), og blandinga av aceton og metanol vart ikkje utprøvd grunna mangel på materiale. Heksan viste seg å vere eit svært dårleg avfeittingsmiddel, og gav eit mineralresultat som var ca 10 % lågare enn ved avfeitting med aceton og kloroform. Ved samanlikning av mineralinnhald i virvlar mellom ulike forsøk, er det difor viktig å vite kva avfeittingsmetode som vart brukt.

Fjellidal et al. (2006) målte tørrvekta til virvlar etter å ha tørka dei ved 90 °C i varmeskap over natt. Mkukuma et al. (2004) fann at vatn fordampa frå skulderboge frå torsk ved rundt 100 °C. I dette forsøket vart difor virvlane tørka ved 100 °C .

Kacem et al. (2000) brente virvlar ved 750 °C i 6 timar for å fjerne alt det organiske materialet frå beinvevet. For å få ein meir skånsam brenning (både med omsyn på steinplatene i omnen og på

virvlane) vart det valt å brenne virvlane i eit trinnvis program (115 °C i 0,5 t, 540 °C i 4 t, og 750 °C i 6 t). Dette var ein litt kortare variant av metoden brukt av Fjellidal et al. (2004; 2005; 2006; 2007 b; 2008), som brann virvlane i totalt 13 timar (115 °C i 0,5 t, 540 °C i 5 t, og 750 °C i 8 t). Den kortare varianten vart brukt for at virvlane skulle kunne brennast over natt, og vegast neste arbeidsdag. Etter metoden til Kacem et al. (2000) vart det antatt at seks timar ved 750 °C var nok til å få ein fullstendig forbrenning av det organiske materialet. Det organiske materialet i bein vert omgjort til gass ved temperaturar mellom 200-600 °C (Mkukuma et al., 2004). Ved temperaturar over 550 °C vil òg karbonatdelen i mineralkrystalla forsvinne og berre etterlate beinsalt av OH-apatitt og/eller β -trikalsiumfosfat (Biltz et al., 1981). Kva av dei tre nemde brenningsprogramma ein vel å bruke, har difor sannsynlegvis ingen ting å sei for sluttvekta.

4.1.5 Måling av kalsium og fosfat i virvlar

For å løyse opp mineralkrystalla og få prøvematerialet i væskeform vart virvlane løyst i salpetersyre. Etter anbefaling frå Frank Huang i BioAssay systems (Hayward i California), produsenten av reagenskitta som vart brukt i kalsium- og fosfatmålingane, vart løysningane pH justert til mellom 6 og 7. Dette vart gjort med 0,3 M natriumhydroksid. Dessverre var det svært vanskeleg å få den ønska surleiksgraden i alle prøvane, då beinminerala verka inn på pH. I nokre prøvar vart løysninga basisk, noko som førte til mineralutfellingar. Prøvane med synleg utfelling måtte kastast. I staden for å prøve å justere pH'en til mellom 6 og 7 burde prøvane berre ha blitt tilsett nok natriumhydroksid til å komme innafor bufferkapasiteten til reagenskitta.

Den spektrofotometriske metoden som vart valt for målingane, vart bestemt ut frå arbeidsmengd ved analysen og tilgjengelege analyseinstrument på laboratoriet. Linjeariteten til standardkurva, presisjonen ved målingane og inkuberingsstida vart sjekka før analysering. Kalsium- og fosforresultat frå ein testkøyring vart òg funne til å stemme godt overeins med tidlegare funn frå laksevirvlar (Graff et al., 2002).

4.1.6 Måling av kalsium og fosfat i blodprøvar

Då det var planar om å analysere alkalisk fosfatase i dei same blodprøvane som vart brukt til kalsium og fosfatanalysering, vart prøvane sentrifugert og separert innan 4 timar. Dette er etter retningslinjene for klinisk kjemisk laboratorium ved Haukeland sjukehus. Mange av blodprøvane vart dessverre ganske viskøse, noko som kan ha påverka presisjonen ved pipetteringa. Det er mogleg blodprøvane vart separert for tidleg, då retningslinjene frå laboratoriet på Haukeland er laga for menneskeblod og ikkje fiskeblod. Eventuell unøyaktig pipettering var sannsynlegvis den største kjelda til usikkerheit i serumanalysane. For å unngå viskøse prøvar kunne ein brukt heparinplasma i staden for serum. Serum vart like fullt vurdert til å gje riktigast resultat, då heparintilsetjing i plasmaprøvane

kan gje ulik fortytning etter kor mykje blod ein får ut av kvar fisk. For å minimere pipetteringsfeil vart alle prøvane målt i to brønner og analysert på nytt att dersom prosentavviket mellom målingane var for stort. Målepresisjonen vart dermed vurdert til å vere akseptable, sjølv om ein del prøvar var viskøse.

Ut frå at det ikkje er nødvendig å faste før analysering av verken alkalisk fosfatase, kalsium eller fosfat hjå menneskje (Stakkestad & Åsberg, 2000), vart det bestemt at det ikkje var nødvendig å faste fisken før prøvetaking. Dette kan ha vert ein feilaktig oppfatning, då det er funne store variasjonar i fosfornivået i fiskeblod over tid (4 - 24 timar) etter fôring (Vielma & Lall, 1998). I vårt forsøk vart fisken i forsøket fôra jamt gjennom heile døgeret, ca kvar halvtime. Det vil difor aldri vere lang tid mellom forrige fôring og prøvetakinga i nokon av kara. Tidsrommet frå fôring har difor sannsynlegvis kun gitt mindre variasjonar i fosfornivået.

4.1.7 Deformasjonsundersøking, måling av lengd/diameterforhold og intervertebralrom

Undersøkinga av ytre teikn på virveldeformasjonar vart utført ved hjelp av palpering og dei radiologiske undersøkingane av virveldeformasjonar ved hjelp av visuell gransking. Grensa for kva som vart kategorisert som deformert og normalt vil difor i nokon grad vere subjektivt. For å unngå at resultatata vart influert av forventta deformasjonsfordeling, vart difor analyseringa utført slik at ein ikkje visste kva behandling fiskane hadde fått under eksaminasjonen.

Ved gransking av røntgenbileta kunne overgangen frå normale til komprimerte virvlar vere glidande, og det kunne somme tider vere vanskeleg å vurdere om ein virvel skulle klassifiserast som deformert eller ikkje. For å få eit sikrere og mindre subjektivt mål på kor komprimerte virvlane frå ferskvassfasen og den tidlege sjøvassfasen var, vart difor L/D-forholdet over heile virvelsøyla målt. Usikkerheita i desse målingane bestod helst i at det kunne vere vanskeleg å bedømme kvar virvlane slutta i dårleg mineraliserte endeplater. Dette var òg det største problemet ved målinga av intervertebralromma. Ved måling av intervertebralromma vart det funne signifikante korrelasjonar mellom storleiken på intervertebralromma og mineralinnhaldet i virvlane. Dette kan moglegvis tyde på at det var tjukt osteoid (ikkje-mineralisert nydeponert beinmatriks) i gruppene som såg ut til å ha store intervertebralrom. Då umineralisert osteoid ikkje vil vere synleg på røntgenbileta, kan dette ha gitt inntrykk av større intervertebralrom og mindre virvellengd enn kva som faktisk var tilfelle. Då kvar fisk hadde mellom 58-60 virvlar, var arbeidet med å måle L/D-forholdet svært tidkrevjande. Frå sluttuttaket vart L/D-forholdet difor berre målt i virvel nr 40-43, som er dei same virvlane som vart valt til mineralanalysane tidlegare i forsøket.

4.2 Resultatdiskusjon

4.2.1 Vasstemperaturen påverka veksten i ferskvatn, men ikkje i tidleg sjøvassfase

Høge vasstemperaturar i ferskvatn har syna å auke veksthastigheita til atlantehavslaks (e.g. Johnston & Saunders, 1981, Dwyer & Piper, 1987, Austreng et al., 1987, Handeland et al., 2004), medan vaksinerings har vist seg å gi redusert appetitt den første perioden etter vaksinerings (Sørum & Damsgård, 2004). I samsvar med dette hadde fisk som vart haldt på høg temperatur i ferskvassfasen signifikant hurtigare lengdevekst og vektauke enn fisk som vart haldt på lågare temperatur, og vaksinert fisk hadde signifikant redusert vekst i forhold til uvaksinert fisk. Vektauken i ferskvassperioden var gjennomsnittleg 1,3 % dag⁻¹ og 1,1 % dag⁻¹ for høvesvis uvaksinert og vaksinert fisk som vart haldt på 10 °C, og 1,9 % dag⁻¹ og 1,8 % dag⁻¹ for uvaksinert og vaksinert fisk som vart haldt på 16 °C. I tidlegare forsøk har haustsmolt hatt ein vektauke på mellom 0,9 – 1,5 % dag⁻¹ dei siste vekene før sjøvassoverføring (Graff et al., 2002, Bæverfjord et al., 1998, Fjellidal et al., 2006, 2007 b). I ferskvassperioden hadde dermed parr som vart haldt på 10 °C ein veksthastigheit som er innafor det som er vanleg dei siste vekene før sjøvassoverføring, medan fisk som vart haldt på 16 °C hadde hurtigare vektauke enn vanleg. Mellom tolv veker før og seks veker før sjøvassoverføring er det ikkje desto mindre funne vektaukar opp mot 1,9 % dag⁻¹ hjå hurtigveksande individ (Fjellidal et al., 2007 b).

Atlantehavslaks som vert oppdretta ved naturlege forhold i sjøvassperioden har sesongvariasjonar i appetitt og vekst (Smith et al., 1993, Forsberg, 1995). Fotoperiode og temperatur vart tidleg fastslått som viktige signal i styringa av vekst (Brett, 1979). I temperaturforsøk utført på smolt i sjøvassperioden vart det vist at veksthastigheita til atlantehavslaks auka med stigande temperaturar, opp til ca 14 °C (Austreng et al., 1987, Handeland et al., 2000; 2008). I dette forsøket hadde derimot fisk haldt ved 10 °C og 16 °C lik vektauke og nesten lik lengdevekst i sjøvassperioden. Dette kan moglegvis vere fordi effekten av kontinuerlig lys overstyrte effekten av ulike vasstemperaturar. Fleire seinare forsøk har gitt resultat som indikerer at fotoperiode er eit viktigare signal enn temperatur for å styre sesongvariasjonar i appetitt og vektauke hos atlantehavslaks (Smith et al., 1993, Forsberg et al., 1995, Nordgarden et al., 2003). Det er til dømes blitt demonstrert at postsmolt som vert oppdretta med naturleg lys, har redusert vekst i vinterperioden sjølv om dei vert haldt på konstante temperaturar (Forsberg, 1995). Nordgarden et al. (2003), viste at postsmolt som vart gitt kontinuerleg lys eller simulert naturleg lys med aukande daglengd (8 – 24 t), hadde aukande veksthastigheit sjølv om vasstemperaturane sank frå ca 15 °C til 8 °C. Eventuelt kan det hende at 16 °C var over den optimale temperaturen for vekst i den tidlege sjøvassfasen. I eit forsøk med haustsmolt auka vektauken i dei første 12 vekene etter sjøvassoverføring med aukande

temperaturar frå 6 °C til 14 °C , men sank deretter frå 1,5 % dag⁻¹ til 1,3 % dag⁻¹ frå 14 °C til 18 °C (Handeland et al., 2008). På den andre sida stemmer vektauken i vårt forsøk (gjennomsnittleg 1,5 % dag⁻¹) best med fisken som hadde hurtigast vekst. I tidlegare forsøk har haustsmolt syna ein vektauke på mellom 1,2 og 2,3 % dag⁻¹ dei første 6 til 11 første vekene etter sjøvassoverføring (Oppedal et al., 1999, Graff et al., 2002, Fjellidal et al. 2006; 2007). Veksthastigheita i den tidlege sjøvassfasen ligg dermed innafor kva som er vanleg for haustsmolt i denne perioden. I forhold til kva ein derimot finn hjå vårsmolt, var veksthastigheitene i dette forsøket svært høgt både under smoltifiseringa og i den tidlege sjøvassfasen. Fjellidal et al. (2006) ein vektauke på 0,4 % dag⁻¹ dei siste seks vekene før sjøvassoverføring, og ca 0,2 % dag⁻¹ dei første seks vekene etter sjøvassoverføring hjå vårsmolt.

Kondisjonsfaktoren såg ikkje ut til å ha forandra seg mykje mellom seks veker før sjøvassoverføring og sjøvassoverføring, bortsett frå at den sank ein del hjå dei to dei to gruppene med hurtigast vekst. Laks synar ofte ein nedgang i kondisjonsfaktoren dei siste vekene før sjøvassoverføring (Berg et al., 2006 a, Fjellidal et al., 2006; 2007 b), noko som gjenspeglar den auka feittforbrenninga og lengdeveksten ved smoltifiseringa (Hoar, 1988). Ved sjøvassoverføring var det ingen klar fordeling i kondisjonsfaktoren mellom verken vaksinert og uvaksinert fisk eller mellom temperaturregima. Dei gjennomsnittlege kondisjonsfaktorane varierte mellom 1,18 og 1,21. Dette stemmer godt overeins med resultat frå tidlegare forsøk, der både haustsmolt og vårsmolt har hatt ein kondisjonsfaktor på rundt 1,2 ved sjøvassoverføring (Fjellidal et al., 2006; 2007 b, Berg et al., 2006 a). Etter sjøvassoverføringa har ein i tidlegare forsøk sett at kondisjonsfaktoren enten søkk vidare eller flatar ut (Berg et al., 2006 a, Fjellidal et al., 2006; 2007 b). Dette såg ein òg i dette forsøket, bortsett frå hos vaksinert fisk i 16-16 temperaturregimet. Kondisjonsfaktoren til desse fiskane auka etter sjøvassoverføringa, og etter seks veker i saltvatn hadde dei utvikla signifikant høgare kondisjonsfaktor enn både vaksinert og uvaksinert fisk i alle temperaturregima. Dette er interessant fordi det er funne ein signifikant korrelasjon mellom høg kondisjonsfaktor og høgt innslag av samantrykte virvlar (Berg et al., 2006 a).

4.2.2 Mineralinnhaldet sank gjennom heile den eksperimentelle perioden, spesielt i den tidlege sjøvassfasen

Ved sjøvassoverføring hadde fisk som vart haldt ved høg vassstemperatur, og hadde hatt hurtigast vekst, utvikla lågast mineralinnhald i virvlane. Medan mineralvektauken (% dag⁻¹) var omtrent halvannan gong større hjå fisk haldt på 16 °C enn hjå fisk haldt på 10 °C, var proteinvektauken nesten dobbelt så stor. Dette stemmer godt overeins med hypotesen om at hurtig vekst påverkar mineralisering av bein ved at tidsforskyving mellom proteinavsetjing og mineralisering i virvlar aukar (Fjellidal et al., 2006).

Mineralinnhaldet sank mellom 10 % og 15 % hjå både vaksinert og uvaksinert fisk i alle temperaturregima frå sjøvassoverføring til seks veker etter sjøvassoverføring. Tidlegare studium har syna at både villaks, vårsmolt og haustsmolt har ein nedgang i mineralinnhaldet i virvlane dei første vekene etter sjøvassoverføring, men at nedgangen er størst hjå haustsmolt. Det har òg blitt vist at mineralinnhaldet varierer over ryggsøyla, og at reduksjonen etter sjøvassoverføringa er tydelegast i dei fremre halevirvlane (Fjellidal et al., 2006). Fjellidal et al. (2006) fann ein nedgang i mineralinnhaldet i fremre haleregion (avfeitta i heksanbad) på 8 % frå sjøvassoverføring til tolv veker etter sjøvassoverføring. Kvifor nedgangen i mineralinnhaldet var så mykje større i det gjeldande forsøket er ikkje klart. Det kan ikkje forklarast med hurtigare vekst, då forskjellen i vektauken berre var ca 0,1 % dag⁻¹. Det er mogleg at mineralinnhaldet i forsøket til Fjellidal et al. (2006) auka mellom seks og tolv veker etter sjøvassoverføring, då fiskane hadde ein kraftig nedgang i veksthastigheita i denne perioden. Fleire forsøk har vist at mineralinnhald i virvlar kan auke igjen over tid (Bæverfjord et al., 1998, Fjellidal et al., 2008). Berre eitt anna forsøk, eit diettforsøk, har brukt same avfettingsmetode og same virvlar som dette forsøket. Mineralinnhaldet vart der målt til å vere høvesvis 49 % åtte veker etter sjøvassoverføring og 55 % sytten veker etter sjøvassoverføring hjå fisk fôra med normalt kommersielt fôr, og høvesvis 56 % åtte veker etter sjøvassoverføring og 57 % sytten veker etter sjøvassoverføring hjå fisk fôra med fôr tilsett ekstra mineral (Fjellidal et al., 2008). I dette forsøket vart mineralinnhaldet målt til å ligge mellom 36 % og 43 % seks veker etter sjøvassoverføring. Ut frå dette må mineralinnhaldet hjå både vaksinert og uvaksinert fisk i alle temperaturregima vurderast som lågt. Mineralinnhaldet var like fullt ikkje tilfeldig spreidd over dette området, men hadde delt seg i to klare grupper. Bortsett frå to grupper som avvika frå trenden, var fordelinga slik at dei som hadde hatt høgast temperatur og hurtigast vekst i ferskvassperioden hadde utvikla lågast mineralinnhald. Dei to avvikande gruppene var vaksinert fisk i 16-16 temperaturgruppa, og uvaksinert fisk i 10-16 temperaturgruppa. Dei vaksinerte fiskane i 16-16 temperaturgruppa hadde utvikla signifikant høgare mineralinnhald i virvlane enn dei andre gruppene som var blitt haldt på 16 °C i ferskvassperioden, og dei uvaksinerte fiskane i 10-16 temperaturgruppa hadde utvikla signifikant lågare mineralinnhald enn dei andre gruppene på 10 °C i ferskvatn. I begge desse gruppene kunne ein sjå ein tendens til avvikande karakter i kondisjonsfaktoren. Samstundes med den kraftige nedgangen i mineralinnhaldet til dei uvaksinerte fiskane i 10-16 temperaturgruppa, såg kondisjonsfaktoren til denne gruppa ut til å søkkje meir enn i dei andre gruppene. Det var òg ein svak, ikkje-signifikant tendens til at lengdeveksten til denne gruppa var høgare i sjøvassfasen enn dei andre gruppene som vart haldt på 10 °C i ferskvatn. Dette kan tyde på at hurtigare virvelvekst, moglegvis i kombinasjon med mindre fôrintak, førte til større tidsforskjell mellom proteinavsetjing og mineraliseringa av virvlane i denne gruppa. Resultata frå mineralvektauken og proteinvektauken styrkar denne teorien. Medan mineralvektauken var samanfallande med gruppene som hadde hatt 10 °C i ferskvatn, var det

eit tildriv til at proteinvektauken var høgast hjå uvaksinert fisk i 10-16 temperaturregime blant desse gruppene. Hjå dei vaksinerte fiskane i 16-16 temperaturgruppa, skjedde avviket frå trenden i mineralinnhaldet samstundes med ein kraftig auke i kondisjonsfaktoren. Den høge kondisjonsfaktoren såg ut til å vere ein følgje av mindre lengdevekst i sjøvassperioden. Dette stemmer overeins med at tidsforskyvinga mellom mineralisering og proteinavsettinga vert mindre i periodar med saktare lengdevekst, men den relativt svake reduksjonen i mineralinnhaldet såg ikkje ut til å vere eit resultat av seinare proteintilvekst. Derimot vitna analyseresultata om at endringane i mineralinnhaldet var ein konsekvens av at mineralvekt-auken ikkje sank like mykje som i dei andre hurtigveksande gruppene frå ferskvassperioden.

Eit aspekt som har vist seg å kunne påverke mineralinnhaldet i skjelettet til atlantehavslaks er vaksinering. I fleire forsøk har ein sett at mineralinnhaldet i virvlane er høgare hjå vaksinert fisk enn uvaksinert (Berg et al., 2006 b). Berg et al. (2006 a) fann at parr som vart vaksinert tidleg i ferskvassperioden, og hadde høgare vasstemperaturar etter vaksineringa og mindre storleik, utvikla meir biverknadar og fekk høgare kondisjonsfaktor enn parr som vart vaksinert seinare. Det er dermed mogleg at vaksineringa i kombinasjon med den høge vasstemperatur i 16-16 temperaturgruppa kan ha ført til høgare mineralinnhald i denne gruppa. Korleis vaksinering påverkar virvelvekst og virvelstruktur er ikkje kjent. Berg et al. (2006 b) foreslo at det t.d. kunne vere gjennom påverknad av metabolismen eller gjennom hormonell regulering. På kva måte veksten i saltvassperioden påverka mineraliseringa av virvlane er òg uvisst, då det var svært små forskjellar i veksthastigheita mellom dei ulike gruppene i denne perioden. I den overståande diskusjonen vart det difor tatt utgangspunkt i veksten i ferskvassperioden. Like fullt var det ein tendens til at gruppene som hadde utvikla lågast mineralinnhald seks veker etter sjøvassoverføring hadde størst lengdevekst i saltvassperioden. Tidlegare er det blitt vist at postsmolt oppdretta ved kontinuerleg lys vaks fortare og utvikla lågare mineralinnhald i ryggvirvlar enn postsmolt oppdretta ved naturleg lys (Fjelldal et al., 2005).

