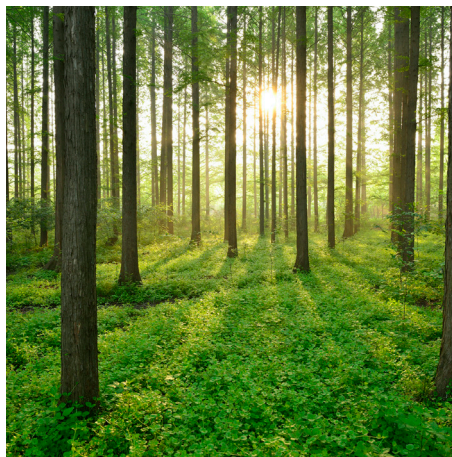
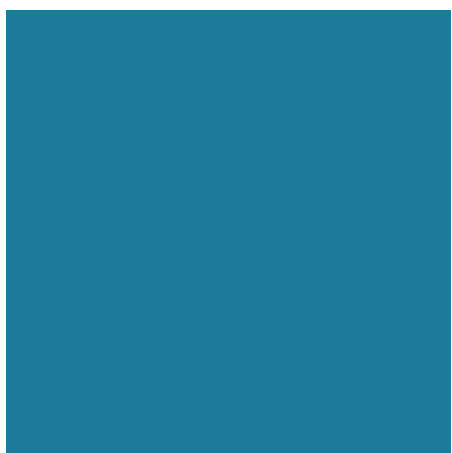


YNGELDÖDLIGHETEN 2023

RAPPORT 2025:1146



VATTENKRAFTENS
KOMPENSATIONSODLING



Yngeldödligheten 2023

Fettsyrasammansättning av fiskfoder
och dess påverkan på fiskhälsa

CAROLINE EK OCH CHARLOTTE AXÉN

ISBN 978-91-89918-53-5 | © Energiforsk mars 2026

Energiforsk AB | Telefon: 08-677 25 30 | E-post: kontakt@energiforsk.se | www.energiforsk.se

Förord

Projektet "Yngeldödligheten 2023 - Fettsyrasammansättning av fiskfoder och dess påverkan på fiskhälsa" har undersökt den överdödlighet av yngel av Atlantlax och havsöring som drabbade flera svenska odlingar under våren och sommaren 2023.

Den här händelsen hade stor påverkan på kompensationsodlingen i Sverige under 2023 och inom Energiforsks program Vattenkraftens kompensationsodling, beslutades det att ett försök att undersöka orsaken bakom överdödligheten behövde göras.

Rapportförfattarna är Caroline Ek från Sveriges Lantbruksuniversitet och Charlotte Axén från Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Referensgruppen bestod av Åke Forssén, Vattenfall, Mikael Lindström, Vattenfall Vattenkraft, Marco Blixt, Fortum, Daniel Axelsson, Statkraft och Thomas Olsson, Vattenregleringsföretagen.

Rapportförfattarna ansvarar för alla resultat och slutsatser i rapporten.

Sammanfattning

Under våren och sommaren 2023 drabbades flera svenska odlingar av Atlantlax och havsöring av en ovanligt hög dödlighet bland yngel – i vissa fall upp till 80 %. Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) kunde utesluta bakterieinfektioner, och i stället visade analyser att fiskarna uppvisade ett tillstånd snarlikt *lipoid liver disease* (LLD), en ämnesomsättningssjukdom kopplad till fettinlagring. En gemensam nämnare för alla drabbade odlingar var att de använt foder från samma leverantör. När fodret byttes ut minskade dödligheten inom en vecka, vilket pekar på en stark koppling mellan fodret och sjukdomen – även om den exakta orsaken ännu inte är helt klarlagd. Man misstänker att obalanser i fodrets fettsyror, särskilt från den feta fisken lodda som använts som råvara, kan ha lett till den komplexa sjukdomsbild och förhöjda dödlighet som rapporterats. Dessutom kan laxyngel från Östersjön redan vara extra känsliga på grund av en känd brist på vitamin B1 (tiamin), vilket påverkar både fettomsättning och nervsystem. Projektet som följde syftar till att förstå hur foder, näringsbrister och skillnader mellan laxpopulationer samverkar.