Sjølv om det vart funne signifikante forskjellar i det totale mineralinnhaldet i virvlar mellom behandlingane, vart det ikkje funne nokon signifikant forskjell i det prosentvise kalsiuminnhaldet (% av mineralvekt), det prosentvise fosforinnhaldet, eller det molare Ca/P-forholdet i virvlane. Dette betyr at vekst, vaksinering og vasstemperaturar ikkje påverka mineralbalansen i virvlane i signifikant grad i løpet av forsøksperioden. Fleire fôrforsøk har gitt resultat som indikerer at mangel på kalsium kan redusere avsetning av fosfor i bein og vise versa. I forsøk med atlantehavslaks i ferskvassperioden fann Helland et al. (2005) at lågare fosforinnhald i fôr over 30 døger berre redusert det molare Ca/P-forholdet med 0,01 hjå små parr, høvesvis 1,27 for fisken som fekk fosforredusert

fôr og 1,28 for fiskane som fekk fôr med høgt fosforinnhald. Fjellidal et al. (2008) fann ingen signifikant forskjell i det molare Ca/P-forholdet, som var rundt 1,40, hjå atlantehavslaks fôra med normalt fôr og fôr med høgt mineralinnhald i den tidlege sjøvassfasen. Nokre forsøk har likevel gitt resultat som indikerer at kalsium kan stå for ein større del av mineralinnhaldet i virvlane i tilfeller med svært redusert innhald av fosfor i dietten. Bæverfjord et al. (1998) fann eit molart Ca/P forhold på 1,41 hjå atlantehavslaks fôra med svært fosforredusert fôr over 15 veker i sjøvattn og 1,36 hjå laks fôra med normalt fôr. Det gjennomsnittlege molare Ca/P-forholdet i dette forsøket var 1,46 (SD ± 0,09), og endra seg ikkje over forsøksperioden. Dette forholdet stemmer godt overeins med det forholdet Fjellidal et al. (2008) fann i den tidlege sjøvassfasen og det Bæverfjord et al. (1998) fekk hjå sine postsmolt fôra med normal fosformengde, men var mykje høgare enn kva Helland et al. (2005) fann hjå sine parr. Ikkje desto mindre er det funne aldersrelaterte forskjellar i Ca/P-forholdet (Graff et al., 2002). Graff et al. (2002) fann eit molart Ca/P-forhold på ca 1,25 i ferskvattn og ca 1,79 i tidleg sjøvassfase. Fjellidal et al. (2008) fann molare Ca/P-forhold på 1,40 i tidleg sjøvassfase, medan Fjellidal et al. (2004) fann molare Ca/P-forhold på 1,75 hos 3 år gamal laks.

Det er ein utbreidd oppfatting om at mineralkrystalla i bein består av ein urein og komplisert form for hydroksoapatitt (Hamada et al., 1995, Mkukuma et al., 2004). Ved oppvarming til svært høg temperatur, vil mineralkrystalla bli brote ned til ulike mengder hydroksoapatitt ($\text{Ca}^{2+}_{10}(\text{PO}_4^{3-})_6(\text{OH})_2$) og β -trikalsiumfosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) etter kor kalsiumrikt vevet er. Det molare Ca/P-forholdet til β -trikalsiumfosfat, som er assosiert med kalsiumfattig bein, er 1,50. Hydroksoapatitt, som derimot er knytt til kalsiumrikt bein, har eit Ca/P-forhold på 1,67. I havbrasme, hestemakrell, karpesisk og hai er det funne molare kalsium/fosfor-forhold som stemmer overeins med hydroksoapatitt, medan i ein del andre fiskeartar, som t.d. sardin, makrell, ål og flyndre, er det blitt funne kalsium/fosfor-forholdet som samsvarar med ei blanding av hydroksoapatitt og β -trikalsiumfosfat (Hamada et al 1995). Dei molare Ca/P-forholda i dette forsøket ligg nært opp til forholdet til β -trikalsiumfosfat, og indikerer dermed at virvlane var kalsiumfattige.

Samstundes med at mineralinnhaldet i virvlane sank frå seks veker før sjøvassoverføring til seks veker etter sjøvassoverføring, var det ein kraftig reduksjon i serumkonsentrasjonen av fosfat frå seks veker før sjøvassoverføring til tre veker etter sjøvassoverføring. Nokre av temperaturregima (16-10 og 16-16) hadde omtrent ein halvering i serumkonsentrasjonane av fosfat. Fleire diettforsøk har vist at plasmakonsentrasjonar av kalsium og fosfat er eit godt mål på mineralstatusen til individet, og reflekterer variasjonar i mineralkonsentrasjonar i dietten (Vielma & Lall, 1998, Roy & Lall, 2003, Fjellidal et al., 2008). Mot sjøvassoverføring kunne ein sjå ein todeling i serumkonsentrasjonane av

fosfat, der det var eit tildriv til at fisk haldt ved 16 °C i ferskvassperioden hadde lågare konsentrasjon enn fisk haldt ved 10 °C. Denne tendensen kunne ein òg sjå i svakare grad tre veker før sjøvassoverføring og tre veker etter sjøvassoverføring. Medan den kraftige nedgangen i fosfatkonsentrasjonen i serum fram mot tre veker etter sjøvassoverføring gjenspeglar reduksjonen i mineralinnhaldet i virvlane og tydar på at fosfortilgangen frå dietten ved smoltifisering og dei tre første vekene etter sjøvassoverføring var for låg hjå alle temperaturregima, indikerer todelinga mellom temperaturregima at hurtig vekst forverra mineralstatusen. Mineralmengda i fôret som trengs for maksimal vekst har vist seg å vere lågare enn den mengda som trengs for maksimal mineralisering av skjelettet (Bæverfjord et al., 1998). Fjellidal et al. (2008) fann at å tilføre ekstra fosfor i fôret i den tidlege sjøvassvasen forbetra virvelmineralinnhaldet kraftig hjå haustsmolt. Det er òg funne signifikante forskjellar i mineralinnhaldet i virvlar hjå smolt fôra med ulike mengder fosfor i ferskvassfasen (Vielma & Lall, 1998). Frå tre veker etter sjøvassoverføring til seks veker etter sjøvassoverføring steig fosfatkonsentrasjonen i serum igjen hjå nesten alle temperaturregima. Det er dermed mogleg at mineralinnhaldet i virvlane ville syna ein auke dersom ein hadde tatt nye prøvar eit par veker seinare. Det er òg mogleg at auken i fosfatkonsentrasjonen mellom tre og seks veker etter sjøvassoverføring ikkje gjenspeglar auka opptak frå dietten, men igangsetjing av homeostatiske mekanismar som t.d. auka beinremodellering. Bæverfjord et al. (1998) fann resultat som indikerte at atlantehavslaksen har homeostatiske mekanismar for fosforregulering, og at mineralisering av skjelettet vart ofra for andre viktige metabolske roller. Studium av mineralisert og umineralisert bein, og mengd av osteoblastar og osteoklastar har tyda på at fosformangel hjå hyse (*Melanogrammus aeglefinus* L.) fører til ein auke i beinreabsorpsjon (Roy et al., 2002). Fjellidal et al. (2006) fann høgare fosfatkonsentrasjonar i plasma hjå haustsmolt enn hjå vårsmolt, noko som enten kan indikere at det var den hurtige veksten og ikkje tilgangen på fosfor frå dietten som førte til dårleg virvelmineralinnhald hjå haustsmolt, eller at haustsmolten hadde auka beinremodellering. I motsetning til fosfatkonsentrasjonane i serum, syna ikkje kalsiumkonsentrasjonane nokon spesiell reduksjon over tid, men varierte heller frå prøveuttak til prøveuttak. Tre veker før sjøvassoverføring hadde likevel fisk som vart haldt på 16 °C, og hadde hurtigast vekst, signifikant lågare kalsiumkonsentrasjon enn fisk haldt ved 10 °C. Dette kan tyde på at kalsium kan ha vore ein avgrensande faktor i mineraliseringa av virvlar i ferskvassperioden, då kalsiumkonsentrasjonen i vatnet er låg. Vielma og Lall (1998) fann at ekstra kalsium i fôret til smoltifiserande atlantehavslaks i ferskvatn auka mineralinnhaldet i skjell og ryggvirvlar når tilgangen på fosfor var låg. Sidan ingen andre hadde funne denne effekten av kalsium i tidlegare forsøk, vart det foreslått at atlantehavslaksen kunne ha spesielle kalsiumbehov under smoltifiseringa. Ved dei andre uttaka var det ingen klar samanheng mellom kalsiumkonsentrasjonen og behandlinga fiskane hadde fått, noko som saman med dei varierende nivåa av kalsium frå prøveuttak til prøveuttak tyder på liten tilgang

på fosfor var eit større problem enn mangel på kalsium. Dette stemmer òg overeins med at laks kan ta opp kalsium både gjennom fôret og direkte frå vatnet, medan fosfor hovudsakleg må takast opp gjennom fôret (Lall & Lewis-McCrea, 2007).

4.2.3 Store intervertebralrom og små lengd/diameterforhold i virvlane korrelerte med dårleg mineraliserte virvlar

Ved røntgenundersøking av fisk i dette forsøket vart det observert overraskande store intervertebralrom (som % lengd av total ryggstøylelengd). Seks veker før sjøvassoverføringa såg intervertebralromma stort sett normale ut. Utover i forsøket vart derimot intervertebralromma større og større, og seks veker etter sjøvassoverføring var intervertebralromma somme plassar like store eller større enn dei tilstøytande ryggvirvlane. Storleiken på intervertebralromma auka mest i fremre haleregion, og det var òg i denne regionen at forskjellane i intervertebralromma var tydelegast. Ved sjøvassoverføring hadde laks oppdretta ved 16 °C i ferskvatn utvikla større intervertebralrom enn laks oppdretta ved 10 °C, medan seks veker etter sjøvassoverføring var det tendensar til at laks oppdretta ved 16 °C i ferskvassfasen, og i mindre grad laks oppdretta ved 16 °C i den tidlege sjøvassfasen hadde større intervertebralrom enn laks oppdretta ved 10 °C i heile karperioden. I tillegg var det tendensar til at uvaksinert fisk hadde større intervertebralrom enn vaksinert fisk. Både ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring var det òg ganske tydelege tendensar til at storleiken på intervertebralromma varierte med mineralinnhaldet i virvlane, slik at dei med lågast mineralinnhald hadde størst intervertebralrom. Pearsons korrelasjon syna at høvesvis 40 og 63 % av variasjonen i intervertebralromma kunne forklarast ved variasjon i mineralinnhald ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Som diskutert i metodediskusjonen, er det er dermed mogleg at dei store intervertebralromma eigentleg var umineralisert osteoid, noko som ikkje ville synast som bein på røntgenbileta. Dei store intervertebralromma kan òg moglegvis vere eit resultat av inflammasjon i intervertebralvevet. Kvellestad et al. (2000) fann inflammatoriske celler i intervertebralrommet rundt mange forkorta virvlar. På grunnlag av dette, og at kompresjonsendingane ofte er lokalisert på motståande endeplater, foreslo dei at forkorting av ryggstøyle hjå atlantehavslaks starta med ein inflammasjon i intervertebralvevet. Sullivan et al. (2007 a) fann òg forstørtra intervertebralrom hjå både parr og postsmolt. Dette vart derimot berre observert i naboposisjonar til deformerte virvlar, og var ikkje eit jamt fordelt femomen som i det gjeldande forsøket. Alternativt kan dei store intervertebralromma moglegvis vere ein kompensasjon for dårleg mekanisk styrke i virvlane. Tidlegare er det funne signifikant korrelasjon mellom mineralinnhald i virvlar og mekanisk styrke i virvlane (Fjellidal et al., 2006). Intervertebralvevet fungerer som støytputer mellom virvlane (Kryvi & Totland, 1997) og det er mogleg at dette vevet veks for å hindre skader på dårleg mineraliserte virvlar. 42 veker etter

sjøvassoverføring vart det ikkje målt mineralinnhald i virvlane, men det var tendensar til at fisk oppdretta ved 16 °C enten i ferskvassfasen eller den tidlege sjøvassfasen hadde større intervertebralrom enn laks oppdretta ved 10 °C. Ut frå dette kan ein spekulere i om individ oppdretta ved 10 °C i heile karperioden var betre rusta til å få opp mineralinnhaldet i virvlane igjen over tid, eller om kanskje høg temperatur induserte inflammasjonar som gav vedvarande endringar i intervertebralvevet.

Ved sjøvassoverføring var det ein tendens til at fisk oppdretta ved 16 °C i ferskvatn hadde utvikla lågare lengd/diameterforhold i virvlane enn fisk oppdretta ved 10 °C, spesielt i fremre og bakre haleregion. Dette samsvarar med at desse fiskane hadde hatt hurtigast vekst, og at fremre og bakre haleregion har syna hurtigast vekst ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase (Fjelldal et al., 2006). Lengd/diameterforholda samsvarte òg med at fisk som vart oppdretta ved 16 °C og hadde minst lengd/diameterforhold i virvlane, hadde minst mineralinnhald og størst mellomrom mellom virvlane. Dette kan som diskutert i metodediskusjonen moglegvis vere eit resultat av meir umineralisert osteoid hjå desse individa, slik at virvellengda såg mindre ut enn kva den faktisk var. Seks veker etter sjøvassoverføring hadde vaksinasjon gitt svært liten effekt på lengd/diameterforholdet, men det var tendensar til at spesielt uvaksinert fisk oppdretta ved 10 °C i heile karperioden hadde høgare lengd/diameterforhold enn fisk oppdretta ved 16 °C enten i ferskvassfasen eller i tidleg sjøvassfase. Sjølv om dette (10-10U) var fiskane som hadde minst intervertebralrom ved dette tidspunktet, var det ikkje noko tydeleg samsvar mellom lengd/diameterresultata og intervertebralromresultata hjå resten av temperaturregima. Både ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring vart det funne signifikante korrelasjonar mellom mineralinnhaldet i virvlane og lengd/diameterforholdet, men korrelasjonen var tydeligast ved sjøvassoverføring. Signifikant korrelasjon mellom mineralinnhald og lengd/diameterforhold i virvlar har jamvel blitt syna hjå haustsmolt oppdretta under like miljøforhold (Fjelldal et al., 2007 b). Fjelldal et al. (2008) fann låge lengd/diameterforhold i virvlar ved eit tidspunkt med lågt mineralinnhald i virvlane, som normaliserte seg i somme regionar av virvelsøyla når mineralinnhaldet forbetra seg. Ut frå dette vart det foreslått at dei låge lengd/diameterforholda var ein normal kompensasjon som stabiliserte virvlane og hindra framtidig kompresjonsdanning ved tilhøve med lågt mineralinnhald. Kvifor lengd/diameterforholdet korrelerte mindre med mineralinnhaldet seks veker før sjøvassoverføring enn ved sjøvassoverføring er uvisst. Det er mogleg at den svake tendensen til at både fisk oppdretta ved 16 °C i ferskvassperioden og/eller i den tidlege saltvassperioden hadde lågare lengd/diameterforhold i dei fremre halevirvlane enn fisk som vart haldt på 10 °C heile tida, gjenspegla både kompensasjon for dårleg mineralinnhald i virvlar oppdretta ved 16 °C i ferskvatn, og byrjande kompresjonsdanning hjå fisk oppdretta ved 16 °C i den tidlege sjøvassperioden. Tildrivet til at fisk oppdretta ved 10 °C i heile karperioden hadde høgare

lengd/diameterforhold enn fisk frå dei andre temperaturregima, kom tydeleg fram 42 veker etter sjøvassoverføring. Ved dette tidspunktet vart lengd/diameterforholdet berre målt frå virvel nr 40-43, men fisk oppdretta ved 16 °C i enten ferskvassfasen eller den tidlege sjøvassfasen hadde signifikant lågare lengd/diameterforhold (og tildriv til større intervertebralrom) enn fisk frå 10-10 temperaturregimet. Dette styrkar forslaget om at fisk oppdretta ved 10 °C klarte å forbetre mineralinnhaldet i virvlane betre enn dei andre temperaturregima etter at dei vart overført til merd.

4.2.4 Temperaturregime var viktigare enn vaksinasjon på deformasjonsdanninga i virvlar

I dette forsøket vart det funne kompresjonar, dislokasjonar og kombinasjonar av ankyloser og kompresjonar.

Innslaget av radiologisk sett deformert fisk, som var høvesvis 23,0 % seks veker før sjøvassoverføring, 16,8 % ved sjøvassoverføring og 20,7 % seks veker etter sjøvassoverføring, auka ikkje frå forsøksstart til seks veker etter sjøvassoverføring. Det var heller ingen signifikante forskjellar mellom vaksinert og uvaksinert fisk, og mellom temperaturregima. Dette kan tyde på at deformasjonane som vart observert seks veker etter sjøvassoverføringa hadde oppstått før forsøksstart. Fjellidal et al. (2008) fann ein prevalens av deformert fisk på 15,6 % ved sjøvassoverføring og ca 24 % åtte veker etter sjøvassoverføring. I eit forsøk der innslaget av deformerte virvlar vart notert i staden for innslaget av deformert fisk, vart det funne ein prevalens på 1,5 % deformerte virvlar ved sjøvassoverføring og 2,5 % tolv veker etter sjøvassoverføring (Fjellidal et al., 2006). I dette forsøket var frekvensen av deformerte virvlar høvesvis 0,90 %, 0,76 % og 0,98 % ved forsøksstart, sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring. Deformasjonsinnslaga stemmer dermed godt med tidlegare funn hjå haustsmolt. I forhold til kva ein finn hjå laks oppdretta som vårsolt, er innslaget derimot høgt. I parrstadiet er det funne ein prevalens av deformert fisk på 7 % i forsøk der virvlane vart analysert etter same kriterium som i dette forsøket (Fjellidal et al., 2007 a), og mellom 3,8 - 8,8 % (Sullivan et al., 2007 a) og 6 - 20 % (Sullivan et al., 2007 b) i studium som har inkludert demineraliserte og hypermineraliserte virvlar som deformerte.

Fleire tidlegare forsøk har vist at deformerte virvlar ofte vert meir deformerte over tid (Witten et al., 2006, Fjellidal et al., 2007 a). I eit forsøk med individmerka atlantehavslaks vart det funne at komprimerte virvlar enten vart meir komprimerte over tid eller utvikla seg til ankyloser (Fjellidal et al., 2007 a). Ved sjøvassoverføring og seks veker etter sjøvassoverføring var ein del av deformasjonane ankyloser, medan alle deformasjonane var kompresjonar ved forsøksstart. Det er difor rimeleg å anta at ein del av kompresjonane ved forsøksstart utvikla seg til ankyloser over tid.

Mellom seks og 42 veker etter sjøvassoverføring var det ein kraftig auke i innslaget av deformerte virvlar. Likevel var det ingen utvikling i forholdet mellom kompresjonar og ankyloser, som utgjorde ca høvesvis 80 % og 20 % av dei deformerte virvlane ved begge uttaka. At ikkje ein større del av deformasjonane var ankyloser 42 veker etter sjøvassoverføring kan moglegvis tyde på at kompresjonsdanningane utvikla seg over lang tid etter overføring til merd. Nokre forsøk har like fullt gitt resultat som indikerer at kompresjonar ikkje nødvendigvis vil forverre seg til ankyloser over tid. Fjelldal et al. (2008) fann ein kraftig auke i innslag av kompresjonar i fremre haleregion utan nokon utvikling i innslaget av ankyloser frå sjøvassoverføring til 57 veker etter sjøvassoverføring. Witten et al. (2006) fann at to samanvaksne virvlar kunne remodelerast til ein strukturelt sett normal virvel med to hemal- og neuralboger.