Genom två försök vid SLU:s försöksdjursanläggningar (Fiskeriförsöksstationen i Älvkarleby samt Norrfors, Umeå) exponerades totalt 3900 laxyngel från tre olika laxpopulationer (Dalälvslox, Göta älvslox och Umelax) för försöksfodret (F23) som orsakat den höga dödligheten 2023, samt två kontrollfoder från 2023 (K23) respektive 2024 (K24). För Dalälvslox och Umelax delades yngel upp i högtiamin (HT) respektive lågtiamin (LT) grupper utifrån halter av tiamin i rommen. Dödlighet och sjukdom noterades och fiskar provtogs kontinuerligt för histopatologiska undersökningar samt för analyser av fettsyror och antioxidativ kapacitet.

Resultaten visade på en signifikant högre dödlighet för F23 fodret jämfört med de två kontrollfodren. Vidare fanns en signifikant skillnad i dödligheten mellan laxpopulationer där Umelaxen drabbades i högre utsträckning än Dalälvslox och Göta älvslox. Oberoende av laxstam (Dalälvslox och Umelax) fanns en signifikant effekt av tiaminnivå, där en högre nivå verkar ha ökat dödligheten i studien.

Fettsyrasammansättningen i yngel och foder visade på signifikanta skillnader av framför allt en fettsyra – Erukasyra (C22:1 cis 13). En betydande effekt av Erukasyra är påverkan på lipidmetabolismen och ökad oxidativ stress. Utvärderingar av intag av antioxidativ kapacitet via foder som mikronäringsämnen (selen och E-vitamin) visade att alla foder innehöll likvärdiga nivåer till trots att fisken 2023 uppvisat symtom överensstämmande med E-vitaminbrist. Analysresultat för astaxantin och karotenoider i yngel var svårtolkade men visade på mönster som tyder på högre antioxidativ kapacitet för Dalälvslox jämfört med Umelax, något som skulle kunna förklara skillnaden i dödlighet mellan populationerna.

Summerat visar studien på en tydlig koppling mellan det försöksfoder som resulterade i en hög dödlighet 2023 och den dödlighet som rapporterats i denna studie. De histopatologiska undersökningarna kunde verifiera att förändringar på organ-nivå varit desamma som 2023. Även om studien påvisade betydande skillnader i dödlighet mellan Umelax och Dalälvslox respektive Göta älvslox är det

oklart varför. Låga tiaminnivåer har inte påverkat sjukdomsförloppet negativt. Tvärtom verkar ett ökat tillskott av tiamin eventuellt kunna ge en högre dödlighet. Däremot har tiaminnivåer inte bidragit till den övergripande sjukdomsbilden orsakad av fodret då det gett upphov till skador på alla stammar (Umelax, Dalälvslox och Göta älvslax). Analyser av fettsyrsammansättningen i både foder och yngel indikerar att Erukasyra som finns både naturligt i rapsolja samt även lodda kan vara en orsakande faktor till sjukdomsförloppet. Huruvida de höga halterna Erukasyra samspelat med en lägre antioxidativ kapacitet i fodret är oklart men inte helt osannolikt då fodret innehöll lägre halter av flera antioxidanter och framför allt A-vitamin.

Nyckelord

Yngeldödlighet

Lax

Fettsyrsammansättning

Histopatologiska undersökningar

Lipoid liver disease

Antioxidativ kapacitet

Tiamin

Erukasyra

Summary

During the spring and summer of 2023, several Swedish hatcheries rearing Atlantic salmon (*Salmo salar*) and sea trout (*Salmo trutta*) experienced unusually high mortality rates among fry – in some cases up to 80%. The Swedish Veterinary Agency (SVA) ruled out bacterial infections, and analyses instead revealed that the fish showed symptoms consistent with lipoid liver disease (LLD), a metabolic disorder associated with erroneous lipid accumulation. A common factor among all affected hatcheries was that they had used feed from the same supplier. When the feed was replaced, mortality rates dropped within a week, indicating a strong link between the feed and the disease – although the exact cause has not yet been fully determined. Imbalances in the feed's fatty acid composition, particularly related to the fatty fish capelin (*Mallotus villosus*) used as a raw material, are suspected to have contributed to the complex disease patterns and elevated mortality reported. Furthermore, Baltic salmon fry may already be particularly vulnerable due to a known deficiency of vitamin B1 (thiamine), which affects both fat metabolism and the nervous system. The ensuing project aimed to understand how feed composition, nutritional deficiencies, and differences between salmon populations interact.

Through two experiments conducted at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) laboratory animal facilities (the Fisheries Research Station in Älvkarleby and Norrfors, Umeå), a total of 3900 salmon fry from three different salmon populations/rivers (Dalälven, Göta älv, and Umeälven) were exposed to the experimental feed (F23) associated with the high mortality in 2023, as well as two control feeds from 2023 (K23) and 2024 (K24). For the Dalälven and Ume salmon, fry were divided into high-thiamine (HT) and low-thiamine (LT) groups based on thiamine levels in the eggs. Mortality and disease occurrence were recorded, and fish were continuously sampled for histopathological examinations and analyses of fatty acids and antioxidant capacity.

The results showed a significantly higher mortality rate for the F23 feed compared with the two control feeds. Furthermore, there were significant differences in mortality between the salmon populations, with Ume salmon being more severely affected than Dalälven and Göta älv salmon. Regardless of population (Dalälven and Ume salmon), there was a significant effect of thiamine level, where higher thiamine appeared to increase mortality in the study. The fatty acid composition in fry and feed showed significant differences, particularly for one fatty acid – erucic acid (C22:1 cis 13). A notable effect of erucic acid is its influence on lipid metabolism and increased oxidative stress. Evaluation of antioxidant intake via feed micronutrients (selenium and vitamin E) showed that all feeds contained comparable levels, despite the fact that fish in 2023 displayed symptoms consistent with vitamin E deficiency. Analysis of astaxanthin and

carotenoids in fry was difficult to interpret but showed patterns suggesting higher antioxidant capacity in Dalälven salmon compared with Ume salmon, which could help explain the observed differences in mortality between populations.

In summary, the study demonstrates a clear connection between the experimental feed that caused high mortality in 2023 and the mortality observed in this study. Histopathological examinations confirmed that organ-level changes were consistent with those seen in 2023. Although the study revealed significant differences in mortality between Ume salmon and the other populations (Dalälven and Göta älv salmon), the underlying reason remains unclear. Low thiamine levels did not negatively affect disease progression; on the contrary, increased thiamine supplementation may have been associated with higher mortality. However, thiamine levels did not contribute to the overall disease condition caused by the feed, as all populations (Ume, Dalälven, and Göta älv salmon) showed similar organ damage. Fatty acid composition analyses of both feed and fry indicate that erucic acid – naturally present in rapeseed oil and also in capelin – may be a causative factor in the disease process. Whether the high levels of erucic acid interacted with a lower antioxidant capacity in the feed remains uncertain but not unlikely, since the feed contained lower concentrations of several antioxidants, particularly vitamin A.

Innehåll

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Bakgrund | 9 |
| 1.1 | Syfte | 10 |
| 2 | Genomförande | 11 |
| 2.1 | Foderförsök | 11 |
| 2.1.1 | Delförsök i Älvkarleby fiskeriförsöksstation (FFS)/Brobacken | 11 |
| 2.1.2 | Delförsök i SLU:s försöksanläggning vid Norrfors laxodling | 12 |
| 2.2 | Analyser | 14 |
| 2.2.1 | Mortalitet | 14 |
| 2.2.2 | Histopatologiska undersökningar | 14 |
| 2.2.3 | Fettsyror | 15 |
| 2.2.4 | Selen och Vitamin E | 15 |
| 2.2.5 | Astaxantin och karotenoider | 15 |
| 2.2.6 | Statistik och databearbetning | 15 |
| 3 | Resultat och diskussion | 16 |
| 3.1 | Mortalitet | 16 |
| 3.2 | Histopatologiska undersökningar | 19 |
| 3.3 | Fettsyrasammansättning i foder och yngel | 20 |
| 3.4 | Selen och Vitamin E i foder | 23 |
| 3.5 | Astaxantin och karotenoider i laxyngel | 23 |
| 4 | Sammanfattning | 25 |
| 5 | Referenslista | 26 |
| 6 | Bilaga | 28 |
| 6.1 | Mortalitet | 28 |
| 6.2 | Histopatologiska undersökningar | 29 |
| 6.3 | Fettsyrasammansättning | 32 |
| 6.3.1 | Fettsyrasammansättningen i foder | 32 |
| 6.3.2 | Fettsyrasammansättningen i yngel | 34 |
| 6.4 | Selen och vitamin E | 36 |
| 6.5 | Astaxantin och karotenoider | 37 |