Ved sluttuttaket (42 veker etter sjøvassoverføring) hadde fisk som vart haldt på 16 °C i tidleg sjøvassperiode signifikant høgare innslag av fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar, noko som igjen gjenspeglar signifikant høgare innslag av deformert fisk basert på røntgenundersøking, og høgare innslag av deformerte virvlar per deformert individ, enn dei som vart haldt på 10 °C i denne perioden. Bortsett frå at vaksinert fisk i 16-10 temperaturregimet hadde fleire deformerte virvlar hjå dei deformerte individa enn uvaksinert fisk, var det ingen forskjellar i deformasjonsinnslaga mellom vaksinert og uvaksinert fisk sjølv om intra-peritoneal vaksinerings med olje-adjuvant vaksine tidlegare er blitt identifisert som ein risikofaktor i utvikling av deformasjonar (Berg et al., 2006 a). Innslaget av fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar var høvesvis gjennomsnittleg 20,3 % hjå fisk oppdretta ved 16 °C i tidleg saltvassperiode og 3,2 % hjå fisk oppdretta ved 10 °C. I kommersiell oppdrett varierer innslaget av deformert fisk frå år til år, og frå anlegg til anlegg (Witten et al., 2005). I oppdrettsanlegg frå Hardanger til Helgeland gav t.d. 2000-årsklassen med atlantehavslaks ein nedklasseringsrate grunna ytre teikn på ryggdeformasjonar på 7,5 % ved slakt (Djuvpik, 2005). I 2002 hadde derimot eit anlegg i Rogaland ein nedklassing på 35 % (Witten et al., 2005). Gjerde et al. (2005) fann ytre teikn på deformasjonar hjå mellom 2,3 og 20,8 % hjå slakteferdig laks oppdretta som vårsmolt ved fem kommersielle oppdrettsanlegg, og Fjelldal et al. (2007 a) fann ein prevalens på 1,3 % 10 månader etter sjøvassoverføring hjå laks oppdretta ved som vårsmolt ved Matre Forskingsstasjon. Ut frå dette må innslaget av fisk med ytre teikn på deformasjonar vurderast som høgt hjå fisk som vart haldt på 16 °C i den tidlege sjøvassfasen, og moderat hjå dei som vart haldt på 10 °C den tidlege sjøvassfasen. Resultata frå dei radiologiske undersøkingane syna i tillegg at òg høg ferskvasstemperatur hadde hatt ein effekt på deformasjonsinnslaget, slik at det var signifikant høgare innslag av uvaksinert fisk med deformerte virvlar i 16-10 temperaturregimet enn i 10-10 temperaturregimet, og ikkje-signifikante tendensar til det same hjå vaksinert fisk. Medan fisk oppdretta ved 10 °C under heile karperioden hadde eit gjennomsnittleg innslag av deformert fisk på

36,0 %, hadde fisk oppdretta ved 16 °C i ferskvassfasen og 10 °C i den tidlege saltvassfasen eit innslag på 62,0 % og fisk oppdretta ved 16 °C i tidleg sjøvassfase eit innslag på 90,9 %. 57 veker etter sjøvassoverføring fann Fjelldal et al. (2008) prevalensar av deformerte individ på 36 og 73 % hjå haustsmolt fôra med ulike fôr. Studium av atlantehavslaks oppdretta som vårsmolt har syna prevalensar av individ med virveldeformasjonar på mellom 12 % (Witten et al., 2006, Fjelldal et al., 2007 a) og 32 % (Witten et al., 2006), 12 månader etter sjøvassoverføring. McCrimmon & Bidgood (1965) rapporterte ein prevalens på mellom 4,8 og 12,2 % hjå villfanga vaksen regnbogeaure (*Salmo gairdneri*). Mellom 2,8 og 3,3 % har blitt observert hjå ulike artar stillehavslaks (*Oncorhynchus nerka*, *O. gorvuschka* og *O. keta*) (Gill & Fisk, 1966), men ingen virveldeformasjonar er funne hjå villfanga atlantehavslaks (Fjelldal et al., 2006). Innslaget av radiologisk sett deformerte individ må difor vurderast som høgt i alle temperaturregima, og svært høgt hjå fisk oppdretta ved 16 °C i den tidlege sjøvassfasen. Fjelldal et al. (2006) foreslo at den høge frekvensen av virveldeformasjonar hjå haustsmolt kunne vere relatert til lågt mineralinnhald i virvlane, noko som igjen kunne vere påverka av veksthastigheit. Fosformangel har syna å kunne føre til virveldeformasjonar både hjå atlantehavslaks (Vielma & Lall, 1998, Bæverfjord et al., 1998), og andre fiskeartar som t.d. hyse (*Melanogrammus aeglefinus* L.) (Roy et al., 2002, Roy & Lall, 2003) og grouper (*Epinephelus coioides*) (Ye et al., 2006). Det har blitt foreslått at lågt mineralinnhald kan påverka danninga av virveldeformasjonar ved å føre til endringar i vekstmønsteret til virvlane (Fjelldal et al., 2006; 2007 b) eller ved at virvlane vert for svake til å stå imot samanpressing frå muskelrørsler (Fjelldal et al., 2006; 2007 b). Då det var fisk oppdretta ved 16 °C i ferskvassfasen som hadde hurtigast vekst og utvikla det lågaste mineralinnhaldet i virvlane, medan det var fisk oppdretta ved 16 °C i den tidlege sjøvassfasen som utvikla mest deformasjonar, kan ikkje deformasjonsdanninga i dette forsøket direkte knytast mineralinnhaldet. På den andre sida sank mineralinnhaldet drastisk i den tidlege sjøvassfasen, og all fisken hadde lågt mineralinnhald seks veker etter sjøvassoverføring (36 - 43 %). I det tidlegare nemnde diettforsøket til Fjelldal et al. (2008), der haustsmolt vart fôra med anten normalt kommersielt fôr eller fôr tilsett ekstra mineral dei første sytten vekene etter sjøvassoverføring, fann ein at laks som hadde fått fôr med høgt mineralinnhald hadde signifikant lågare innslag deformerte individ ved slakt enn laks fôra med normalt fôr. Forsøket, som òg viste at fisk som fekk normal fôr hadde minst mineralinnhald og mekanisk styrke i virvlane i den tidlege sjøvassfasen, synar at mineralinnhald og virvelstyrke er viktige parameter i forhold til deformasjonsdanning. Resultata frå det gjeldande forsøket tyder likevel på at det må vere ein annan faktor i tillegg til mineralinnhaldet som fører til deformasjonsdanning. Temperaturen i den tidlege sjøvassperioden hadde mykje meir å sei for deformasjonsdanninga enn temperaturen i ferskvassperioden. Tidlegare studium har vist at høg vasstemperatur kan auke innslaget av deformerte virvlar i yngel og parrstadiet (Bæverfjord et al., 2005). Det er mogleg at temperaturen påverkar t.d. proteinsamansetjinga av den organiske

matriksen eller den tredimensjonale arkitekturen til virvelen. Nordvik et al. (2005) syna at proteinmatriksen i det kompakte beinet i virvlane til atlantehavslaksen har ein ordna og spesifikk tredimensjonal proteinstruktur. I så tilfelle kan det vere tenkjeleg at endringa i denne parameteren ikkje ville ført til deformasjonsdanning dersom virvlane hadde hatt 10 – 15 % høgare mineralinnhald, slik at mineralmengda kom opp på nivå med smolten som vart fôra med ekstra mineral i forsøket til Fjelldal et al. (2008). Dersom høg temperatur i tidleg sjøvassfase påverkar integriteten til t.d. proteinstrukturen kan dette moglegvis i kombinasjon med lågt mineralinnhald gje mjuke og svake virvlar som ikkje klarar å motstå presset frå muskulaturen. Korleis det enn har seg er det tydeleg at det trengs meir forskning på kva denne/desse faktoren/faktorane kan vere.

4.2.5 Samanfatta diskusjon

Korleis temperatur og vaksine påverka somatisk vekst

Fleire tidlegare studium har syna at høge vasstemperaturar aukar veksten til atlantehavslaks både i ferskvassfasen (Johnston & Saunders, 1981, Austreng et al., 1987, Dwyer & Piper, 1987) og sjøvassfasen (Austreng et al., 1987, Handeland et al., 2000, Handeland et al., 2008). I dette forsøket påverka temperaturane veksten i ferskvassfasen, men ikkje i den tidlege sjøvassfasen. Dette kan moglegvis vere fordi effekten av kontinuerleg lys overstyrte effekten av temperaturar, eller fordi 16 °C var over den optimale temperaturen for vekst i den tidlege sjøvassfasen. Vaksine gav redusert vekst i ferskvassfasen, men ikkje i sjøvassfasen. Dette stemmer overeins med at atlantehavslaks kan få redusert appetitt den første perioden etter vaksininga (Sørum & Damsgård, 2004).

Korleis temperatur og vaksine påverka mineralbalansen og virvelmineraliseringa

Medan vaksining berre påverka mineralstatusen til individa i mindre grad, førte hurtig vekst og høg vasstemperatur i ferskvassfasen til låg fosfatkonsentrasjon i serum og dårleg mineralisering av virvlane. Fosfatkonsentrasjonen i serum sank drastisk i alle temperaturregima frå forsøksstart til tre veker etter sjøvassoverføring, noko som kan tyde på at fosfortilgangen frå dietten var for låg for smoltifiserande laks. Mineralinnhaldet i virvlane sank spesielt mykje i den tidlege sjøvassfasen, men det såg ikkje ut til at vasstemperaturane i denne perioden påverka mineraliseringa. I denne perioden var det heller ingen forskjell i veksthastigheita mellom temperaturregima. Ut frå dette kan ein konkludere med at høg temperatur og hurtig vekst under smoltifisering fører til dårleg mineralstatus hjå laks. Resultata frå mineralinnhaldet i virvlane stemmer overeins med hypotesen til Fjelldal et al.

(2006) om at hurtig vekst kan påvirke mineraliseringa av bein ved at tidsforskyvinga mellom proteinavsetjing og mineralisering i virvlar aukar.

Korleis temperatur og vaksine påverka virvelmorfologi og vekstmønsteret til virvelsøyla

Under smoltifiseringa og den tidlege sjøvassfasen såg temperatur, og i mindre grad vaksinerer, ut til å påvirke virvelmorfologien gjennom mineralinnhaldet. Det var signifikant korrelasjon mellom mineralinnhald og lengd/diameterforhold i virvlane, slik at individ med lågt mineralinnhald hadde låg lengd/diameterforhold i virvlane. Dette kan moglegvis vere ein kompensasjon som stabiliserer virvlane og hindrar kompresjonsdanning hjå virvlar med lågt mineralinnhald (e.g. Fjelldal et al., 2008). Alternativt kan det gjenspegle umineralisert osteoid hjå virvlar med lågt mineralinnhald, noko som ikkje vil vere synleg på røntgenbileta. Dette kan i så fall òg forklare samanhengen mellom mineralinnhald og storleiken på intervertebralromma. Lågt mineralinnhald korrelerte med store intervertebralrom. Alternativt kan dei store intervertebralromma moglegvis vere forårsaka av inflammasjonar, eller vere motytingar som skal hindre skade på virvlar med lågt mineralinnhald. Ved slakt hadde fisk oppdretta ved 10 °C både i ferskvassperioden og den tidlege sjøvassperioden signifikant høgare lengd/diameterforhold i virvlane enn fisk oppdretta ved dei andre regima. Uvaksinert fisk frå dette regimet hadde òg signifikant større intervertebralrom enn uvaksinert fisk frå dei andre regima, og det var ikkje-signifikante tendensar til det same hjå vaksinert fisk. Dette kan moglegvis tyde på at individ frå 10-10 regimet var betre rusta til å få opp mineralinnhaldet i virvlane igjen enn fisk oppdretta ved dei andre regima. I alle høver synar resultata frå slakt at både temperaturen ferskvassperioden og den tidlege sjøvassperioden påverkar morfologien til virvelsøyla, medan vaksine hadde lite å sei.

Korleis temperatur og vaksine påverka innslaget av virveldeformasjonar

Temperatur hadde ein mykje større effekt på deformasjonsdanninga i virvlar enn vaksinasjon, og det var spesielt temperaturen i den tidlege sjøvassfasen som var avgjerande. Individ oppdretta ved høg temperatur i den tidlege sjøvassfasen utvikla signifikant høgare innslag av deformerte virvlar enn individ oppdretta ved 10 °C i denne perioden. Då det hovudsakleg var temperaturane i ferskvassperioden som påverka veksten og mineraliseringa av virvlane, kan ikkje deformasjonsdanninga forklarast ved hurtig vekst og dårleg mineralinnhald i virvlane. Mineralinnhaldet i virvlane kan likevel ikkje utelukkast som ein faktor i deformasjonsdanninga, då all fisken utvikla svært lågt

mineralinnhald i løpet av den tidlege sjøvassperioden. Resultata tyder i alle høve på at temperaturen i den tidlege sjøvassfasen påverkar ein annan faktor i beinet som fører til deformasjonsdanning.

5. Referanseliste

Austreng, E., Storebakken, T. & Åsgård, T. 1987. Growth Rate Estimates for Cultured Atlantic Salmon and Rainbow Trout. *Aquaculture* 60: 157 – 160.

Bagenal, T. B. & Tesch, F. W. 1978. Age and growth. I: Bagenal, T. B. (Eds) *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 101 – 136.

Berg, A., Bergh, Ø., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Juell, J. E. & Nerland, A. 2006 b. Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk – effekter og bivirkninger. *Fisken og havet* 9: 21 – 26.

Berg, A., Hansen, T. & Stefansson, S. O. 1992. First feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under different photoperiods. *Journal of Applied Ichthyology* 8: 251 - 256.

Berg, A., Rodseth, O.M., Tangeras, A. & Hansen, T. 2006 a. Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms* 69: 239-248

Bæverfjord, G., Helland, S., Lein, I., Epsmark, Å., Refstie, S., Åsgård, T. & Gjerde, B. 2005. Rearing condition and skeletal deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). I *Lessons from the Past to optimize the future*, European Aquaculture Society, Special Publication 35: 121 - 122.

Bæverfjord, G., Åsgård, T. & Shearer, K. D. 1998. Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and post smolt. *Aquaculture Nutrition* 1998: 1 - 11.

Biltz, R. M., Pellegrino, E. D., & Letteri, J. M. 1981. Skeletal Carbonates and Acid-Base Regulation. *Mineral Electrolyte Metab.* 5: 1 – 7.

Bjørnsson, B. T., Hemre, G. I., Bjørnevik, M. & Hansen, T. 2000. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during induced smoltification of underyearling Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 119: 17 – 25.

Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. I: Hoar, W.S., D.J. Randall, Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. 8. Academic Press, London: 599–675.

Campbell, N. A. 1993. *Water and the Fitness of the Environment*. I: Biology, third edition (Eds), The Benjamin/Cummings Publishing Company Incorporated, Redwood City, California: 40 – 61.

Casadevall, M., Casinos, A., Viladiu, C. & Ontanon, M. 1990. Scaling of skeletal mass and mineral-content in teleost. *Zoologischer anzeiger*, 225: 144 – 150.

- Chappard, D., Pascaretti-Grizon, F., Gallois Y., Mercier, P., Baslé, M. F., & Audran, M. 2006. Medullar fat influences texture analysis of trabecular microarchitecture on X-ray radiographs. *European Journal of Radiology*, 58: 404 -410.
- Clifton K. B., Yan J., Mecholsky J.J. Jr. & Reep R. L. 2008. Material properties of manatee rib bone. *Journal of Zoology* 274: 150–159
- Davis, J. C., 1975. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life, with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 32: 2295 – 2332.
- Dupvik, H. O. 2005. Field experiences from the industry. I: Waagbø, R., Kryvi, H., Breck, O., Ørnsrud, R. (Eds.), Final Report Workshop on Bone Disorders in Intensive Aquaculture of Salmon and Cod, NFR Report Number 164773: 11 - 11.
- Duston, J. & Sanders, R. L. 1990. The entrainment role of photoperiod on hypoosmoregulatory and growth related aspects of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Zool.* 68: 707 – 715.
- Dwyer, W. P., & Piper, R. G. 1987. Atlantic salmon growth efficiency as affected by temperature. *The Progressive fish-culturist* 49: 57 – 59.
- Døving, K. 1992. Laksevandring. I Døving, K. og Reimers, E. *Fiskens fysiologi*, John Grieg forlag, 317 – 325.
- Fjelldal, P.G., Grotmol, S., Kryvi, H., Gjerdet, N. R., Taranger, G. L., Hansen, T., Porter, M. J. & Totland, G. K. 2004. Pinealectomy induces malformation of the spine and reduces mechanical strength of the vertebrae in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Pinal Research* 36: 132 – 139.
- Fjelldal , P. G., Hansen, T. J. & Berg, A. 2007 a. A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture* 273: 721-728.
- Fjelldal, P. G., Hansen, T. J., Breck, O., Sandvik, R., Waagbø, R., Berg, A., & Ørnsrud, R 2008. Supplementation of dietary minerals during the early seawater phase increase vertebral strength and reduce the prevalence of vertebral deformities in fast growing under yearling Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. Akseptert for utgjeving i *Aquaculture Nutrition*.
- Fjelldal, P. G., Lock, E., Grotmol, S., Totland, G. K., Nordgarden, U., Flik, Gert., &Hansen, T., 2006. Impact of smolt production strategy on vertebral growth and mineralisation during smoltification and early seawater phase in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Aquaculture* 261: 715 – 728.
- Fjelldal, P. G., Nordgarden, U., Berg, A., Grotmol, S., Totland, G. K., Wargelius, A. & Hansen, T. 2005. Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolt. *Aquaculture* 250: 516 – 524.

- Fjelldal, P. G., Nordgarden, U. & Hansen, T. 2007 b. The mineral content affects vertebral morphology in under yearling smolt of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 270: 231 – 239.
- Folmar, L. C. & Dickhoff, W. W. 1980. The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaption in salmoids – a review of selected literature. *Aquaculture* 21: 1-37.
- FoMAS. 2006. Helseattest og Produktinformasjon for rognparti. Fiskehelse og Miljø AS, avdeling Tysnes.
- Forsberg, O. I. 1995. Empirical investigations on growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in land-based farms. Evidence of a photoperiodic influence. *Aquaculture* 133: 235 – 248.
- Gill, C. D. & Fisk, D. M. 1966. Vertebral abnormalities in sockeye, pink and chum salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 95: 105 – 147.
- Gil Martens, M., Witten, P. E., Fivestad, S., Huisseune, 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: 81-88.
- Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research* 31, 25–33.
- Gjerde, B., Pante, M. J. R. & Bæverfjord, G. 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 244: 177 – 182.
- Graff I. E., Waagbø, R., Fivelstad, S., Vermeer, C., Lie, O. & Lundebye A.K. 2002. A multivariate study on the effects of dietary vitamin K, vitamin D-3 and calcium, and dissolved carbon dioxide on growth, bone minerals, vitamin status and health performance in smolting Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Disease* 25: 599 – 614.
- Grisdale-Helland, B. & Helland, S. J. 1997. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage. *Aquaculture* 152: 167-180
- Grotmol, S., Kryvi, H., Nordvik, K. & Totland, G. K. 2003. Notochord segmentation may lay down the pathway for the development of vertebral bodies in Atlantic Salmon. *Anat Embryol* 207: 263 – 272.
- Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai, H. & Saeki, K. 1995. Inorganic Constituents of Bone of fish. *Fisheries Sci* 61: 517 – 520.
- Handeland, S. O., Berge, A., Björnsson, B. Th., Lie, Ø., & Stefansson S. O. 2000. Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture* 181: 377 – 396.

Handeland, S. O., Imsland, A. K., Stefansson, S. O. 2008. The effect of temperature and fish growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolt. Manuskript til evaluering i Aquaculture.

Handeland, S. O., Wilkinson, E., Sveinsbø, B., McCormick, S. D. & Stefansson, S. O. 2004. Temperature influence on development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture* 233: 513 – 529.

Hansen, T., Stefansson, S., Mortensen, A. & Skilbrei, O. 1998 a. Lys. I Hansen, T. oppdrett av laksesmolt, A/S Landbruksforlaget: 114 - 130.

Hansen, T., Stefansson, S. & Mortensen, A. 1998 b. Temperatur. I Hansen, T. oppdrett av laksesmolt, A/S Landbruksforlaget: 131 - 137.

Hansen, T., Taranger, G. L., Mortensen, A. & Stefansson, S. 1998 c. Nye produksjonsstrategier. I Hansen, T. oppdrett av laksesmolt, A/S Landbruksforlaget: 167 – 186.

Hatcher, L. & Stepanski, E. J. 1994. Assumptions Underlying Factorial ANOVA with two between groups factors. I A step by step approach to using the SAS system for univariate and multivariate statistics, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA: 280-281.

Helland, S., Refstie, S., Espmark, Å., Hjelde, K. & Baevefjord, G. 2005. Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. *Aquaculture* 250: 364 – 376.

Hoar, W. S., 1988. The physiology of the smolting salmoids. I: Hoar, W. S., Randall, D. J., (Eds.) *Fish Physiology*, vol. 11B. Academic Press, New York: 275-343.

Houde, E. D., Scheckter, R. C., 1981. Growth rates, rations and cohort consumptions of marine fish larvae in relation to prey concentration. *Rapp. P.-V. Reun. –Cons. Int. Explor. Mer* 178, 441 – 453.

Johansson, D., Juell, J., Oppedal, F., Stiansen, J. & Ruohonen, K. 2007. The influence of the pycocline and cage resistance on current flow, oxygen flux and swimming behavior of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in production cages. *Aquaculture* 265: 271 – 287.

Johnston, C. E. & Sanders, R. L. 1981. Parr-smolt transformasjon of yearling Atlantic salmon (*salmo salar*) at several rearing temperatures. *Canadian Journal of fisheries and aquatic sciens*, 38: 1189 – 1198.

Kacem, A., Gustafsson, S., & Meunier, F. J. 2000. Demineralization of the vertebral skeleton in Atlantic salmon *Salmo Salar* L. during spawning migration. *Comparative Biochemistry and Physiology part A* 125: 479 – 484.

Kacem, A., Meunier, F. j., & Bagliniere, J. L. 1998. A quantitative study of morphological and histological changes in the skeleton of *Salmo salar* during its anadromous migration. *Journal of fish biology* 53: 1096 – 1109.

Kjønhaug, A. F., 2006. Produksjon av laks og regnbueørret 2005. *Kyst og Havbruk* 2006: 114 - 117.

Klemetsen, A., Amundsen, P. A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., & Mortensen, E. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of freshwater fish* 12: 1-59.

Kryvi, H. & Totland, G. K. 1997. Hvirvelsøylen. I *Fiskeanatomi*, høyskoleforlaget AS, 64 – 67.

Kvellestad, A., Høie, S., Thorud, K., Tørud, B. & Lyngøy, A. 2000. Platyspondyly and shortness of vertebral column in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway – description and interpretation of pathogenic changes. *Diseases of aquatic organisms* 39: 97 – 108.

Lall, S. P. & Lewis-McCrea, L. M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish – An overview. *Aquaculture* 267: 3 – 19.

Landis, W. J., Hodgens, K., Song, M. J., Arena, J., Kiyonaga, S., Marko, M., Owen, C. & McEwen, B. F. 1996. Mineralization of Collagen May Occur on Fibril Surfaces: Evidence from Conventional and High-Voltage Electron Microscopy and Three-Dimensional Imaging. *Journal of structural biology* 117: 24 – 35.

Lee, D. D. & Glimcher, M. J. 1989. The three-dimensional spatial relationship between the collagen fibrils and the inorganic calcium-phosphate crystals of pickerel and herring fish bone. *Connective Tissue Research*, 21: 247 – 257.

Lysfjord G., Jobling M. & Solberg C. 2004. Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt production strategy affects body composition and early seawater growth. *Aquaculture* 237: 191-205

Martens L. G., Lock E.-J., Ørnstrud R., Fjelldal P. G., Wargelius A., Araujo P., Torstensen B., Witten P. E., Hansen T. & Waagbø R. 2008. Inflammation as a risk factor for spinal deformities in farmed Atlantic salmon underyearling smolts. Poster ved XIII International symposium on fish nutrition and feeding, 1.-5. juni 2008, Florianopolis, Brasil.