1 Bakgrund

Under 2023 drabbades flera av Sveriges kompensationsodlingar för Atlantlax (*Salmo salar*) och havsöring (*Salmo trutta*), båda arterna av Östersjö-ursprung, av en förhöjd dödlighet på yngel strax efter startutfodring. Dödligheten var generellt högre för lax än havsöring och varierade även mellan odlingar (35-86 %). Prover för bakteriologisk odling togs från flera anläggningar men Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) kunde konstatera att det inte var en bakterieinfektion, vilket är en vanlig orsak till hög yngeldödlighet, som låg bakom utbrotten. SVA tog då prover för histopatologi i en anläggning, och konstaterade att fiskarna led av lipoid liver disease (LLD) eller ett snarlikt tillstånd. LLD är en metabolisk sjukdom som beskrivits vara associerad till härskna fettsyror i fodret eller brist på vitamin E.¹ Prover för histopatologi samlades då in från övriga drabbade anläggningar och diagnosen verifierades (i varierande grad) i samtliga anläggningar och hos både lax och havsöring. När man insåg att enbart odlingar som nyttjade foder från en specifik leverantör var påverkade byttes fodret ut hos de drabbade anläggningarna. I samband med det kunde den förhöjda dödligheten upphävas, oftast inom en vecka. Att det finns en koppling mellan fodret och syndromet är tydlig men om det är den bakomliggande orsaken är inte klarlagt. Vad hände under 2023 när hundratusentals små laxyngel dog i odlingarna och vad kan man göra för att förhindra att detta upprepar sig i framtiden?

Utifrån aktuella observationer från sommaren 2023 och en begränsad mängd fiskar som undersökts av veterinär kunde man dra slutsatsen att fisken sannolikt hade neurologisk påverkan (simmade som korkskruvar) och organpåverkan där framför allt buken var uppsvälld och levern blek och förstörd. Fodret, som härstammar från en väletablerad aktör, baseras till stor del på fiskmjöl där råvaran varierar utefter befintliga fångster. För det aktuella fodret var lodda, som insamlats utanför Island, en betydande råvara. Lodda är en fet fisk med ett varierat fetthinnehåll beroende på säsong och generellt rik på omega 3-fettsyror.² Utifrån den komplexa sjukdomsbilden är en teori att fettsyrasammansättningen i fodret varit i obalans med laxens näringsbehov och förutsättningar. En obalans i fettsyrasammansättningen skulle kunna resultera i ett ökat behov av att metabolisera fettsyror, vilket kräver en stor mängd antioxidanter, och kan på sikt även leda till oxidativ stress.³

Oxidativ stress uppstår när det råder en obalans mellan bildningen av reaktiva syreradikaler och kroppens antioxidativa försvarssystem. Då lipider metaboliseras genom β -oxidering i framför allt mitokondrier sker en naturlig produktion av syreradikaler vilket innebär att ett högre lipidinnehåll, av framförallt omega-3 fettsyror, per definition ger fler fria syreradikaler.⁴ Bildas ett överskott av dessa kan det leda till omfattande skador på biomolekyler såsom lipider, proteiner och DNA. Lipidperoxidation utgör en central mekanism inom oxidativ stress, då den bidrar till cellskada och inflammatoriska processer genom oxidation av membranlipider och efterföljande störningar i cellernas funktion.³ Eftersom tidigare histopatologiska undersökningar från 2023 påvisat tecken på oxidativ stress hos yngel som intagit försöksfodret är det intressant att studera detta vidare som en pusselbit i denna komplexa sjukdomsbild.

¹ Hugh William Ferguson, *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and Their Responses in Disease* (Scotian Press, 2006) 368.

² Margrét Bragadóttir, Heiða Pálmadóttir, and Kristberg Kristbergsson, 'Seasonal Changes in Chemical Composition and Quality Parameters in Capelin (*Mallotus Villosus*)', *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11/3-4 (2002), 87-103.

³ J. R. Sargent, Douglas R Tocher, and J. Gordon Bell, 'The Lipids', in Ronald W Hardy and Sadasivam J Kaushik (eds.), *Fish Nutrition* (3rd edn.: Elsevier Science (USA), 2002), 181-257.

⁴ Ma Kjær et al., 'Dietary N-3 Hufa Affects Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Capacity and Susceptibility to Oxidative Stress in Atlantic Salmon', *Lipids*, 43 (2008), 813-27.

Utifrån undersökningar av laxyngel som intagit försöksfodret under 2023 observerades yngel med muskelpåverkan och ansamling av vätska med förtunnad magsäcksvägg något som bland annat kan förekomma vid brist på vitamin E. En tidigare studie med laxyngel har visat att en kombination av vitamin E och selen är nödvändig för att reducera incidensen av mortalitet under laxyngelns första 6 veckor efter att gulesäcken absorberats.⁵ Den generella symtombilden för yngeln i studien var tydlig stressrespons vid hantering som resulterade i att de sjönk till botten och blev bleka. Externt var de bleka och internt observerades bland annat ascites (bukvätska) som samlats runt organen i buken, gul-orange lever och pylorus. Fiskarna led av anemi och visade tecken på oxidativ stress som man i studien föreslog kunna vara kopplat till lipidperoxidation av subcellulära membran, vilket också påverkat fisken att svimma eller simma onormalt. En del av dessa symptom kan liknas med dem som rapporterats för fisken 2023 även om halten av vitamin E i fodret bör ha varit tillräcklig.⁶ Ett annat alternativ skulle kunna vara en brist på selen i fodret då vitamin E också är starkt kopplat till selen för att aktivera glutathionperoxidase, en enzymatisk antioxidant.⁵ En alternativ hypotes är att det är den generella antioxidativa kapaciteten hos fisken som varit för låg i jämförelse med behoven och därmed gett upphov till oxidativ stress som resulterat i cellskador och sjukdomstillstånd. Denna teori stöds i del av de lägre halter av framför allt vitamin A men även vitamin E och vitamin C som tidigare analyserats i F23 fodret⁶ och som tillsammans utgör en del av gruppen icke enzymatiska antioxidanter (mikronäringsämnen).⁷

Eftersom det livsnödvändiga vitaminet B1 (tiamin) är en central del i metabolismen av fettsyror samt en viktig antioxidant är det också viktigt att förstå hur stor påverkan östersjölaxens generella tiaminbrist har på sjukdomsbilden/-förloppet. Då det finns en teori om att omega 3-fettsyror driver tiaminbristen i lax från Östersjön⁸ är det viktigt att förstå hur dessa två sjukdomsbilder samspelar, om alls. Då dödligheten varierade stort mellan odlingar inom Östersjö-området bör man även utvärdera om det finns populations-specifika skillnader (ex. genetisk disposition, födostrategi, uppväxtområde i Östersjön) i sjukdomsförloppet som framkallats av fodret. Det finns också behov av att jämföra lax som härstammar ifrån västkusten mot östersjöax för att verifiera att detta är en problembild som sträcker sig utanför Östersjön, även om en efterkontroll av fem Göta älvsaxar i oktober 2023, visade på kvarstående likadana leverskador hos två av fiskarna som hos östersjöax.

1.1 SYFTE

Projektet syfte var att utreda ett möjligt orsakssamband mellan fettsyrasammansättningen i fodret och den komplexa sjukdomsbild som resulterade i en ökad dödlighet för lax och havsöring. Utöver fettsyrasammansättning utvärderades även viktiga mikronäringsämnen som proxy för antioxidativ kapacitet. Inom projektet utvärderades dessutom skillnader mellan två laxstammar från Östersjöälvar för att se om det finns tydliga skillnader mellan populationer för att utveckla denna sjukdomsbild, vilket kan förklara den variation i dödlighet som uppvisades mellan odlingar. Tiaminbristen kan vara en bidragande orsak och det är därför viktigt att undersöka om man kan detektera skillnader i dödligheten mellan grupper av avkomma som härstammar från rom med höga tiaminhalter respektive låga tiaminhalter. Vidare undersöktes huruvida de negativa effekterna av fodret inte enbart skulle kunna kopplas till den sämre tiaminstatusen hos lax ifrån Östersjön utan även drabba västkustlax i jämförbar utsträckning.

⁵ Hugh A Poston, Gerald F Combs Jr, and Louis Leibovitz, 'Vitamin E and Selenium Interrelations in the Diet of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*): Gross, Histological and Biochemical Deficiency Signs', *The Journal of nutrition*, 106/7 (1976), 892-904.

⁶ C. Ek, 'Yngeldödligheten 2023 - En Foderstudie', (Stockholm: Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, 2025), 18.

⁷ Klaudia Jomova et al., 'Several Lines of Antioxidant Defense against Oxidative Stress: Antioxidant Enzymes, Nanomaterials with Multiple Enzyme-Mimicking Activities, and Low-Molecular-Weight Antioxidants', *Archives of toxicology*, 98/5 (2024), 1323-67.

⁸ Marja Keinänen et al., 'High Lipid Content of Prey Fish and N-3 Pufa Peroxidation Impair the Thiamine Status of Feeding-Migrating Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) and Is Reflected in Hepatic Biochemical Indices', *Biomolecules*, 12/4 (2022), 526.