Martens, L. G., 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* 216: 80 – 88

Mattilsynet, 2005. Til § 21 Vannkvalitet i landbaserte akvakulturanlegg. I merknader til forskrift om drift og akvakulturanlegg (mars -05): 24 -25.

McCrimmon, H. R. & Bidgood, B. 1965. Abnormal vertebrae in the rainbow trout with particular reference to electrofishing. *Transactions of the American Fisheries Society* 94: 84 – 88.

McKay, L. R. & Gjerde, B. 1986. Genetic variation for a spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 52: 263 – 272.

Metcalfe, N. B. & Thorpe, J. E. 1990. Determinants of geographical variation in the age of seaward-migrating salmon, *Salmo salar*. *Journal of Animal Ecology* 59: 135 – 145.

Meunier, F. J. 2002. Skeleton. I: Panfili, J., de Pontual, H., Troadec, H., Wright, P. J. (Eds.), *Manual of Fish Sclerochronology*. Ifremer-IRD co edition, Brest : 65-87

Midtlyng, P. J. 1996 a. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 553 – 565.

Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., Lillehaug, A., & Ramstad, A. 1996 b. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 599 – 613.

Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. 1996 c. Experimental studies on the efficiency and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 335 – 350.

Mkukuma, L. D, Skakle, J. M. S., Gibson, I. R., Imrie, C. T., Aspden, R. M. & Hukins, D. W. L. 2004. : Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral: An investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-temperature X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy. *Calcified Tissue international* 75: 321 – 328.

Nordgarden, U., Oppedal, F., Taranger, G. L., Hemre, G. I. & Hansen, T. 2003. Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) I – Growth and feed conversion ratio. *Aquaculture Nutrition* 9: 1-7.

Nordvik, K., Kryvi, H., Totland, G. K. & Grotmol, S. 2005. The salmon vertebral body develops through mineralization of two preformed tissues that are encompassed by two layers of bone. *J. Anat.* 206: 103 – 114.

Oppedal, F., Berg, A., Olsen, R. E., Taranger, G. L. & Hansen, T. 2005. Photoperiod in seawater influence seasonal growth and chemical composition in autumn sea-transferred Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given two vaccines. *Aquaculture* 256: 396 – 410.

Oppedal, F., Taranger, G. L., Juell, J. E., Fosseidengen, J. E. & Hansen, T. 1997. Light intensity affects growth and sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts in sea cages. *Aquatic Living Resources* 10: 351 – 357.

Oppedal, F., Taranger, G. L., Juell, J-E. & Hansen, T. 1999. Growth, osmoregulation and sexual maturation of underyearling Atlantic salmon smolt *Salmo salar* L. exposed to different intensities of continuous light in sea cages. *Aquaculture Research* 30: 491–499

Persson, P., Johannson, S. H., Takagi, Y. & Björnsson, B. T. 1997. Estradiol-17 β and nutritional status affect calcium balance, scale and bone resorption, and bone formation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Comp Physiol B* 167: 468-473.

Ricker, W. E. 1979. Growth rates and models. In: Hoar, W. S., Randall, D. J., & Brett, J. R. (Eds.) *Fish Physiology*, vol. 8. Academic Press, New York: 677 - 743.

Roy, P. K & Lall, S. P. 2003. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.) *Aquaculture* 221: 451 – 468.

Roy, P. K., Witten, P. E., Hall, B. K. & Lall, S. P. 2002. Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralization of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 35 – 48.

Smith, I. P., Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A. & Kadri, S. 1993. *Aquaculture* 117: 165 – 178.

Solbakken, V. A., Hansen, T. & Stefansson, S. O. 1994. Effects of photoperiod and temperature on growth and parr smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and subsequent performance in seawater. *Aquaculture* 121: 13 – 27.

Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E. & Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines* 4: 89 – 101.

Stakkestad, J. A. & Åsberg, A. 2000. Serum-Alkaliske fosfataser, serum-fosfat og serum-kalsium. I *Brukerhåndbok klinisk kjemi*, Akademisk fagforlag AS, Haugesund: 61-63, 152-154 & 221-223.

Staurnes, M., Nordtvedt, R. & Rosslund O. 1998. Vasskvalitet. I Hansen T. *Oppdrett av laksesmolt*, Landbruksforlaget A/S: 87 – 113.

Stefansson, S. O., Bæverfjord, G., Handeland, S. O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B. O., Rosten, T., Toften, H., & Havardsson, B. 2005. Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt. *Sluttrapport 19.05.05*.

Sullivan, M., Hammond, G., Roberts, R. J. & Manchester, N. J. 2007 a. Spinal deformation in commercially cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a clinical and radiological study. *Journal of Fish Diseases* 30: 745 – 756.

Sullivan, M., Reid, S. W., Ternent, H., Manchester, N. J., Roberts, R. J., Stone, D. A. J., & Hardy, R. W. 2007 b. The aetiology of spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L: influence of different commercial diets on the incidence and severity of the preclinical condition in salmon parr under two contrasting husbandry regimes. *Journal of Fish Diseases* 30: 759 – 767.

Sørum, U. & Damsgård, B . 2004. Effects of anaesthetisation and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 232: 333 – 341

Vielma J. & Lall, S. P. 1998. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater is not influenced by high dietary calcium intake. *Aquaculture* 160: 117 – 128.

Vågsholm, I. & Djupvik, H. O. 1998. Risk factors for spinal deformities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 21: 47–53.

Wargelius, A., Fjellidal, P. G. & Hansen, T. 2005. Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev Genes Evol* 215: 350 – 357.

Witten, P. E., Gil-Martens L, Hall BK, Huisseune, A. & Obach, A. 2005. Compressed vertebrae in Atlantic salmon *Salmo salar*: evidence for metaplastic chondrogenesis as a skeletogenic response late in ontogeny. *Diseases of aquatic organisms* 64, 237 – 246.

Witten, P. E., Obach, A., Huisseune, A. & Bæverfjord, G. 2006. Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture* 258: 164 – 172.

Ye, C., Liu, Y., Tian, L., Mai, K., Du, Z., Yang, H. & Niu J. 2006. Effect of dietary calcium and phosphorus on growth, feed efficiency, mineral content and body composition of juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 255: 263 – 271.

Åtland, Å., Bæverfjord, G., Heier, L. S., Rosseland, B. O. & Rosten, T. 2007. Vannkvalitet i norske settefiskanlegg. Problem- og tiltaksvurdering. I Bjerknes, Vannkvalitet og smoltproduksjon. Juul forlag.

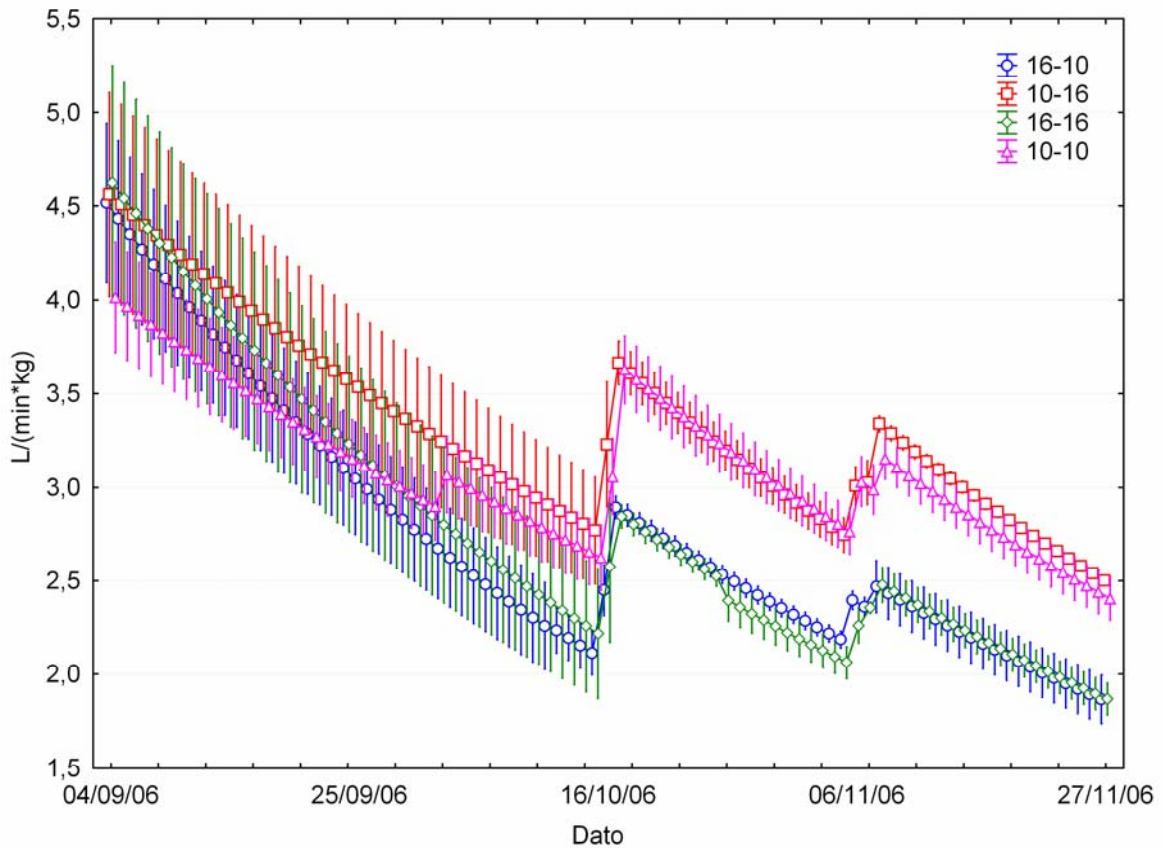
Appendiks A: Eksperimentelt design

Tabell A1: Fôrtabell. Laksen i forsøket vart fôra med ulike fôr etter anbefalingar frå produsentane. Samansetninga i dei forskjellige fôrtypane er tilpassa aminosyrebehovet til laks med ulike storleikar.

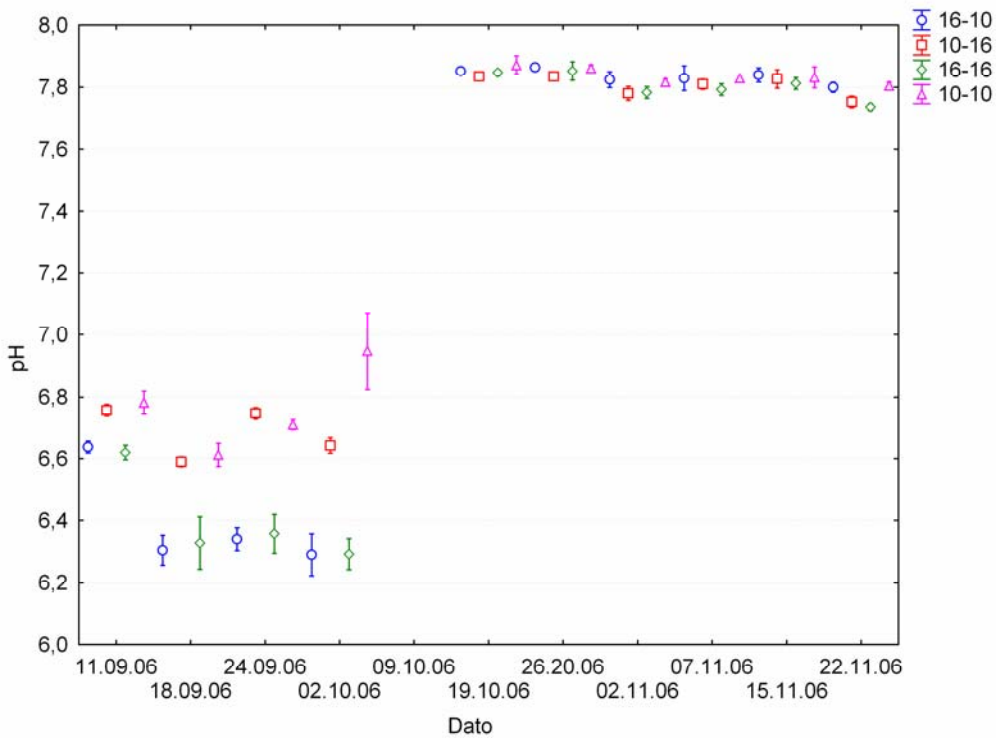
Fiskevekt (g)	Fôr
0,12 - 0,9	0,5 mm Nutra ST, Skretting
0,9 - 15,0	1,0 mm Nutra ST, Skretting
15 - 200	2,0 mm Nutra Olympic, Skretting
200 - 500	5,0 mm Bio-Optimal Cpk 200, BioMar
500 - 1000	7,0 mm Classic 500, BioMar
1000 - 2000	10,0 mm Classic 1000, BioMar
2000 - 3500	12,0 mm Classic , BioMar

Tabell A2: Oksygenmetting (gjennomsnitt \pm SD) per temperaturregime (n = 4) ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. Målingane vart utført i avløpsvatnet til kvart kar.

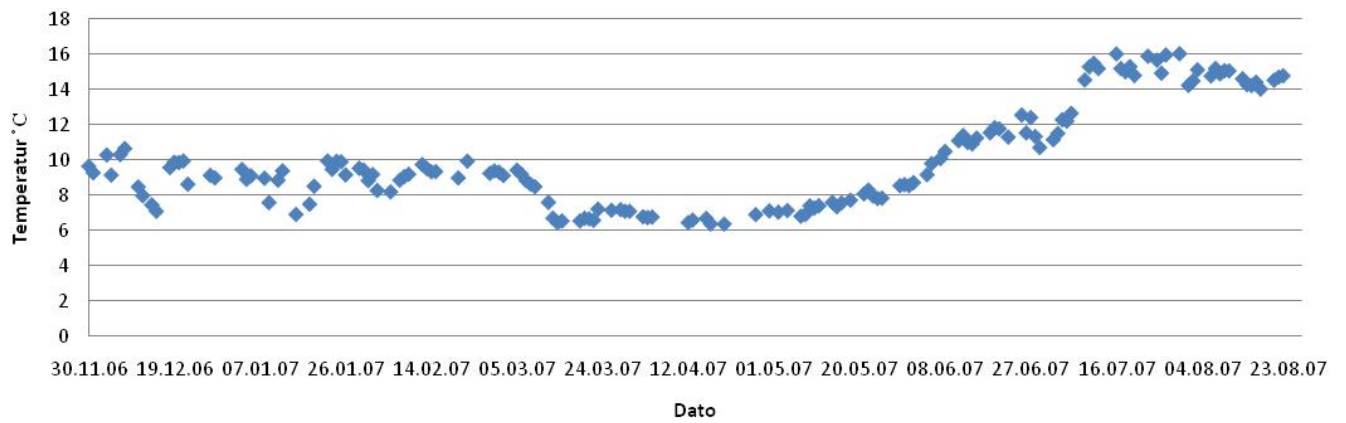
Dato	16-10			10-16			16-16			10-10		
	snitt	\pm	SD	snitt	\pm	SD	snitt	\pm	SD	snitt	\pm	SD
01.09.2006	88,0	\pm	2,2	95,5	\pm	0,6	88,5	\pm	0,6	95,0	\pm	0,0
05.09.2006	92,3	\pm	1,5	98,3	\pm	1,0	92,3	\pm	2,2	96,0	\pm	1,2
08.09.2006	90,0	\pm	0,8	94,8	\pm	0,5	86,8	\pm	2,2	94,3	\pm	0,5
07.09.2006	87,5	\pm	0,6	96,5	\pm	0,6	89,3	\pm	0,5	96,3	\pm	1,0
11.09.2006	89,3	\pm	1,0	96,8	\pm	0,5	90,0	\pm	0,8	95,8	\pm	1,0
14.09.2006	82,0	\pm	1,8	93,5	\pm	1,3	85,8	\pm	1,5	94,8	\pm	1,0
18.09.2006	80,8	\pm	1,5	91,3	\pm	1,7	80,8	\pm	1,7	91,0	\pm	1,2
21.09.2006	83,3	\pm	1,5	93,8	\pm	1,0	81,5	\pm	2,6	91,8	\pm	1,5
24.09.2006	83,0	\pm	2,6	92,5	\pm	2,1	83,8	\pm	3,0	92,0	\pm	1,4
28.09.2006	81,5	\pm	2,1	92,8	\pm	0,5	81,3	\pm	2,2	92,3	\pm	1,0
02.10.2006	75,0	\pm	1,8	90,5	\pm	1,3	77,0	\pm	2,8	90,3	\pm	1,7
04.10.2006	81,5	\pm	2,4	91,5	\pm	1,3	83,0	\pm	1,8	92,0	\pm	1,4
12.10.2006	79,5	\pm	1,9	91,8	\pm	1,3	81,3	\pm	1,0	91,5	\pm	1,3
18.10.2006	90,0	\pm	0,0	83,0	\pm	1,4	81,3	\pm	1,3	91,3	\pm	1,0
22.10.2006	86,8	\pm	0,5	79,5	\pm	1,3	79,3	\pm	1,0	87,0	\pm	0,8
26.10.2006	90,0	\pm	0,0	79,3	\pm	1,0	78,5	\pm	0,6	87,3	\pm	1,0
30.10.2006	88,0	\pm	1,4	82,3	\pm	1,7	79,5	\pm	1,7	89,5	\pm	0,6
02.11.2006	92,3	\pm	1,0	84,5	\pm	1,7	80,0	\pm	0,8	93,0	\pm	0,8
07.11.2006	88,8	\pm	1,7	84,8	\pm	1,3	80,3	\pm	2,2	91,3	\pm	1,3
13.11.2006	85,5	\pm	1,3	80,5	\pm	0,6	77,3	\pm	1,3	87,5	\pm	0,6
17.11.2006	90,0	\pm	2,4	84,0	\pm	1,2	79,0	\pm	0,8	90,8	\pm	0,5
20.11.2006	84,3	\pm	1,0	81,0	\pm	1,2	77,0	\pm	0,8	87,3	\pm	1,3
23.11.2006	84,5	\pm	1,3	81,3	\pm	1,7	76,5	\pm	1,3	88,3	\pm	1,5
26.11.2006	85,0	\pm	1,2	81,0	\pm	1,4	78,0	\pm	2,0	89,8	\pm	1,5



Figur A1: Estimert spesifikk vasstilførsel (gjennomsnitt \pm SD, $n = 4$) per temperaturregime ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase. Vasstilførselen vart berekna ut frå målt L/min ved tidspunkt der tilførselen måtte aukast for å oppretthalde oksygenivået i karet, og ut frå estimert biomasse per kar kvar dag.



Figur A2: pH (gjennomsnitt \pm SD) per temperaturregime ($n = 4$) ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase.



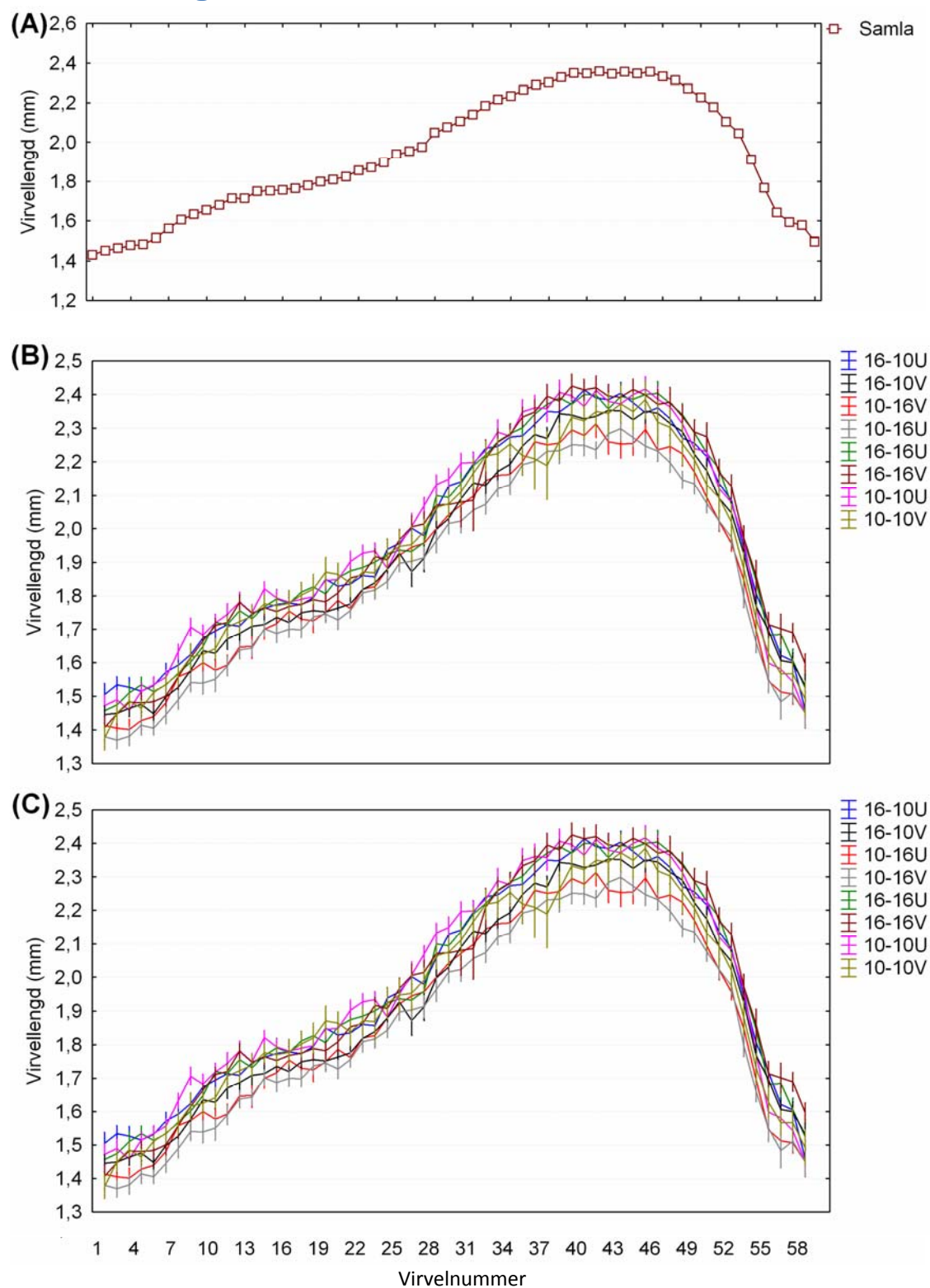
Figur A3: Temperatur i merdperioden. Data er gitt som gjennomsnitt av temperaturar målt kvar heile meter frå 1 m til 10 m djup.