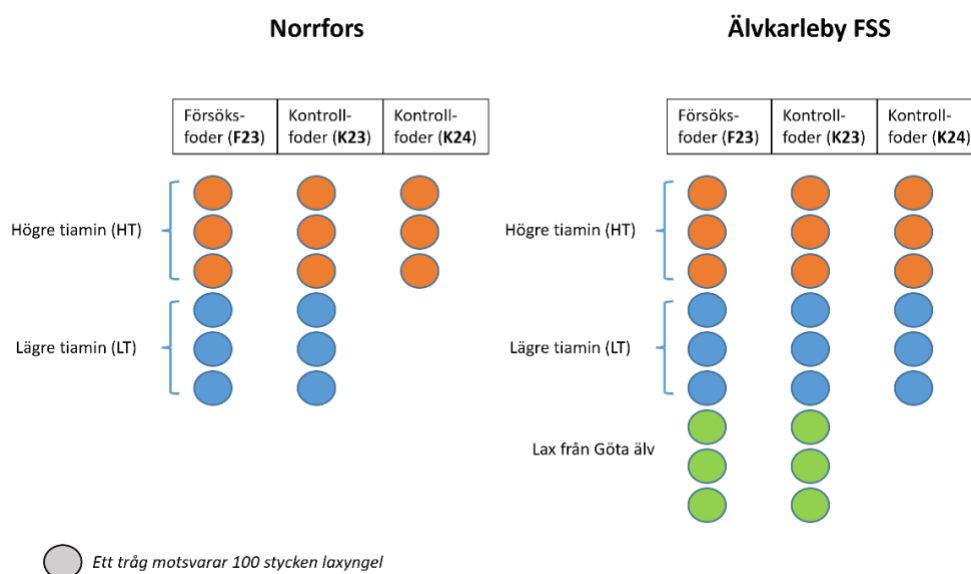
2 Genomförande

2.1 FODERFÖRSÖK

För att kunna uppnå projektets syfte utfördes under vår och sommar 2024 två parallella foderförsök vid olika försöksdjursanläggningar tillhörande Sveriges lantbruksuniversitet (SLU): vid institutionen för akvatiska resurser (Fiskeriförsöksstationen (FFS), Älvkarleby) samt vid institutionen för vilt, fisk och miljö (Norrfors, Umeå). Foderförsöken följde svensk djurskyddslagstiftning och var godkända av Umeå Regionala Djurförsöksetiska nämnd (Dnr. A15-2024).

Fokus för studien var att utvärdera det kommersiellt sålda foder som 2023 antagits gett upphov till den förhöjda dödligheten i odlingarna – Försöksfoder 2023 (F23). Som kontrollfoder nyttjades ett foder från en annan leverantör, också från 2023 (K23), för att säkerställa att eventuella effekter INTE härstammade ifrån att fodret var ett år gammalt utan att problemet låg i fodrets sammansättning. Dessutom inkluderades en grupp som gavs ett kontrollfoder från 2024 (K24) för att utreda vilka effekter som härstammade från att fodret *de facto* var ett år gammalt.

I foderförsöken användes laxyngel som själva intog föda och följdes i olika grupper (F23, K23 och K24) om 100 laxyngel per tråg och tre replikat (tråg) per behandling. Försöket inkluderade tre olika laxstammar (två från Östersjön och en från västkusten). För att bilda behandlingsgrupper grupperades rom från utvalda honor. Honorerna inom respektive laxstam av östersjöläx grupperades utifrån tiamininnehåll i rommen (högt, HT/lågt, LT) för att undersöka om maternell tiaminöverföring skulle ha en effekt. För att begränsa andra utvecklingskillnader mellan grupperna valdes honorerna också ut baserat på romstorlek (Brofeldt) och kramningsdatumet skilde sig inte mer än 2 veckor inom grupperna. Totalt ingick 3900 laxyngel (2400 i Älvkarleby och 1500 i Norrfors) För en schematisk överblick av försöksuppställningen se Figur 1 och för specifika detaljer se nedan för respektive försöksdjursanläggning.



Figur 1. Försöksuppställning för de två parallella foderförsöken vid SLU:s försöksdjursanläggningar vid Norrfors, Umeå och Fiskeriförsöksstationen (FFS), Älvkarleby.