Tabell A3: Fôringsmengd (som % av biomasse per dag) i merdperioden.

Frå dato	Til dato	Utforingsprosent
30.11.2006	10.12.2006	2,0
11.12.2006	21.12.2006	2,4
22.12.2006	27.12.2006	2,0
28.12.2006	14.02.2006	1,8
15.02.2007	31.05.2007	1,6
31.05.2007	17.06.2007	1,3
16.06.2007	06.08.2007	1,4
07.08.2007	21.08.2007	0,8

Appendiks B: Rådata

Virvelmorfologi



Figur B1: Virvellengd (gjennomsnitt \pm S.E.) over ryggspyla. (A) Virvellengd ($n = 39$) seks uker før sjøvassoverføring, (B) ved sjøvassoverføring ($n = 16$; 4 per kar) og (C) seks uker etter sjøvassoverføring ($n = 16$; 4 per kar).

Defomasjonar

Tabell B1: Frekvens (%) av ankyloser (A), kompresjonar (K) og dislokasjonar (D) i ulike regionar (R) i virvelsøyla; R1 (fremre bukregion, virvel nr 1-8), R2 (bakre bukregion, virvel nr 9-30), R3 (fremre haleregion, virvel nr 31-49) og R4 (bakre haleregion, virvel nr 50-58) ved ulike tidspunkt. Veke angir veker før/etter sjøvassoverføring. Ved veke -6 vart data oppgitt som samla, fordi fiskane ikkje var inndelt i temperaturregime enda. Dislokasjonar vart berre tald ved sluttuttaket (veke 42) fordi det var uvisst korleis gjentatt tining og frysing påverka integriteten til virvelsøyla ved dei andre uttaka. Data vert oppgitt i % i staden for absoluttverdiar fordi n varierte mellom behandlingane i veke 42, og fordi det er ulikt mengde virvlar i dei ulike regionane.

Veke	R	Def	Samla	Behandling								n	
				10-10U	10-10V	10-16U	10-16V	16-10U	16-10V	16-16U	16-16V		
-6	R1	K	0,00										312
-6	R1	A	0,00										
-6	R2	K	1,75										858
-6	R2	A	0,00										
-6	R3	K	0,54										741
-6	R3	A	0,00										
-6	R4	K	0,47										429
-6	R4	A	0,00										
0	R1	K		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,00		256
0	R1	A		0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	0,00	0,00	0,00		
0	R2	K		0,99	0,99	0,71	1,42	0,28	0,99	1,70	1,56		704
0	R2	A		0,28	0,43	0,00	0,28	0,00	0,00	0,28	0,99		
0	R3	K		1,15	0,33	0,16	1,48	0,49	0,33	0,66	0,16		608
0	R3	A		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
0	R4	K		0,28	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,57		352
0	R4	A		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
6	R1	K		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		256
6	R1	A		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	0,78		
6	R2	K		3,41	1,28	1,70	0,43	1,99	0,85	2,27	0,85		704
6	R2	A		0,00	0,28	0,28	0,00	0,28	0,28	0,00	0,28		
6	R3	K		0,49	0,82	0,82	0,82	0,00	0,49	0,82	0,00		608
6	R3	A		0,00	0,66	0,66	0,00	0,33	0,33	0,00	0,00		
6	R4	K		0,57	0,57	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00		352
6	R4	A		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,00		
42	R1	K		0,00	0,00	0,78	0,24	0,00	0,00	2,86	5,10		
42	R1	A		0,00	0,46	0,52	0,24	0,49	0,00	0,26	0,00		384-483
42	R1	D		0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
42	R2	K		0,18	0,84	3,79	3,15	1,52	0,87	5,30	5,84		
42	R2	A		0,00	1,77	3,69	1,75	1,87	1,75	3,13	2,41		1056-1188
42	R2	D		0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,66	0,00		
42	R3	K		2,89	4,29	23,25	19,13	6,30	13,77	21,93	23,09		
42	R3	A		0,62	0,39	3,18	1,72	1,34	1,21	3,18	1,29		912-1026
42	R3	D		0,00	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00	0,77	0,00		
42	R4	K		0,00	0,19	1,46	1,92	0,00	0,38	0,63	1,02		
42	R4	A		0,00	0,00	0,00	0,96	0,20	0,00	1,04	0,00		480-510
42	R4	D		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

Tabell B2: Mengde fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar, kategorisert som fisk med deformert rygg eller hale, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42).

Behandling	Deformert fisk	Fisk med deformert rygg	Fisk med deformert hale	Fisk med deformert rygg og hale	n
10-10U	2	1	1	0	78
10-10V	3	3	0	0	87
10-16U	13	8	5	0	94
10-16V	15	1	14	0	85
16-10U	3	1	2	0	91
16-10V	3	0	3	0	87
16-16U	18	1	17	0	82
16-16V	19	2	17	0	68

Appendiks C: Statistiske testar.

Vekst

Tabell C1: ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på lengd seks veker før sjøvassoverføring (veke -6), ved sjøvassoverføring (veke 0), seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) og 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). I veke -6 vart data analysert med einvegs ANOVA, då fiskane ikkje var vaksinerte. I dei andre prøveuttaka vart lengda analysert med tovegs ANOVA. I veke -6, 0 og 6 vart individ nøsta i kar for å minimere kareffektar. Individ vart ikkje nøsta i kar ved veke 42, då fisken berre var merka som vaksinert eller uvaksinert, og kva temperaturregime dei vart oppdretta under.

Veker før/ etter sjøvassoverføring	Variabel	SS	df	MS	F	p
-6	Parallell	2,1	12	0,2	0,8	0,6399
	Temperatur	1,7	3	0,6	3,3	0,0597
	Error	105,2	496	0,2		
0	Parallell	17,8	24	0,7	1,6	0,0266
	Temperatur	613,3	3	204,4	276,8	0,0000
	Vaksine	72	1	72	97,6	0,0000
	Interaksjon	1,8	3	0,6	0,8	0,4988
	Error	484,1	1075	0,5		
6	Parallell	64,5	24	2,7	2,3	0,0004
	Temperatur	1001	3	333,7	124,3	0,0000
	Vaksine	203,1	1	203,1	75,6	0,0000
	Interaksjon	40,1	3	13,4	5	0,0079
	Error	1424,7	1218	1,2		
42	Temperatur	1165	3	388	32,0	0,0000
	Vaksine	3231	1	3231	265,9	0,0000
	Interaksjon	508	3	169	13,9	0,0000
	Error	8081	665	12		

Tabell C2: Newman-Keuls test på lengd for vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime ved sjøvassoverføring (veke 0), seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) og 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42).

Veker etter		16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
0	sjøvassoverføring								
	Gruppe								
	16-10U	0,0000	0,0000	0,0000	0,4123	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-10V		0,0000	0,0000	0,0000	0,5627	0,0000	0,0000	0,0000
	10-16U			0,0000	0,0000	0,0000	0,0853	0,0002	
	10-16V				0,0000	0,0000	0,0000	0,0909	
	16-16U					0,0000	0,0000	0,0000	
	16-16V						0,0000	0,0000	
10-10U							0,0000		
10-10V								0,0000	
6	16-10U	0,0000	0,0000	0,0000	0,3800	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-10V		0,0000	0,0000	0,0000	0,0577	0,0000	0,0000	0,0000
	10-16U			0,0000	0,0000	0,0000	0,0165	0,0000	0,0000
	10-16V				0,0000	0,0000	0,0136	0,6874	
	16-16U					0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-16V						0,0000	0,0000	0,0000
	10-10U							0,0159	
	10-10V								0,0159
42	16-10U	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-10V		0,0015	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0046
	10-16U			0,0000	0,0128	0,0000	0,0154	0,5198	
	10-16V				0,0000	0,0124	0,0000	0,0000	0,0000
	16-16U					0,0000	0,7771	0,0049	
	16-16V						0,0000	0,0000	0,0000
	10-10U							0,0036	
	10-10V								0,0036

Tabell C3: ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på vekt, seks veker før sjøvassoverføring (veke -6), ved sjøvassoverføring (veke 0), seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) og 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). I veke -6 vart data analysert med einvegs ANOVA, då fiskane ikkje var vaksinerte. I dei andre prøveuttaka vart lengda analysert med tovegs ANOVA. I veke -6, 0 og 6 vart individ nøsta i kar for å minimere kareffektar. Individ vart ikkje nøsta i kar ved veke 42, då fisken berre var merka som vaksinert eller uvaksinert, og kva temperaturregime dei vart oppdretta under.

Veker før/etter sjøvassoverføring	Variabel	SS	df	MS	F	p
-6	Parallell	245,9	12	20,5	1,65	0,0745
	Temperatur	166,9	3	55,6	2,71	0,0914
	Error	6156,5	496	12,4		
0	Parallell	2759	24	115	1,8	0,0105
	Temperatur	79834	3	26611	231,97	0,0000
	Vaksine	7407	1	7407	64,58	0,0000
	Interaksjon	185	3	62	0,54	0,6616
	Error	68610	1075	64		
6	Parallell	16317	24	680	1,69	0,0199
	Temperatur	324806	3	108269	159,34	0,0000
	Vaksine	38698	1	38698	56,96	0,0000
	Interaksjon	9184	3	3061	4,51	0,0121
	Error	489076	1217	402		
42	Temperatur	1,0529E+07	3	3,5096E+06	22,17	0,0000
	Vaksine	3,0630E+07	1	3,0630E+07	193,50	0,0000
	Interaksjon	6,3381E+06	3	2,1127E+06	13,35	0,0000
	Error	1,0527E+08	665	1,5829E+05		

Tabell C4: Newman-Keuls test for vekt hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, ved sjøvassoverføring (veke 0), seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) og 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42).

Veker etter		16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
0	sjøvassoverføring								
	Gruppe								
	16-10U	0,0000	0,0000	0,0000	0,0857	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-10V		0,0000	0,0000	0,0000	0,8301	0,0000	0,0000	0,0000
	10-16U			0,0000	0,0000	0,0000	0,0459	0,0022	
	10-16V				0,0000	0,0000	0,0000	0,1096	
	16-16U					0,0000	0,0000	0,0000	
	16-16V						0,0000	0,0000	
6	16-10U	0,0000	0,0000	0,0000	0,3654	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-10V		0,0000	0,0000	0,0000	0,9048	0,0000	0,0000	0,0000
	10-16U			0,0039	0,0000	0,0000	0,2218	0,0080	
	10-16V				0,0000	0,0000	0,0760	0,6817	
	16-16U					0,0000	0,0000	0,0000	
	16-16V						0,0000	0,0000	
	10-10U							0,0780	
	10-10V								
42	16-10U	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	16-10V		0,0575	0,0045	0,0000	0,0006	0,0001	0,1017	
	10-16U			0,0000	0,0003	0,0000	0,0427	0,5151	
	10-16V				0,0000	0,3739	0,0000	0,0000	
	16-16U					0,0000	0,0610	0,0000	
	16-16V						0,0000	0,0000	
	10-10U							0,0203	
	10-10V								

Tabell C5: ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på kondisjonsfaktor seks veker før sjøvassoverføring (veke -6), ved sjøvassoverføring (veke 0), seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) og 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). I veke -6 vart data analysert med einvegs ANOVA, då fiskane enda ikkje hadde blitt vaksinerte. I dei andre prøveuttaka vart lengda analysert med tovegs ANOVA. I veke -6, 0 og 6 vart individ nøsta i kar for å minimere kareffektar. Individ vart ikkje nøsta i kar ved veke 42, då fisken berre var merka som vaksinert eller uvaksinert, og kva temperaturregime dei vart oppdretta under.

Veke før/etter sjøvassoverføring	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
-6	16-10U			0,0209		0,3926		0,1699	
	10-16U					0,1069		0,2810	
	16-16U							0,3452	
	10-10U								
0	16-10U		0,1108	0,4525	0,4011	0,1300	0,3234	0,3471	0,3999
	16-10V			0,4015	0,6517	0,0008	0,5358	0,6992	0,6962
	10-16U				0,5904	0,0608	0,7025	0,6928	0,6957
	10-16V					0,0260	0,8794	0,8432	0,7844
	16-16U						0,0072	0,0101	0,0178
	16-16V							0,8516	0,8854
	10-10U								0,7773
	10-10V								
6	16-10U		0,0362	0,8136	0,1433	0,6375	0,0000	0,1466	0,0376
	16-10V			0,0099	0,6028	0,0118	0,0001	0,5047	0,8657
	10-16U				0,0915	0,8881	0,0000	0,1652	0,0130
	10-16V					0,0860	0,0000	0,6655	0,4296
	16-16U						0,0000	0,1323	0,0144
	16-16V							0,0000	0,0002
	10-10U								0,4399
	10-10V								
42	16-10U		0,9127	0,1343	0,7017	0,2656	0,0105	0,0040	0,0709
	16-10V			0,1376	0,9808	0,1589	0,0128	0,0021	0,1196
	10-16U				0,0983	0,0026	0,0000	0,1413	0,9128
	10-16V					0,3239	0,0222	0,0015	0,0730
	16-16U						0,1543	0,0000	0,0027
	16-16V							0,0000	0,0000
	10-10U								0,2540
	10-10V								

Tabell C6: Newman-Keuls test for kondisjonsfaktor hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, seks veker før sjøvassoverføring (veke -6), ved sjøvassoverføring (veke 0), seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6) og 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42).

Veke før/etter sjøvassoverføring	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
-6	16-10U			0,0209		0,3926		0,1699	
	10-16U					0,1069		0,2810	
	16-16U							0,3452	
	10-10U								
0	16-10U	0,1108	0,4525	0,4011	0,1300	0,3234	0,3471	0,3999	
	16-10V		0,4015	0,6517	0,0008	0,5358	0,6992	0,6962	
	10-16U			0,5904	0,0608	0,7025	0,6928	0,6957	
	10-16V				0,0260	0,8794	0,8432	0,7844	
	16-16U					0,0072	0,0101	0,0178	
	16-16V						0,8516	0,8854	
	10-10U							0,7773	
6	16-10U	0,0362	0,8136	0,1433	0,6375	0,0000	0,1466	0,0376	
	16-10V		0,0099	0,6028	0,0118	0,0001	0,5047	0,8657	
	10-16U			0,0915	0,8881	0,0000	0,1652	0,0130	
	10-16V				0,0860	0,0000	0,6655	0,4296	
	16-16U					0,0000	0,1323	0,0144	
	16-16V						0,0000	0,0002	
	10-10U							0,4399	
42	16-10U	0,9127	0,1343	0,7017	0,2656	0,0105	0,0040	0,0709	
	16-10V		0,1376	0,9808	0,1589	0,0128	0,0021	0,1196	
	10-16U			0,0983	0,0026	0,0000	0,1413	0,9128	
	10-16V				0,3239	0,0222	0,0015	0,0730	
	16-16U					0,1543	0,0000	0,0027	
	16-16V						0,0000	0,0000	
	10-10U							0,2540	
10-10V									

Tabell C7: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på lengdevekst (mm dag^{-1}) i ferskvassperiode (veke -6-0) og tidleg sjøvassfase (veke 0-6). Lengdeveksten vart estimert frå gjennomsnittleg vekt av vaksinert og uvaksinert fisk per kar.

Periode	Variabel	SS	df	MS	F	p
Ferskvassperiode (veke -6 - 0)	Temperatur	1,16757	3	0,38919	338,02	0,0000
	Vaksine	0,11872	1	0,11872	103,11	0,0000
	Interaksjon	0,00294	3	0,00098	0,85	0,4801
	error	0,02763	24	0,00115		
Tidleg saltvassperiode (veke 0 - 6)	Temperatur	0,06162	3	0,02054	6,79	0,0018
	Vaksine	0,03956	1	0,03956	13,07	0,0014
	Interaksjon	0,04162	3	0,01387	4,58	0,0113
	error	0,07262	24	0,00303		

Tabell C8: Newman-Keuls test på lengdevekst (mm dag^{-1}) hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, i ferskvassperiode(veke -6-0) og tidleg sjøvassfase (veke 0-6).

Periode	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
Ferskvass- periode (veke -6 - 0)	16-10U		0,0002	0,0001	0,0001	0,4018	0,0001	0,0001	0,0001
	16-10V			0,0001	0,0001	0,0002	0,8032	0,0002	0,0002
	10-16U				0,0007	0,0001	0,0002	0,1018	0,0136
	10-16V					0,0001	0,0001	0,0002	0,0982
	16-16U						0,0002	0,0002	0,0001
	16-16V							0,0001	0,0001
	10-10U								0,0007
	10-10V								
Tidleg saltvass- periode (veke 0 - 6)	16-10U		0,0591	0,0929	0,0161	0,8077	0,0032	0,0013	0,0059
	16-10V			0,6302	0,4471	0,0571	0,3336	0,2093	0,3860
	10-16U				0,4303	0,0635	0,2094	0,1121	0,2840
	10-16V					0,0185	0,6141	0,4883	0,5741
	16-16U						0,0043	0,0018	0,0076
	16-16V							0,6300	0,7066
	10-10U								0,6645
	10-10V								

Tabell C9: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på vektauke (% dag⁻¹) i ferskvassperiode (veke -6-0) og tidleg sjøvassfase (veke 0-6). Vektauken vart estimert frå gjennomsnittleg vekt av vaksinert og uvaksinert fisk per kar.

Periode	Variabel	SS	df	MS	F	p
Ferskvassperiode (veke -6 - 0)	Temperatur	3,21411	3	1,07137	197,14	0,0000
	Vaksine	0,26489	1	0,26489	48,74	0,0000
	Interaksjon	0,00313	3	0,00104	0,19	0,9010
	error	0,13043	24	0,00543		
Tidleg saltvassperiode (veke 0 - 6)	Temperatur	0,03222	3	0,01074	1,65	0,2036
	Vaksine	0,00273	1	0,00273	0,42	0,5231
	Interaksjon	0,05751	3	0,01917	2,95	0,0529
	error	0,15588	24	0,00649		

Tabell C10: Newman-Keuls test for vektauke (% dag⁻¹) hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, frå ferskvassperiode (veke -6-0).

Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
16-10U		0,0019	0,0001	0,0001	0,0588	0,0005	0,0001	0,0001
16-10V			0,0001	0,0001	0,0646	0,3486	0,0002	0,0001
10-16U				0,0055	0,0002	0,0002	0,9256	0,0050
10-16V					0,0001	0,0002	0,0026	0,7745
16-16U						0,0211	0,0001	0,0001
16-16V							0,0001	0,0001
10-10U								0,0034
10-10V								

Tabell C11: Levenes test for homogen varians på ulike vekstparameter.

Analytt	Veke før/etter sjøvassoverføring	MS effekt	MS Error	F	p
Lengd	-6	0,098879	0,076875	1,2862	0,1369
Lengd	0	0,230006	0,08619	2,6686	0,0003
Lengd	6	0,715095	0,281771	2,5379	0,0186
Lengd	42	38,48592	5,044854	7,6287	0,0000
Vekt	-6	3,519679	4,342304	0,8106	0,7598
Vekt	0	44,536232	14,542279	3,0625	0,0000
Vekt	6	332,107049	110,27262	3,0117	0,0063
Vekt	42	120521	62703,28	1,9221	0,0636
K-faktor	-6	0,002851	0,001323	2,1552	0,0924
K-faktor	0	0,001569	0,000789	1,9895	0,0081
K-faktor	6	0,00172	0,001505	1,1428	0,3421
K-faktor	42	0,006498	0,004587	1,4167	0,1954
Vektauke (% dag ⁻¹)	Ferskvassperiode	0,001371	0,00144	0,9523	0,4866
Vektauke (% dag ⁻¹)	Tidleg sjøvassperiode	0,000802	0,002081	0,3853	0,9018
Lengdevekst (mm dag ⁻¹)	Ferskvassperiode	0,000163	0,000296	0,5493	0,7886
Lengdevekst (mm dag ⁻¹)	Tidleg sjøvassperiode	0,000238	0,000811	0,2932	0,9500

Mineral

Tabell C12: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på mineralinnhold i virvlar (som % av tørrvekt), ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Individ var nøsta i kar for å minimere kareffektar.

Veker etter sjøvassoverføring		Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
0	Parallell	tilfeldig	134,8	24	5,6	1,06	0,4080	
	Temperatur	bestemt	258,3	3	86,1	15,33	0,0000	
	Vaksine	bestemt	0	1	0	0	0,9901	
	Interaksjon	bestemt	4,9	3	1,6	0,29	0,8300	
	Error		505,4	95	5,3			
6	Parallell	tilfeldig	302	24	12,6	1,15	0,3058	
	Temperatur	bestemt	391,8	3	130,6	10,38	0,0001	
	Vaksine	bestemt	168,8	1	168,8	13,42	0,0012	
	interaksjon	bestemt	173,5	3	57,8	4,6	0,0111	
	Error		1059,5	97	10,9			

Tabell C13: Newman-Keuls test på mineralinnhold i virvlar (som % av tørrvekt) for vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6).

Veker etter		16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
0	16-10U		0,4636	0,0302	0,0462	0,5705	0,7450	0,0041	0,0008
	16-10V			0,0055	0,0079	0,3956	0,4606	0,0005	0,0002
	10-16U				0,9989	0,0696	0,0405	0,6163	0,4216
	10-16V					0,1194	0,0996	0,3503	0,2806
	16-16U						0,8711	0,0166	0,0038
	16-16V							0,0170	0,0044
	10-10U								0,5544
	10-10V								
6	16-10U		0,7806	0,5799	0,0117	0,2583	0,0031	0,0004	0,0008
	16-10V			0,9081	0,0152	0,2755	0,0084	0,0020	0,0032
	10-16U				0,0296	0,2131	0,0111	0,0019	0,0035
	10-16V					0,0005	0,5682	0,5094	0,5196
	16-16U						0,0002	0,0001	0,0001
	16-16V							0,6941	0,6030
	10-10U								0,7695
	10-10V								

Tabell C14: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på mineralvektauke (% dag⁻¹) i ryggvirvel, i ferskvassperiode (veke -6-0) og tidleg sjøvassfase (veke 0-6). Mineralaukinga vart estimert frå gjennomsnittleg mineralvekt av vaksinert og uvaksinert fisk per kar.

Periode	Variabel	SS	df	MS	F	p
Ferskvassperiode	Temperatur	2,06708	3	0,689	34,713	0,0000
	Vaksine	0,15871	1	0,1587	7,996	0,0093
	Interaksjon	0,02793	3	0,0093	0,469	0,7066
	Error	0,47638	24	0,0199		
Tidleg sjøvassperiode	Temperatur	0,812071	3	0,2707	4,3891	0,0134
	Vaksine	0,02866	1	0,0287	0,4647	0,5020
	Interaksjon	0,238056	3	0,0794	1,2867	0,3016
	Error	1,480157	24	0,0617		

Tabell C15: p-verdiar frå Newman-Keuls test for spesifikk mineralvektauke (% dag⁻¹) i ryggvirvlar hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, i ferskvassperiode (veke -6-0) og tidleg sjøvassfase (veke 0-6).

Periode	Gruppe	10-10U	10-10V	10-16U	10-16V	16-10U	16-10V	16-16U	16-16V
ferskvassperiode	10-10U		0,5253	0,6697	0,7873	0,0002	0,0023	0,0002	0,0033
	10-10V			0,5372	0,9863	0,0002	0,0010	0,0002	0,0011
	10-16U				0,6963	0,0003	0,0024	0,0002	0,0050
	10-16V					0,0002	0,0014	0,0002	0,0015
	16-10U						0,2217	0,5586	0,1203
	16-10V							0,1251	0,9211
	16-16U								0,0908
	16-16V								
tidleg sjøvassperiode	10-10U		0,5416	0,9016	0,9871	0,1541	0,2053	0,4159	0,8971
	10-10V			0,7399	0,8657	0,2764	0,3953	0,5107	0,6838
	10-16U				0,9771	0,1740	0,2142	0,5042	0,8361
	10-16V					0,2149	0,2506	0,6082	0,5921
	16-10U						0,9756	0,3745	0,0977
	16-10V							0,6232	0,1122
	16-16U								0,3795
	16-16V								

Tabell C16: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på proteinvektauke (% dag⁻¹) i ryggvirvel, ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase.

Periode	Variabel	SS	df	MS	F	p
Ferskvassperiode	Temperatur	5,15025	3	1,7168	55,692	0,0000
	Vaksine	0,09498	1	0,095	3,081	0,0920
	Interaksjon	0,00018	3	6E-05	0,002	0,9999
	Error	0,73981	24	0,0308		
Tidleg sjøvassperiode	Temperatur	0,97527	3	0,3251	4,865	0,0088
	Vaksine	0,35368	1	0,3537	5,293	0,0304
	Interaksjon	0,11677	3	0,0389	0,582	0,6323
	Error	1,6037	24	0,0668		

Tabell C17: p-verdiar frå Newman-Keuls test for proteinvektauke (% dag⁻¹) i ryggvirvlar hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, ved smoltifisering og tidleg sjøvassfase.

Periode	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
Ferskvassperiode	16-10U		0,6208	0,0002	0,0001	0,8820	0,4824	0,0001	0,0001
	16-10V			0,0002	0,0001	0,6987	0,8228	0,0002	0,0001
	10-16U				0,4117	0,0002	0,0002	0,6099	0,2850
	10-16V					0,0001	0,0002	0,9039	0,5883
	16-16U						0,6678	0,0001	0,0001
	16-16V							0,0001	0,0001
	10-10U								0,3926
	10-10V								
Tidleg sjøvassperiode	16-10U		0,6714	0,0537	0,4823	0,3693	0,9501	0,7294	0,5924
	16-10V			0,0128	0,2298	0,1390	0,4348	0,4997	0,5111
	10-16U				0,2612	0,2390	0,0605	0,1269	0,1203
	10-16V					0,6916	0,5645	0,4985	0,6414
	16-16U						0,4180	0,5299	0,5668
	16-16V							0,8419	0,8182
	10-10U								0,8284
	10-10V								

Tabell C18: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på kalsiuminnhold i ryggvirvel (% av mineralvekt) ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Individ var nøsta i kar for å minimere kareffektar

Veker etter							
sjøvassoverføring	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
0	Parallell	tilfeldig	65,7	24	2,7	0,69	0,8478
	Temperatur	bestemt	26,6	3	8,9	3,21	0,0396
	Vaksine	bestemt	2,6	1	2,6	0,94	0,3417
	Interaksjon	bestemt	5,1	3	1,7	0,61	0,6126
	Error		309,8	78	4		
6	Parallell	tilfeldig	59,6	24	2,5	0,69	0,8506
	Temp	bestemt	22,9	3	7,6	3,06	0,0468
	Vaksine	bestemt	3,4	1	3,4	1,38	0,2514
	interaksjon	bestemt	4,2	3	1,4	0,56	0,6465
	Error		321	89	3,6		

Tabell C19: p-verdiar frå Newman-Keuls test på kalsiuminnhold i ryggvirvel (% av mineralvekt) hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6).

Veker etter									
sjøvassoverføring	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
0	16-10U		0,2704	0,3811	0,2995	0,3507	0,3493	0,1948	0,3400
	16-10V			0,8734	0,8604	0,7799	0,8780	0,7843	0,9064
	10-16U				0,8758	0,8300	0,8031	0,8831	0,9506
	10-16V					0,8943	0,8105	0,8980	0,9659
	16-16U						0,8875	0,8592	0,9440
	16-16V							0,9034	0,9567
	10-10U								0,6910
	10-10V								
6	16-10U		0,5953	0,6937	0,6455	0,8450	0,8130	0,7652	0,4355
	16-10V			0,8880	0,7988	0,7468	0,9360	0,9179	0,6994
	10-16U				0,9573	0,6501	0,8349	0,7811	0,6017
	10-16V					0,6490	0,5777	0,9978	0,8516
	16-16U						0,8496	0,7436	0,3769
	16-16V							0,8407	0,6516
	10-10U								0,7023
	10-10V								

Tabell C20: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på fosforinnhold i ryggvirvel (% av mineralvekt) ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Individ var nøsta i kar for å minimere kareffektar.

Veker etter sjøvassoverføring		Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
0	Parallell	tilfeldig	88,03	24	3,67	1,23	0,2397	
	Temperatur	bestemt	7,89	3	2,63	0,72	0,5508	
	Vaksine	bestemt	9,01	1	9,01	2,46	0,1296	
	Interaksjon	bestemt	1,18	3	0,39	0,11	0,9552	
	Error		271,61	91	2,98			
6	Par	tilfeldig	41,71	24	1,74	0,68	0,8624	
	Temp	bestemt	21,94	3	7,31	4,19	0,0158	
	Vaksine	bestemt	4,09	1	4,09	2,34	0,1385	
	interaksjon	bestemt	2,84	3	0,95	0,54	0,6583	
	Error		236,48	92	2,57			

Tabell C21: Newman-Keuls test for fosforinnhold i ryggvirvel (% av mineralvekt) hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6).

Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
16-10U		0,9815	0,9686	0,8289	0,4058	0,9823	0,7493	0,3171
16-10V			0,8908	0,9858	0,7433	0,8678	0,5892	0,2799
10-16U				0,9811	0,7049	0,9502	0,6775	0,3050
10-16V					0,5461	0,9877	0,7821	0,3722
16-16U						0,7383	0,3071	0,0632
16-16V							0,4165	0,2370
10-10U								0,4163
10-10V								

Tabell C22: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på molart kalsium/fosforforhold i ryggvirvlar ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Individ var nøsta i kar for å minimere kareffektar.

Veke før/etter							
sjøvassoverføring	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
0	Parallell	tilfeldig	0,3293	24	0,0137	1,71	0,0412
	Temperatur	bestemt	0,0561	3	0,0187	1,38	0,2730
	Vaksine	bestemt	0,0487	1	0,0487	3,6	0,0695
	Interaksjon	bestemt	0,0929	3	0,031	2,28	0,1043
	Error		0,6278	78	0,008		
6	Parallell	tilfeldig	0,1615	24	0,0067	1,17	0,2902
	Temperatur	bestemt	0,0373	3	0,0124	1,85	0,1643
	Vaksine	bestemt	0,0051	1	0,0051	0,75	0,3936
	Interaksjon	bestemt	0,0054	3	0,0018	0,27	0,8483
	Error		0,5054	88	0,0057		

Tabell C23: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på kalsiumkonsentrasjon i serumprøvar under smoltifisering og i tidleg sjøvassperiode. Individ var nøsta i kar for å minimere kareffektar.

Veke før/etter							
sjøvassoverføring	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
-3	Parallell	tilfeldig	1,03E+06	24	4,29E+04	1,05	0,4172
	Temperatur	bestemt	1,63E+06	3	5,42E+05	12,64	0,0000
	Vaksine	bestemt	1,09E+04	1	1,09E+04	0,26	0,6180
	Interaksjon	bestemt	7,71E+04	3	2,57E+04	0,6	0,6218
	Error		3,85E+06	94	4,09E+04		
0	Parallell	tilfeldig	7,44E+05	24	3,10E+04	0,97	0,5075
	Temperatur	bestemt	5,10E+05	3	1,70E+05	5,48	0,0051
	Vaksine	bestemt	5,14E+05	1	5,14E+05	16,57	0,0004
	Interaksjon	bestemt	8,11E+04	3	2,70E+04	0,87	0,4690
	Error		2,99E+06	94	3,19E+04		
3	Parallell	tilfeldig	2,78E+06	24	1,16E+05	3,29	0,0000
	Temperatur	bestemt	2,69E+06	3	8,96E+05	7,75	0,0009
	Vaksine	bestemt	3,75E+04	1	3,75E+04	0,32	0,5741
	Interaksjon	bestemt	1,75E+05	3	5,84E+04	0,51	0,6824
	Error		3,35E+06	95	3,52E+04		
6	Parallell	tilfeldig	1,16E+06	24	4,84E+04	1,53	0,0757
	Temperatur	bestemt	4,25E+05	3	1,42E+05	2,93	0,0535
	Vaksine	bestemt	5,73E+05	1	5,73E+05	11,88	0,0021
	interaksjon	bestemt	7,94E+05	3	2,65E+05	5,49	0,0050
	Error		2,97E+06	94	3,16E+04		

Tabell C24: Newman-Keuls test på kalsiumkonsentrasjon i serumprøver hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, under smoltifisering og i tidleg sjøvassfase.

Veke før/etter sjøvassoverføring		Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
-3	16-10U		0,9774	0,0234	0,3627	0,9985	0,8614	0,0125	0,0035	
	16-10V			0,0163	0,2468	0,9805	0,9774	0,0095	0,0029	
	10-16U				0,1573	0,0094	0,0201	0,7390	0,6878	
	10-16V					0,1165	0,3723	0,1887	0,1170	
	16-16U						0,9958	0,0065	0,0022	
	16-16V							0,0098	0,0025	
	10-10U								0,6240	
	10-10V									
0	16-10U		0,2599	0,0718	0,0022	0,7240	0,3854	0,8260	0,0019	
	16-10V			0,4625	0,1697	0,3422	0,6659	0,3245	0,1076	
	10-16U				0,3797	0,1207	0,4733	0,1369	0,1949	
	10-16V					0,0056	0,0980	0,0088	0,9771	
	16-16U						0,4313	0,8145	0,0046	
	16-16V							0,3165	0,0702	
	10-10U								0,0067	
	10-10V									
3	16-10U		0,1879	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0006	0,0057	
	16-10V			0,0001	0,0012	0,0002	0,0009	0,0177	0,0670	
	10-16U				0,3558	0,5956	0,3297	0,0547	0,0052	
	10-16V					0,5056	0,8262	0,2760	0,1114	
	16-16U						0,3719	0,1270	0,0185	
	16-16V							0,3898	0,1182	
	10-10U								0,3544	
	10-10V									
6	16-10U		0,0002	0,6493	0,2495	0,2892	0,2548	0,1868	0,9260	
	16-10V			0,0001	0,0037	0,0001	0,0058	0,0121	0,0002	
	10-16U				0,1785	0,3745	0,0765	0,0690	0,4289	
	10-16V					0,0330	0,7666	0,5453	0,4259	
	16-16U						0,0081	0,0079	0,2154	
	16-16V							0,9297	0,2999	
	10-10U								0,2528	
	10-10V									

Tabell C25: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på fosfatkonsentrasjon i serumprøver under smoltifisering og i tidleg sjøvassfase. Individ var nøsta i kar for å minimere kareffektar.

Veke før/etter sjøvassoverføring		Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
-3	Parallell	tilfeldig	4,38E+07	24	1,83E+06	1,769	0,0274	
	Temperatur	bestemt	1,24E+07	3	4,15E+06	2,271	0,1060	
	Vaksine	bestemt	1,33E+07	1	1,33E+07	7,262	0,0127	
	Interaksjon	bestemt	4,82E+06	3	1,61E+06	0,881	0,4648	
	Error		9,90E+07	96	1,03E+06			
0	Parallell	tilfeldig	1,21E+07	24	5,04E+05	0,783	0,7489	
	Temperatur	bestemt	4,66E+07	3	1,55E+07	30,689	0,0000	
	Vaksine	bestemt	1,13E+07	1	1,13E+07	22,393	0,0001	
	Interaksjon	bestemt	1,85E+06	3	6,16E+05	1,218	0,3238	
	Error		5,99E+07	93	6,44E+05			
3	Parallell	tilfeldig	2,02E+07	24	8,40E+05	1,385	0,1361	
	Temperatur	bestemt	3,55E+07	3	1,18E+07	14,073	0,0000	
	Vaksine	bestemt	2,26E+06	1	2,26E+06	2,686	0,1143	
	Interaksjon	bestemt	1,78E+06	3	5,95E+05	0,708	0,5565	
	Error		5,77E+07	95	6,07E+05			
6	Parallell	tilfeldig	4,29E+07	24	1,79E+06	1,649	0,0465	
	Temperatur	bestemt	4,69E+07	3	1,56E+07	8,749	0,0004	
	Vaksine	bestemt	1,03E+07	1	1,03E+07	5,734	0,0248	
	Interaksjon	bestemt	2,51E+07	3	8,36E+06	4,673	0,0104	
	Error		1,03E+08	95	1,08E+06			

Tabell C26: Newman-Keuls test på fosfatkonsentrasjon i serumprøver hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, under smoltifisering og i tidleg sjøvassfase.

Veke før/etter									
sjøvassoverføring	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
-3	16-10U		0,0128	0,6296	0,2125	0,0688	0,0165	0,2994	0,2365
	16-10V			0,0037	0,3320	0,4638	0,9911	0,1396	0,2988
	10-16U				0,1366	0,0267	0,0046	0,2827	0,1296
	10-16V					0,6044	0,4351	0,5167	0,8406
	16-16U						0,7362	0,3778	0,4507
	16-16V							0,1821	0,4389
	10-10U								0,6712
	10-10V								
0	16-10U		0,5827	0,0012	0,0001	0,8444	0,1380	0,0103	0,0001
	16-10V			0,0119	0,0001	0,4277	0,2407	0,0538	0,0001
	10-16U				0,0569	0,0016	0,1274	0,4305	0,0234
	10-16V					0,0001	0,0012	0,0211	0,4534
	16-16U						0,1235	0,0117	0,0001
	16-16V							0,2448	0,0002
	10-10U								0,0044
	10-10V								
3	16-10U		0,4077	0,0003	0,0022	0,0046	0,3008	0,0006	0,0005
	16-10V			0,0001	0,0003	0,0006	0,1524	0,0001	0,0001
	10-16U				0,7276	0,5805	0,0050	0,8839	0,7755
	10-16V					0,6626	0,0254	0,5739	0,7332
	16-16U						0,0295	0,5773	0,6347
	16-16V							0,0096	0,0086
	10-10U								0,8517
	10-10V								
6	16-10U		0,0003	0,0001	0,0001	0,0007	0,0001	0,0003	0,0152
	16-10V			0,0943	0,1132	0,7965	0,0746	0,8816	0,1851
	10-16U				0,8330	0,0976	0,6046	0,1623	0,0032
	10-16V					0,0498	0,9548	0,1198	0,0009
	16-16U						0,0414	0,6225	0,1695
	16-16V							0,0921	0,0008
	10-10U								0,1505
	10-10V								

Tabell C27: Levenes test for homogene variansar på mineralanalysar.

Analytt	Eining	Veke før/etter sjøvassoverføring	MS effekt	MS Error	F	p
Kalsiumkonsentrasjon	serum	-3	8848	13853,6	0,6387	0,7231
Kalsiumkonsentrasjon	serum	0	20283,9	6220,2	3,2610	0,0000
Kalsiumkonsentrasjon	serum	3	11521,1	9157,1	1,2582	0,1992
Kalsiumkonsentrasjon	serum	6	15707	13473,5	1,1658	0,3281
Fosforkonsentrasjon	serum	-3	334151,4	406008,5	0,8230	0,5701
Fosforkonsentrasjon	serum	0	449767,6	119984,9	3,7485	0,0000
Fosforkonsentrasjon	serum	3	314167	155547,7	2,0197	0,0052
Fosforkonsentrasjon	serum	6	1457560	534106,6	2,7290	0,0118
Mineralinnhald (%)	virvel	0	2,245233	1,25626	1,7872	0,0213
Mineralinnhald (%)	virvel	6	1,252776	4,494143	0,2788	0,9611
Mineralauke (% dag ⁻¹)	virvel	0	0,008116	0,005715	1,4200	0,2432
Mineralauke (% dag ⁻¹)	virvel	6	0,017536	0,016163	1,0849	0,4033
Proteinvektauke (% dag ⁻¹)	virvel	0	0,008923	0,007081	1,2602	0,3109
Proteinvektauke (% dag ⁻¹)	virvel	6	0,030749	0,017461	1,7610	0,1422
Kalsiuminnhald (%)	virvel	0	1,097134	1,216615	0,9018	0,5082
Kalsiuminnhald (%)	virvel	6	1,95356	0,634343	3,0797	0,0000
Fosforinnhald (%)	virvel	0	0,67473	0,46067	1,4647	0,0912
Fosforinnhald (%)	virvel	6	0,40179	0,44306	0,9068	0,5039
Kalium/fosforforhold Ca/P (molar)	virvel	0	0,005071	0,003293	1,5401	0,1622
	virvel	6	0,001792	0,001475	1,2153	0,2376

Virvelmorfologi

Tabell C28: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på intervertebralrom (som % lengde av ryggstøylelengde) ved sjøvassoverføring (veke 0). Grunna store regionale variasjonar vart intervertebralromma analysert som gjennomsnitt per region per individ. Individ var nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar.

Region	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
Fremre bukregion	Temperatur	bestemt	0,0495	3	0,0165	7,247	0,0013
	Vaksine	bestemt	0,0014	1	0,0014	0,614	0,4409
	Parallell	tilfeldig	0,0547	24	0,0023	1,692	0,0388
	Temp * vak	bestemt	0,0073	3	0,0024	1,065	0,3822
	Error		0,1279	95	0,0013		
Bakre bukregion	Temperatur	bestemt	0,0657	3	0,0219	20,052	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0042	1	0,0042	3,86	0,0611
	Parallell	tilfeldig	0,0262	24	0,0011	0,7	0,8400
	Temp * vak	bestemt	0,0020	3	0,0007	0,624	0,6066
	Error		0,1481	95	0,0016		
Fremre haleregion	Temperatur	bestemt	0,1467	3	0,0489	27,305	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0127	1	0,0127	7,084	0,0136
	Parallell	tilfeldig	0,0429	24	0,0018	0,484	0,9778
	Temp * vak	bestemt	0,0074	3	0,0025	1,377	0,2735
	Error		0,3512	95	0,0037		
Bakre haleregion	Temperatur	bestemt	0,1156	3	0,0385	21,208	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0033	1	0,0033	1,789	0,1935
	Parallell	tilfeldig	0,0436	24	0,0018	0,561	0,9466
	Temp * vak	bestemt	0,0051	3	0,0017	0,929	0,4417
	Error		0,3073	95	0,0032		

Tabell C29: Newman-Keuls test på intervertebralrom (som % lengde av ryggstøylelengde) i ulike regionar hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, ved sjøvassoverføring (veke 0).