2.1.1 Delförsök i Älvkarleby fiskeriförsöksstation (FFS)/Brobacken

Kläckeriet och odlingen drivs av Institutionen för akvatiska resurser (SLU) och producerar smolt av östersjöläx och öring av Dalälvsursprung, för kompensationsutsättningar i Dalälven. Ny avelsfisk tas in varje år och består i huvudsak av lekfisk med ursprung i anläggningen, som satts ut som smolt och

återvänder från havet och fångas under sin uppvandring. Avelsfiskarna utgörs nästan enbart av kompensationsuppfödd fisk och den konstgjort befruktade rommen förvaras i en separat anläggning fram till kläckning och övergång från gulesäcksyngel till yngel. Fram till försökets början hölls fisken enligt normalt förfarande i odlingens kläckeri.

Behandlingsgrupper

I Älvkarleby klassades 20 honor i LT-gruppen och 16 honor i HT-gruppen inför försöket. Tiaminhalten varierade mellan 1.21 och 2.14 nmol totaltiamin per gram rom i LT-gruppen samt mellan 2.79 och 5.59 nmol totaltiamin per gram rom i HT-gruppen. För att få tillräckligt med fisk i HT-gruppen tilläts romstorleken (Brofeldts skala) variera mer än i de andra grupperna, mellan 39 och 43, medan den i LT-gruppen var 40–42 med en hona som hade 43. Kramningsdatum i HT-gruppen var mellan 30 oktober och 6 november, och i LT-gruppen mellan 14 november och 20 november. I april samlades hundra romkorn från varje hona i respektive grupp och blandades i en behållare för HT-gruppen och en för LT-gruppen. I Älvkarleby inkluderades även en försöksgrupp med rom från lax med Göta älv-ursprung. Denna rom hämtades från kläckeriet Västanå i Älvkarleby den 5 maj (rommen kom ursprungligen från kompensationsanläggningen Olidan i Trollhättan). Ingen information om tiaminnehållet i denna rom fanns tillgänglig och rom från flera honor hade redan blandats. De tre romgrupperingarna (HT Dalälvslox, LT Dalälvslox samt Göta älvslax) användes sedan för att bilda experimentgrupper i separata kläckningsbrickor. Det fanns nio brickor från varje tiamingrupp med Dalälvslox samt sex brickor med rom från Göta Älv. Efter absorption av gulesäcken flyttades ynglen till experimentkar och utfodring påbörjades (den 27 maj 2024).

Försöksuppställning

Totalt ingick 2400 laxyngel i delförsöket (1800 Dalälvslox och 600 Götaälvslox). Ynglen hölls i 24 fyrkantiga tråg med en vattenvolym på ca 250 L (100 laxyngel per tråg).

Varje tråg hade eget in- och utflöde av vatten samt ett separat fodertillförselsystem kopplat till automatisk utfodring. Utfodring med 0.5 mm pellets påbörjades omedelbart efter överföring från kläckningsanläggningarna och skedde *ad libitum* då fodersystemet ej var dimensionerat för det lilla antal fiskar som användes. Karen kontrollerades dagligen och antal döda fiskar samt sjuka individer som avlivades noterades. Efter cirka fyra veckor (den 20 juni) tillsattes pellets av större storlek (0.8 mm) till automaterna och blandades med mindre pellets (0.5 mm) en period innan övergång till enbart större pellets.

Provtagning

Fisk provtogs med jämna mellanrum under hela försöket för senare analys (dag: start, 5, 10, 15, 25, 36, 68, se även Tabell 1). Vid provtagningsstillfällena valdes fem fiskar från varje kar och avlivades. Fiskar som uppvisade avvikande beteende, t.ex. tecken på dålig hälsa, prioriterades för provtagning. Utöver eventuella sjuka fiskar valdes fiskar slumpmässigt för provtagning. Redan döda fiskar inkluderades inte. Fiskarna avlivades genom ett hårt slag mot huvudet och tre fiskar placerades direkt i tre separata provrör och förvarades på torris tills de kunde flyttas till en frys på -80°C för långtidslagring. Två fiskar från varje kar fixerades i formalin. För att formalinet skulle tränga in ordentligt i bukorganen, gjordes ett litet snitt genom bukväggen.

Vid det sista provtagningsstillfället den 2 augusti, avslutades försöket. Fisk som fått något av kontrollfodren återfördes till Brobackens fiskodlings yngelhall. Fisk som fått försöksfoder avlivades med en överdos av Tricaine pharmaq (MS222).