Region	Gruppe	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
Fremre bukregion	16-10U		0,0135	0,1600	0,0417	0,6725	0,6338	0,1750	0,1997
	16-10V			0,0002	0,0001	0,0059	0,0097	0,0002	0,0002
	10-16U				0,5107	0,4012	0,3028	0,9300	0,8042
	10-16V					0,1780	0,1068	0,7362	0,6360
	16-16U						0,7103	0,2309	0,3875
	16-16V							0,2599	0,3331
	10-10U								0,9093
	10-10V								
Bakre bukregion	16-10U		0,1881	0,0210	0,0212	0,3877	0,6390	0,0041	0,0516
	16-10V			0,0005	0,0004	0,0463	0,1762	0,0002	0,0016
	10-16U				0,9059	0,1816	0,0482	0,7390	0,6198
	10-16V					0,2352	0,0543	0,5345	0,8115
	16-16U						0,3980	0,0941	0,2027
	16-16V							0,0135	0,0888
	10-10U								0,6030
	10-10V								
Fremre haleregion	16-10U		0,9562	0,0016	0,0249	0,0712	0,7794	0,0017	0,0055
	16-10V			0,0018	0,0332	0,1086	0,9397	0,0018	0,0067
	10-16U				0,4841	0,2781	0,0028	0,9359	0,6250
	10-16V					0,5171	0,0289	0,6071	0,5093
	16-16U						0,0542	0,3329	0,3915
	16-16V							0,0031	0,0083
	10-10U								0,8358
	10-10V								
Bakre haleregion	16-10U		0,9032	0,0070	0,1344	0,5671	0,6850	0,0026	0,0062
	16-10V			0,0114	0,1349	0,3882	0,9818	0,0062	0,0122
	10-16U				0,2248	0,0623	0,0168	0,8864	0,8965
	10-16V					0,2888	0,2118	0,3345	0,3699
	16-16U						0,6480	0,0532	0,0803
	16-16V							0,0077	0,0163
	10-10U								0,7365
	10-10V								

Tabell C30: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på intervertebralrom (som % lengde av ryggstøylelengde) seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Grunna store regionale variasjonar vart intervertebralromma analysert som gjennomsnitt per region per individ. Individ var nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar.

Region	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
Fremre bukregion	Temperatur	bestemt	0,1185	3	0,0395	24,79	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0086	1	0,0086	5,391	0,0291
	Parallell	tilfeldig	0,0382	24	0,0016	0,821	0,7026
	Temp * vak	bestemt	0,0098	3	0,0033	2,048	0,1339
	Error		0,1863	96	0,0019		
Bakre bukregion	Temperatur	bestemt	0,1756	3	0,0585	15,457	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0518	1	0,0518	13,68	0,0011
	Parallell	tilfeldig	0,0909	24	0,0038	1,12	0,3377
	Temp * vak	bestemt	0,0211	3	0,0071	1,861	0,1632
	Error		0,3245	96	0,0034		
Fremre haleregion	Temperatur	bestemt	0,2974	3	0,0991	15,201	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,1115	1	0,1115	17,093	0,0004
	Parallell	tilfeldig	0,1565	24	0,0065	0,906	0,5938
	Temp * vak	bestemt	0,0305	3	0,0102	1,56	0,2250
	Error		0,6912	96	0,0072		
Bakre haleregion	Temperatur	bestemt	0,2253	3	0,0751	9,985	0,0002
	Vaksine	bestemt	0,1578	1	0,1578	20,987	0,0001
	Parallell	tilfeldig	0,1805	24	0,0075	1,238	0,2308
	Temp * vak	bestemt	0,0326	3	0,0109	1,445	0,2546
	Error		0,5833	96	0,0061		

Tabell C31: Newman-Keuls test for intervertebralrom (som % lengd av ryggstøylelengd) i ulike regionar hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6).

Region	Grupper	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
Fremre bukregion	16-10U		0,3219	0,0343	0,0001	0,4228	0,0312	0,0001	0,0001
	16-10V			0,2234	0,0007	0,7944	0,1743	0,0002	0,0005
	10-16U				0,0515	0,2235	0,9005	0,0159	0,0213
	10-16V					0,0011	0,0672	0,5032	0,9788
	16-16U						0,1267	0,0002	0,0008
	16-16V							0,0173	0,0404
	10-10U								0,7647
	10-10V								
Bakre bukregion	16-10U		0,1405	0,0102	0,0001	0,4472	0,0008	0,0001	0,0001
	16-10V			0,2032	0,0031	0,2531	0,0721	0,0031	0,0020
	10-16U				0,0874	0,0442	0,3478	0,0763	0,0447
	10-16V					0,0002	0,3775	0,9099	0,9912
	16-16U						0,0059	0,0002	0,0002
	16-16V							0,2968	0,1413
	10-10U								0,9891
	10-10V								
Fremre haleregion	16-10U		0,0988	0,0754	0,0011	0,5657	0,0010	0,0001	0,0001
	16-10V			0,7178	0,1744	0,1352	0,1236	0,0241	0,0055
	10-16U				0,2121	0,1532	0,1099	0,0416	0,0119
	10-16V					0,0052	0,9351	0,3236	0,2511
	16-16U						0,0042	0,0003	0,0001
	16-16V							0,5324	0,3395
	10-10U								0,5457
	10-10V								
Bakre haleregion	16-10U		0,0108	0,4226	0,0094	0,5007	0,0105	0,0003	0,0001
	16-10V			0,0338	0,7949	0,0026	0,9257	0,3240	0,0956
	10-16U				0,0460	0,3043	0,0618	0,0020	0,0003
	10-16V					0,0018	0,9097	0,3200	0,1161
	16-16U						0,0017	0,0001	0,0001
	16-16V							0,1849	0,0870
	10-10U								0,4225
	10-10V								

Tabell C32: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på intervertebralrom (som % lengd av fiskelengd) mellom virvel nr 40 og 44, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42).

Variabel	SS	df	MS	F	p
Temperatur	1,1403	3	0,3801	6,19	0,0004
Vaksine	0,0289	1	0,0289	0,47	0,4928
Interaksjon	0,2897	3	0,0966	1,57	0,1952
Error	24,3604	397	0,0614		

Tabell C33: Newman-Keuls test for intervertebralrom (som % lengd av fiskelengd) mellom virvel nr 40 og 44 hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42).

Gruppe	16-10U	16-10V	16-16U	16-16V	10-16U	10-16V	10-10U	10-10V
16-10U		0,9347	0,4432	0,7223	0,9733	0,8470	0,0314	0,7066
16-10V			0,5152	0,9000	0,8889	0,9221	0,0256	0,5830
16-16U				0,4924	0,5236	0,3464	0,0003	0,1376
16-16V					0,9390	0,8466	0,0148	0,6098
10-16U						0,9391	0,0207	0,3950
10-16V							0,0104	0,5845
10-10U								0,0688
10-10V								

Tabell C34: Levenes test for homogen varians for intervertebralrom (som % lengde av ryggstøylelengde) i ulike deler av ryggstøyla ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6).

Veker etter sjøvassoverføring	Region/plassering	MS Effect	MS Error	F	p
0	Fremre bukregion	0,0005	0,0006	0,8782	0,5260
	Bakre bukregion	0,0007	0,0005	1,3393	0,2378
	Fremre haleregion	0,0017	0,0012	1,424	0,2019
	Bakre haleregion	0,0013	0,001	1,294	0,2591
6	Fremre bukregion	0,0005	0,0007	0,6801	0,6886
	Bakre bukregion	0,002	0,0012	1,7254	0,1093
	Fremre haleregion	0,0033	0,0026	1,2867	0,2626
	Bakre haleregion	0,0013	0,0023	0,5608	0,7864
42	Mellom virvel nr 40-44	0,0372	0,0247	1,5059	0,1635

Tabell C35: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på lengd/diameterforhold i ryggvirvlar ved sjøvassoverføring (veke 0). Grunna store regionale variasjonar vart L/D-forholda analysert som gjennomsnitt per region per individ. Individ var nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar.

Region	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
Fremre bukregion	Temperatur	bestemt	0,0126	3	0,0042	2,94	0,0538
	Vaksine	bestemt	0,0002	1	0,0002	0,12	0,7268
	Parallell	tilfeldig	0,0343	24	0,0014	1,49	0,0905
	Temp * vak	bestemt	0,0014	3	0,0005	0,32	0,8091
	Error		0,0912	95	0,0010		
Bakre bukregion	Temperatur	bestemt	0,0054	3	0,0018	3,9	0,0215
	Vaksine	bestemt	0,0028	1	0,0028	5,9	0,0230
	Parallell	tilfeldig	0,0112	24	0,0005	0,8	0,7336
	Temp * vak	bestemt	0,0006	3	0,0002	0,4	0,7475
	Error		0,0559	95	0,0006		
Fremre haleregion	Temperatur	bestemt	0,0183	3	0,0061	12,2	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0067	1	0,0067	13,4	0,0012
	Parallell	tilfeldig	0,0120	24	0,0005	0,7	0,8481
	Temp * vak	bestemt	0,0018	3	0,0006	1,2	0,3247
	Error		0,0686	95	0,0007		
Bakre haleregion	Temperatur	bestemt	0,0416	3	0,0139	14,74	0,0000
	Vaksine	bestemt	0,0005	1	0,0005	0,56	0,4603
	Parallell	tilfeldig	0,0226	24	0,0009	0,68	0,8629
	Temp * vak	bestemt	0,0017	3	0,0006	0,62	0,6103
	Error		0,1321	95	0,0014		

Tabell C36: Newman-Keuls test på lengd/diameterforhold i ryggvirvlar frå ulike regionar hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, ved sjøvassoverføring (veke 0).

Region	Grupper	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
Bakre bukregion	16-10U		0,5942	0,1177	0,6296	0,4994	0,7953	0,4514	0,7171
	16-10V			0,0375	0,4693	0,2773	0,7071	0,2250	0,5072
	10-16U				0,4088	0,5371	0,1636	0,4038	0,3760
	10-16V					0,7737	0,5116	0,7989	0,8918
	16-16U						0,5384	0,8204	0,5858
	16-16V							0,5200	0,7067
	10-10U								0,7194
	10-10V								
Fremre haleregion	16-10U		0,8611	0,0057	0,3580	0,4127	0,6927	0,0101	0,1271
	16-10V			0,0018	0,4746	0,3816	0,9010	0,0037	0,0779
	10-16U				0,0580	0,0897	0,0021	0,7674	0,3280
	10-16V					0,7263	0,3874	0,0791	0,4047
	16-16U						0,3443	0,1006	0,3506
	16-16V							0,0041	0,0767
	10-10U								0,2586
	10-10V								
Bakre haleregion	16-10U		0,8812	0,0687	0,0389	0,4975	0,5845	0,0477	0,0017
	16-10V			0,0656	0,0415	0,4224	0,4026	0,0539	0,0022
	10-16U				0,7289	0,2155	0,2243	0,9255	0,4313
	10-16V					0,2528	0,1908	0,9783	0,4743
	16-16U						0,6776	0,3711	0,0522
	16-16V							0,2554	0,0236
	10-10U								0,2563
	10-10V								

Tabell C37: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på lengd/diameterforhold i ryggvirvlar seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Grunna store regionale variasjonar vart L/D-forholda analysert som gjennomsnitt per region per individ. Individ var nøsta i kar for å minimere eventuelle kareffektar.

Region	Variabel	Effekt	SS	df	MS	F	p
Fremre bukregion	Temperatur	bestemt	0,0149	3	0,0050	8,1	0,0007
	Vaksine	bestemt	0,0050	1	0,0050	8,1	0,0089
	Parallell	tilfeldig	0,0148	24	0,0006	0,6	0,9462
	Temp * vak	bestemt	0,0005	3	0,0002	0,3	0,8571
	Error		0,1056	96	0,0011		
Bakre bukregion	Temperatur	bestemt	0,0138	3	0,0046	10	0,0002
	Vaksine	bestemt	0,0000	1	0,0000	0	0,8864
	Parallell	tilfeldig	0,0111	24	0,0005	0,8	0,7672
	Temp * vak	bestemt	0,0008	3	0,0003	0,6	0,6210
	Error		0,0576	96	0,0006		
Fremre haleregion	Temperatur	bestemt	0,0173	3	0,0058	7,5	0,0011
	Vaksine	bestemt	0,0018	1	0,0018	2,3	0,1428
	Parallell	tilfeldig	0,0185	24	0,0008	0,9	0,5618
	Temp * vak	bestemt	0,0042	3	0,0014	1,8	0,1752
	Error		0,0796	96	0,0008		
Bakre haleregion	Temperatur	bestemt	0,0166	3	0,0055	2,72	0,0667
	Vaksine	bestemt	0,0002	1	0,0002	0,08	0,7831
	Parallell	tilfeldig	0,0487	24	0,0020	1,91	0,0146
	Temp * vak	bestemt	0,0022	3	0,0007	0,36	0,7838
	Error		0,1021	96	0,0011		

Tabell C38: Newman-Keuls test for lengd/diameterforhold i ryggvirvlar frå ulike regionar hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturegime, seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6).

Region	Grupper	16-10U	16-10V	10-16U	10-16V	16-16U	16-16V	10-10U	10-10V
Fremre bukregion	16-10U		0,2318	0,9238	0,3998	0,3690	0,2088	0,5700	0,9887
	16-10V			0,3989	0,9250	0,9064	0,7811	0,1001	0,5350
	10-16U				0,5061	0,4255	0,2278	0,4582	0,9616
	10-16V					0,7438	0,6732	0,1096	0,6020
	16-16U						0,6031	0,0639	0,4895
	16-16V							0,0188	0,2585
	10-10U								0,2539
	10-10V								
Bakre bukregion	16-10U		0,8926	0,8959	0,9372	0,4262	0,8066	0,0797	0,2482
	16-10V			0,9616	0,9637	0,3500	0,6255	0,0789	0,2717
	10-16U				0,8327	0,4652	0,8736	0,0727	0,1965
	10-16V					0,4274	0,8686	0,0682	0,1304
	16-16U						0,3702	0,0021	0,0168
	16-16V							0,0283	0,1360
	10-10U								0,4710
	10-10V								
Fremre haleregion	16-10U		0,7542	0,5729	0,6508	0,7559	0,4786	0,0146	0,7391
	16-10V			0,6543	0,5790	0,6902	0,5013	0,0081	0,7168
	10-16U				0,8214	0,5780	0,2717	0,0448	0,8604
	10-16V					0,4218	0,1367	0,0421	0,6742
	16-16U						0,4705	0,0030	0,5932
	16-16V							0,0004	0,2563
	10-10U								0,0390
	10-10V								

Tabell C39: Tovegs ANOVA for effekten av temperatur og vaksine på lengd/diameterforhold i ryggvirvlar (snitt for virvel nr 40-43 per fisk) 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Data vart arcsinustransformert for å få dei tilnærma normalfordelt.

Variabel	SS	df	MS	F	p
temp	1,2860	3	0,4287	24,86	0,0000
Vaksine	0,0664	1	0,0664	3,85	0,0503
temp*Vaksine	0,0490	3	0,0163	0,95	0,4175
Error	6,8101	395	0,0172		

Tabell C40: Newman-Keuls test på lengd/diameterforhold i ryggvirvlar (snitt for virvel nr 40-43 per fisk) hjå vaksinert og uvaksinert fisk oppdretta ved ulike temperaturregime, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Data vart arcsinustransformert for å få dei tilnærma normalfordelt.

Gruppe	10-10U	10-10V	10-16U	10-16V	16-10U	16-10V	16-16U	16-16V
10-10U		0,0237	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
10-10V			0,0070	0,0003	0,0027	0,0028	0,0002	0,0003
10-16U				0,4856	0,9754	0,6457	0,5591	0,6708
10-16V					0,6413	0,4925	0,8731	0,9810
16-10U						0,8757	0,6681	0,7490
16-10V							0,6743	0,8190
16-16U								0,9787
16-16V								

Tabell C41: Levenes test for homogen varians for L/D-forhold ved ulike tidspunkt. 42 veker etter sjøvassoverføring vart data analysert på arcsinustransformerte L/D-forhold for å få normalfordeling.

Veker etter sjøvassoverføring	Plassering i virvelsøyla	MS Effect	MS Error	F	p
0	Fremre bukregion	0,0005	0,0004	1,4874	0,1781
	Bakre bukregion	0,0002	0,0002	0,8917	0,5154
	Fremre haleregion	0,0002	0,0002	1,0374	0,4088
	Bakre haleregion	0,0003	0,0004	0,9710	0,4557
6	Fremre bukregion	0,0005	0,0003	1,7345	0,1072
	Bakre bukregion	0,0002	0,0002	0,9977	0,4364
	Fremre haleregion	0,0002	0,0003	0,6600	0,7054
	Bakre haleregion	0,0003	0,0004	0,8748	0,5286
42	Virvel nr 40 - 43	0,0201	0,0059	3,4154	0,0015

Defomasjonar

Tabell C42: Pearsons kji-kvadrattest for effekten av temperatur og vaksine på innslaget av fisk med virveldefomasjonar ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). p-verdiane angir sannsynet for at gruppene har lik frekvensfordeling.

Veke etter sjøvassoverføring	Variabel	Testa på	n	Kji-kvadrat	df	p
0	Temperatur	Vaksinert fisk	32	1,4311	3	0,6983
		Uvaksinert fisk	32	0,9481	3	0,8138
	Vaksine	16-10	32	0,0000	1	1,0000
		10-16	32	0,9880	1	0,3202
		16-16	32	0,0965	1	0,7560
		10-10	32	0,1098	1	0,7404
	6	Temperatur	Vaksinert fisk	32	1,2929	3
Uvaksinert fisk			32	0,4326	3	0,9334
Vaksine		16-10	32	1,6410	1	0,2002
		10-16	32	2,7444	1	0,0976
		16-16	32	2,1769	1	0,1401
		10-10	32	0,7837	1	0,3760

Tabell C43: Man-Witney U test for effekten av vaksine på innslaget av deformerte virvlar (%) per individ ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Fisk oppdretta ved ulike temperaturregime vart analysert kvar for seg.

Veke etter sjøvassoverføring	Regime	Rank Sum uvaksinert	Rank Sum vaksinert	U	Z	p-verdi	n uvaksinert	n vaksinert
0	16-10	1038,50	1041,50	510,50	-0,0201	0,9839	32	32
	10-16	983,00	1097,00	455,00	-0,7653	0,4441	32	32
	16-16	1028,00	1052,00	500,00	-0,1611	0,8720	32	32
	10-10	1060,00	1020,00	492,00	0,2685	0,7883	32	32
6	16-10	1107,00	973,00	445,00	0,8996	0,3683	32	32
	10-16	1122,00	958,00	430,00	1,1010	0,2709	32	32
	16-16	1132,00	948,00	420,00	1,2353	0,2167	32	32
	10-10	1088,00	992,00	464,00	0,6445	0,5192	32	32

Tabell C44: Kruskal-Wallis test for effekten av temperatur på innslaget av deformerte virvlar (%) per individ ved sjøvassoverføring (veke 0) og seks veker etter sjøvassoverføring (veke 6). Vaksinert og uvaksinert fisk vart analysert kvar for seg.

Veke etter sjøvassoverføring	Fisk	Rank sum				n	H	p-verdi
		T16-10	T10-16	T16-16	T10-10			
0	vaksinert	1946,00	2153,50	2145,50	2011,00	32	1,5923	0,6611
	uvaksinert	1990,00	1977,00	2145,00	2144,00	32	1,4805	0,6868
6	vaksinert	2029,00	1973,00	2086,00	2168,00	32	1,2943	0,7305
	uvaksinert	1990,00	2038,00	2135,00	2093,00	32	0,4463	0,9305

Tabell C45: Pearson Kji-kvadrattest for effekten av temperatur og vaksine på innslag av fisk med ytre teikn på virveldeformasjonar, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Effekten av temperatur vart testa for vaksinert og uvaksinert fisk kvar for seg, og effekten av vaksine vart testa for dei ulike temperaturregima kvar for seg.

Variabel	Testa på	Kji-kvadrat	n	p
Temperatur	Vaksinert fisk	15,0312	68-87	0,0018
	Uvaksinert fisk	13,5645	79-94	0,0036
Vaksine	16-10	0,0025	87-91	0,9605
	10-16	0,0196	85-94	0,8887
	16-16	0,4351	68-82	0,5095
	10-10	1,9623	79-87	0,1613

Tabell C46: 2*2 kji-kvadratsamanlikning for innslag av individ med ytre teikn på virveldeformasjonar oppdretta ved ulike temperaturregime, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Vaksinert og uvaksinert fisk vart analysert kvar for seg, og p-verdiane vart samanlikna med sekvensielle Bonferronikorrigererte p-verdiar for å minimere sannsynet for Type I feil.

Testa på	Regime testa mot kvarandre		Kji-kvadrat	p-verdi	Bonferroni	Signifikans
Vaksinert fisk	16-16	16-10	18,80	0,0000	0,0083	sign
	16-16	10-10	18,80	0,0000	0,0100	sign
	10-16	16-10	9,25	0,0024	0,0125	sign
	10-16	10-10	9,25	0,0024	0,0167	sign
	16-16	10-16	2,32	0,1280	0,0250	ikkje sign
	16-10	10-10	0,00	1,0000	0,0500	ikkje sign
Uvaksinert fisk	16-16	10-10	13,95	0,0002	0,0083	sign
	16-16	16-10	14,07	0,0002	0,0100	sign
	10-16	10-10	6,92	0,0085	0,0125	sign
	10-16	16-10	6,49	0,0108	0,0167	sign
	16-16	10-16	1,99	0,1583	0,0250	ikkje sign
	16-10	10-10	0,09	0,7684	0,0500	ikkje sign

Tabell C47: Pearson Kji-kvadrattest for effekten av temperatur og vaksine på innslag av individ med virveldeformasjonar (radiologisk undersøkt), 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Effekten av temperatur vart testa for vaksinert og uvaksinert fisk kvar for seg, og effekten av vaksine vart testa for dei ulike temperaturregima kvar for seg.

Variabel	Testa på	Kji-kvadrat	n	p
Temperatur	Vaksinert fisk	37,0813	49-54	0,0000
	Uvaksinert fisk	66,4997	48-51	0,0000
Vaksine	16-10	0,2836	51-52	0,5944
	10-16	0,8524	48-52	0,3559
	16-16	0,1008	48-49	0,7509
	10-10	3,2799	51-54	0,0701

Tabell C48: 2*2 kji-kvadratsamanlikning for innslag av individ virveldeformasjonar (radiologisk undersøkt) oppdretta ved ulike temperaturregime, 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Vaksinerert og uvaksinerert fisk vart analysert kvar for seg, og p-verdiane vart samanlikna med sekvensielle Bonferronikorrigererte p-verdiar for å minimere sannsynet for Type I feil.

Testa på	Regime testa mot kvarandre		Kji-kvadrat	p-verdi	Bonferroni	Signifikans
Vaksinerert fisk	16-16	10-10	23,55	0,0000	0,0083	sign
	10-16	10-10	22,80	0,0000	0,0100	sign
	16-16	16-10	12,02	0,0005	0,0125	sign
	10-16	16-10	11,26	0,0008	0,0167	sign
	10-10	16-10	2,44	0,1181	0,0250	ikkje sign
	16-16	10-16	0,05	0,8297	0,0500	ikkje sign
Uvaksinerert fisk	16-16	10-10	42,03	0,0000	0,0083	sign
	10-16	10-10	45,15	0,0000	0,0100	sign
	16-10	10-10	14,24	0,0002	0,0125	sign
	10-16	16-10	12,48	0,0004	0,0167	sign
	16-16	16-10	10,40	0,0013	0,0250	sign
	16-16	10-16	0,15	0,6947	0,0500	ikkje sign

Tabell C49: Man-Whitney U test for effekten av vaksine på innslag av deformerte virvlar (%) hjå deformert fisk 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Fisk oppdretta ved ulike temperaturregime vart analysert kvar for seg.

Temperatur	Rank Sum vaksinerert	Rank Sum uvaksinerert	U	Z	p-verdi	n uvaksinerert	n vaksinerert
16-10	857,50	1222,50	296,50	-2,8882	0,0039	33	31
16-16	2007,50	1908,50	918,50	0,4131	0,6795	44	44
10-10	252,00	489,00	147,00	-0,6355	0,5251	14	24
10-16	2280,50	1905,50	824,50	1,6710	0,0947	45	46

Tabell C50: Kruskal-Wallis test for effekten av temperaturregime på innslag av deformerte virvlar (%) hjå deformert fisk 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Vaksinerert og uvaksinerert fisk vart analysert kvar for seg.

Testa på	Sum av Ranger				n	H	p-verdi
	16-16	10-16	16-10	10-10			
Vaksinerert fisk	3928,00	3395,00	2225,00	1037,00	24-46	18,9795	0,0003
Uvaksinerert fisk	3879,00	3723,00	1320,00	394,00	14-45	49,5601	0,0000

Tabell C51: Multiple samanlikningstest for effekten av temperatur på innslag av deformerte virvlar (%) hjå deformert fisk 42 veker etter sjøvassoverføring (veke 42). Vaksinerert og uvaksinerert fisk vart analysert kvar for seg.

Testa på	Temperatur	16-16	10-16	16-10	10-10
Vaksinerert fisk	16-16		0,4844	0,4537	0,0001
	10-16			1,0000	0,0229
	16-10				0,0742
	10-10				
Uvaksinerert fisk	16-16		1,0000	0,0000	0,0000
	10-16			0,0000	0,0000
	16-10				1,0000
	10-10				

Appendiks D: Test av ulike avfettingsmetodar

Innleiing

Metodane som vert brukt for å fjerne feitt må fjerne så mykje feitt som mogleg, samstundes som dei ikkje må fjerne protein eller mineraladelen i beinvevet.

I dette forsøket vart fleire kjende avfettingmiddel samanlikna for å finne den beste metoden. Vurderinga av metodane vart gjort ved å samanlikne mineralvekta (oskevekta) og tørrvekta til grupper av virvlar avfeitta i ulike løysningar. Etter brenning inneheld oska berre mineral, medan tørrvekta vil omfatte mineral, protein og eventuelle restar av feitt. Dersom nokon av avfettingsmetodane fjernar mineral i tillegg til feitt vil mineralvekta i denne gruppa sannsynlegvis verte lågare enn i den ubehandla gruppa. Ein kan dessverre ikkje kontrollere om dei ulike metodane fjernar noko av proteinfilamentet i tillegg til feittet, men ved å la metodane testast ut over tid kan ein sjå om dei ulike løysningane fortset å fjerne tørrvekt etter til dømes 24 timar eller har stoppa opp. Dersom ei løysning fjernar protein i tillegg til feitt vil løysninga sannsynlegvis fortsette å fjerne tørrvekt heilt til mineralinnhaldet er 100%.

Material og metode

10 omtrent like store laks vart kjønnsbestemt og filetert (Tab. D1). Frå kvar fisk vart virvel nr 37-46 tatt ut og vaska grundig med neglebørste og springvatn til alt synleg bindevev og muskulatur var fjerna. Ryggstrengen vart fjerna med skalpell. Prøvane vart fryst ned i eppendorfrøyr med destillert vatn i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ frys.

Tabell D1: Lengd, vekt og kjønn på forsøksfisk

Fisk nr	Lengd (cm)	Vekt (g)	Kjønn
1	41	745,6	han
2	40,3	604,5	han
3	42,3	767,1	ho
4	41	689,0	ho
5	42	734,0	ho
6	40,5	628,5	ho
7	43,5	819,0	han
8	39,7	595,0	ho
9	39	555,0	han
10	42,3	728,0	han

Det vart laga 10 grupper med 10 virvlar i kvar gruppe. Gruppene vart laga med tilfeldig latin square, der det er ein virvel frå kvar fisk i kvar gruppe, og ikkje to like virvelnr i kvar gruppe.

Avfettingsløyningane som vart prøvd ut var Zalo, heksan (Cas-nr 110-54-3), ammoniakk (Cas-nr 1336-21-6), ein blanding av aceton (Cas-nr 67-64-1) og kloroform (Cas-nr 67-66-3) og Biotex. Alle avfettingsmetodane vart utført i 25 ml reagensglas med kork.

Zalo: Gruppe 1 og 2 vart tilsett 20 ml 2% Zalo og satt på ristar i varmeskap med 40 °C. Etter 24 timar vart gruppe 1 satt 50 min på ultralyd og deretter skylt med springvatn. Gruppe 2 fekk nytt Zalovatn etter 24 timar, men stod på ristar i varmeskap i til saman 48 timar før den vart satt på ultralyd og skylt med vatn.

Heksan: Gruppe 3 og 4 vart tilsett 20 ml heksan (pro analysis) og satt i avtrekksskap i høvesvis 24 og 48 timar i romtemperatur. Gruppe 4 fekk ny heksan etter 24 timar. Etter endt avfetting vart heksanen tømt ut og virvlane skylt to gongar ved å tilsette ca 5 ml heksan og rista godt for hand.

Ammoniakk 32%: Gruppe 5 og 6 vart tilsett 20 ml 32% ammoniakk og satt i avtrekksskap (romtemperatur) i høvesvis 24 og 48 timar. Gruppe 5 vart satt 50 min på ultralyd før virvlane vart skylt godt i vatn. Gruppe 6 fekk ny ammoniakkløysning etter 24 timar. Etter 48 timar vart prøvane vaska direkte med vatn utan å få ultralyd først. Dette var fordi løysninga kokte og utvikla mykje ammoniakkgass ved ultralyd.

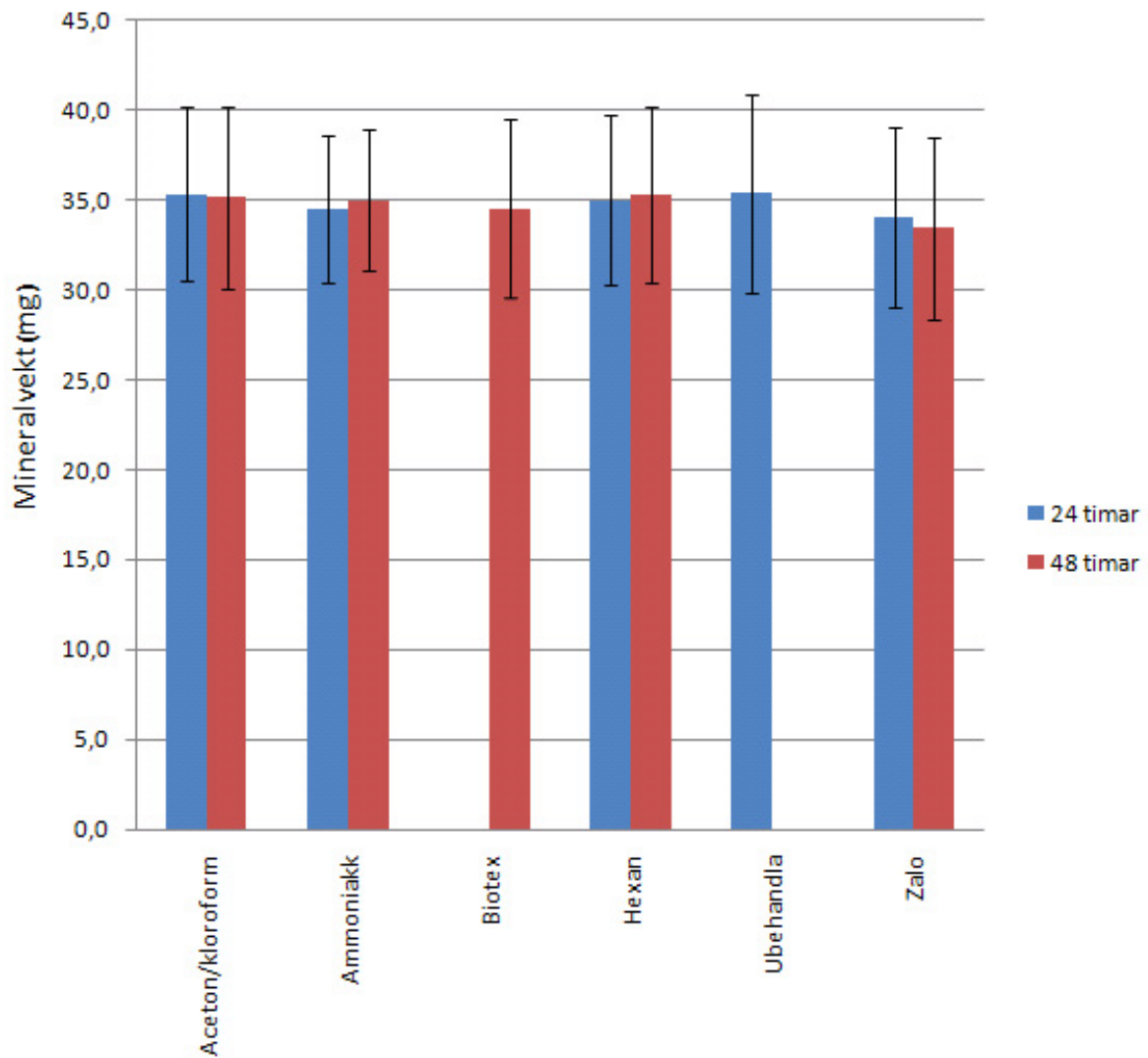
Aceton/kloroform: Gruppe 7 og 8 vart tilsett 20 ml aceton/kloroform i 2/1 volumforhold og satt i avtrekksskap i høvesvis 24 og 48 timar. Gruppe 8 fekk ny aceton/kloroform løysning etter 24 timar. Etter endt avfetting vart prøvane reinsa med rein aceton, ved å tilsette ca 5 ml aceton og rista godt for hand, for å fjerne restar av kloroform.

Ubehandla: Gruppe 9 vart ikkje avfeitta.

Biotex: Gruppe 10 vart tilsett vatn med Biotex (6 g Biotex per 1 L vatn) og satt på ristar i varmeskap med 40 °C i 48 timar. Etter 24 timar fekk gruppa nytt såpevatn.

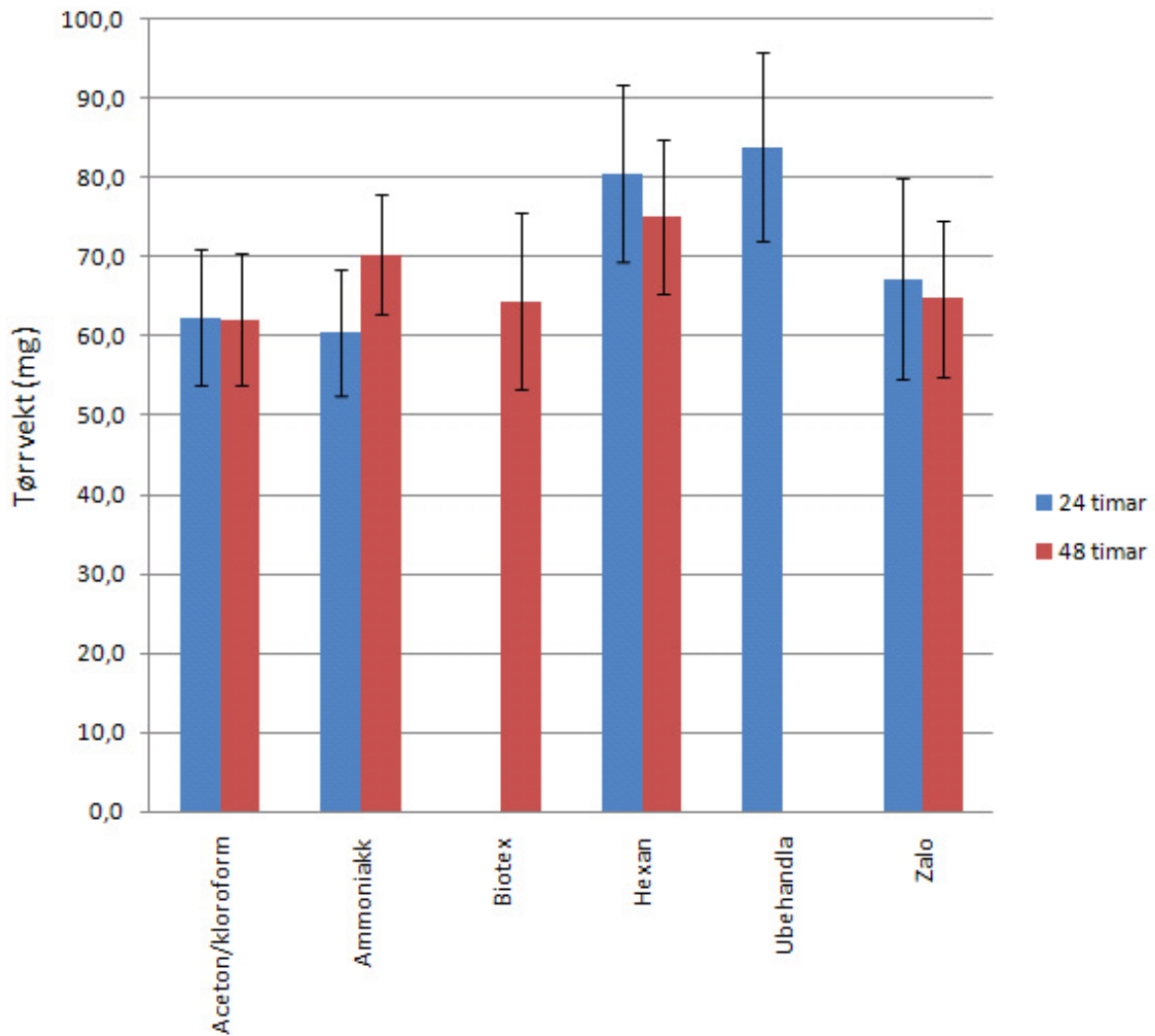
Etter avfettinga vart virvlane (også den ubehandla gruppa) tørka i ved 100 °C i varmeskap over natt. Deretter vart dei avkjølt i eksikator og veid til nærmaste 10^{-2} mg (XS204, Mettler-Toledo, Sveits) i forbrente diglar. Virvlane vart så brent (Naberthern Laboratory furnase, modell L 40/11/P320, Tyskland) ved eit trinnvis program i 10,5 timar (115 °C i 0,5 t, 540 °C i 4 t, og 750 °C i 6 t), og avkjølt i eksikator. Oskevekta vart veid til nærmaste 10^{-2} mg.

Resultat



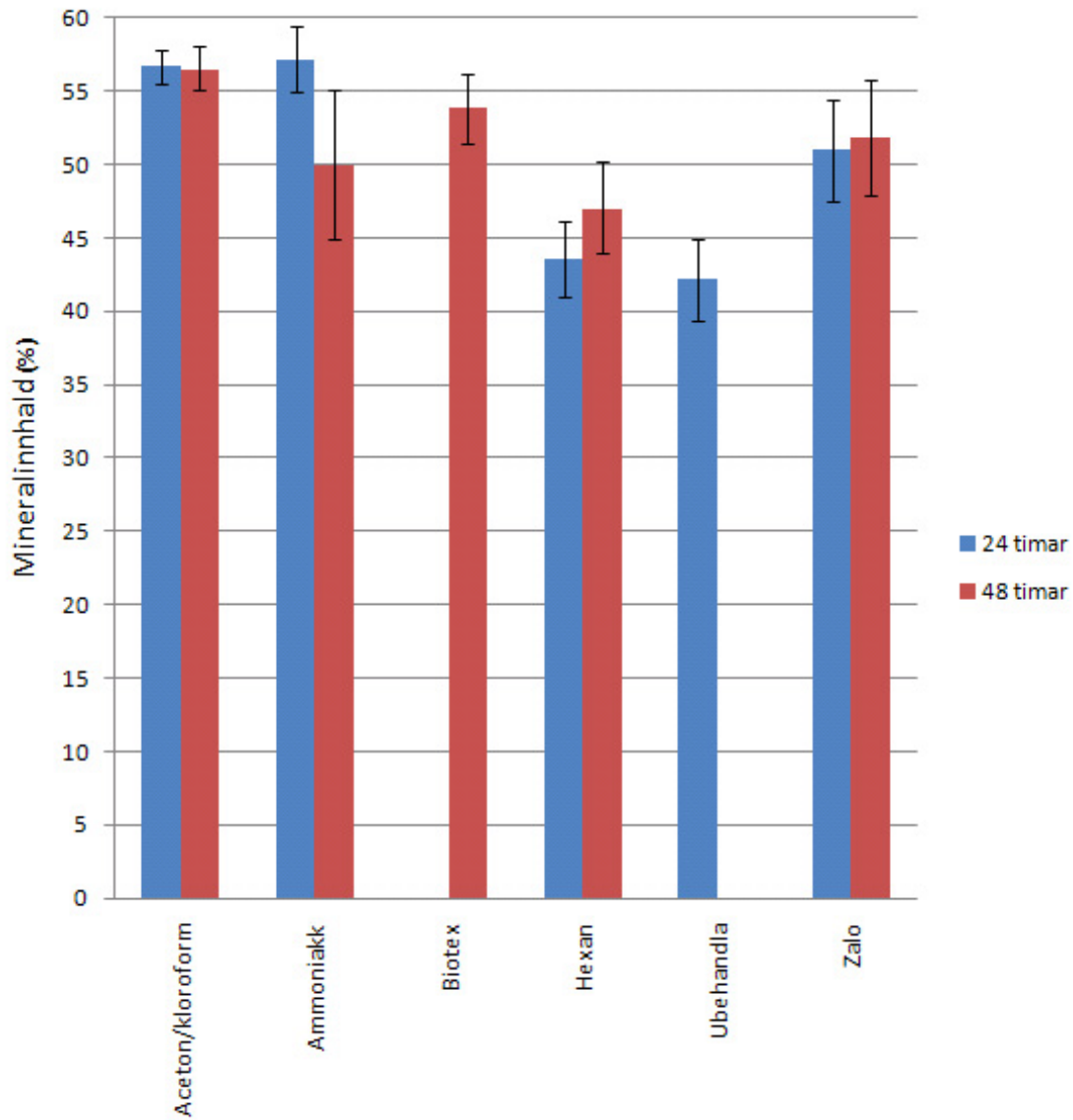
Figur D1: Mineralvekt (gjennomsnitt \pm S.D.) frå virvlar avfeitta i ulike avfettingsmiddel i 24 eller 48 timar.

Det var ingen stor forskjell i mineralvekta mellom gruppene, men ein kunne sjå ein svak tendens til at gruppene avfeitta i Zalo hadde lågare mineralvekt enn dei ubehandla. Dette tyder på at ingen av avfettingsmiddela tæra på mineralinnhaldet i virvlane i spesiell grad, bortsett frå moglegvis Zalo.



Figur D2: Tørrvekt av virvlar (gjennomsnitt \pm standardavvik) avfetta i ulike avfettingsmiddel.

Avfetting i 24 timar i 32% ammoniakkløysing med 50 min ultralyd til slutt, fjerna mykje feitt og såg ikkje ut til å tære på minerala (Fig. D2), men metoden var praktisk sett dårleg fordi det vart så stort damptrykk i glasa under ultralydbehandlinga. Bortsett frå ammoniakkløysing med ultralyd, såg Aceton og kloroform blandinga såg ut til å fjerne mest feitt. Med denne løysinga var det heller ingen forskjell i tørrvekta over tid (Fig. D2), og virvlane vart kvitare enn med alle dei andre løysningane. At tørrvekta ikkje vart mindre over tid tydar på at aceton/kloroformblandinga ikkje tæra på proteindelen av beinet. Biotex og Zalo fjerna begge meir feitt enn heksan, som såg ut til å vere den dårlegaste avfettingsmetoden (Fig. D2). Dette påverka målingane av mineralinnhaldet kraftig, slik at avfetting med heksan førte til eit mineralinnhald som var ca 10% lågare enn ved avfetting med aceton og kloroform (Fig. D3).



Figur D3: Mineralinnhald (gjennomsnitt \pm S.D) i virvlar avfetta med ulike avfettingsmiddel.

Konklusjon

Aceton/kloroformløysing (2:1 v:v) var den beste avfettingmetoden.