2.1.2 Delförsök i SLU:s försöksanläggning vid Norrfors laxodling

SLU:s försöksdjuranläggning sitter ihop med yngelhallen i Norrfors laxodling, strax utanför Umeå i norra Sverige. Odlingen drivs av Vattenfall Vattenkraft AB och producerar smolt av östersjölax och öring av

Ume-/Vindelälvsstam för kompensationsutsättningar i Umeälven. Ny avelsfisk tas in varje år och består i möjligaste mån av vildfödd Vindelälvsfisk (biflöde till Umeälven) som återvänder från havet och fångas under sin uppvandring i eller nedströms fiskvägen vid regleringsdammen i Norrfors. Vid brist på vildfödd avelsfisk tas även fisk med ursprung i anläggningen med i avelsarbetet. Lekfisken kramas i oktober/november och den konstgjort befruktade rommen förvaras i en separat anläggning fram till kläckning och absorption av gulesäcken. Vid övergång från gulesäcksyngel till yngel flyttades fisk för denna studie till odlingskar i forskningslaboratoriet och utfodring påbörjades (den 11 juni). I denna studie nyttjades enbart laxyngel ifrån Ume-/Vindelälvsstammen då enbart älvsegen fisk är tillåten att hållas inom Norrfors anläggning och därmed också på SLU:s försöksdjursanläggning. Härefter benämns denna stam enbart som Umelax.

Behandlingsgrupper

I Norrfors fanns det 17 honor i respektive HT/LT-grupp, och tiaminhalten i rommen varierade mellan 1.16 och 2.20 nmol totaltiamin per gram rom i låghaltgruppen, samt mellan 3.00 och 4.82 nmol totaltiamin per gram rom i höghaltgruppen. Romstorleken varierade mellan 40 och 42 (Brofeldts skala).

I april samlades hundra romkorn från varje hona i respektive grupp och blandades i en behållare vardera för HT- respektive LT-gruppen. Dessa rombatcher användes sedan för att bilda experimentgrupper i separata kläckningsbrickor som senare flyttades till experimentkar, en bricka per kar. I Norrfors fanns det 9 brickor med rom från höghaltgruppen och 6 brickor från låghaltgruppen. Om rom eller yngel med gulesäck dog innan överföring till experimentkar, ersattes de med rom från respektive blandbatch. Gulesäcksyngel i Norrfors behandlades med tiamin enligt standardprocedur (se nedan). Fem gånger mellan den 20 maj och 5 juni behandlades yngel med gulesäck i Norrfors med tiamin (standardprocedur vid många svenska kläckerier för att motverka eventuell tiaminbrist). Under behandlingen stängdes vattenflödet till kläckningsbrickorna av och en tiaminlösning tillsattes till vattnet för att uppnå en koncentration på 0,5 g/l vatten. Efter 1 timme återstartades vattenflödet.

Försöksuppställning

Totalt ingick 1500 laxyngel i försöket i 15 cirkulära tråg med en diameter på ca 1 m, med en vattenvolym på ca 250 L (100 laxyngel per tråg).

Varje tråg hade sitt eget in- och utflöde av vatten samt ett separat fodertillförselsystem kopplat till automatisk utfodring. Utfodring påbörjades omedelbart efter överföring från kläckningsanläggningarna och skedde *ad libitum* då fodersystemet ej var dimensionerat för det lilla antal fiskar som användes. Karen kontrollerades dagligen och antal döda fiskar samt sjuka individer som avlivades noterades, och överblivet foder avlägsnades för att hålla god vattenkvalitet. Efter cirka fyra veckor tillsattes foder av större storlek (0.8 mm) till automaterna och blandades med 0.5 mm foder en period innan allt foder utgjordes av 0.8 mm foder. Detta skedde den 9 juli i Norrfors.

Provtagning

Fisk provtogs under hela försöket för senare analys (dag: start, 15, 29, 36, 43, 50, 57, se även Tabell 1). Vid provtagningstillfällena valdes fem fiskar slumpmässigt från varje kar och avlivades. Fiskar som uppvisade avvikande beteende, t.ex. tecken på dålig hälsa, prioriterades vid provtagning. Redan döda fiskar inkluderades inte. Fiskarna avlivades genom ett hårt slag mot huvudet och tre fiskar placerades direkt i tre separata provrör och förvarades på torris tills de kunde flyttas till en frys på -80°C för långtidslagring. Två fiskar från varje kar fixerades i formalin. För att formalinet skulle tränga in ordentligt i bukorganen, gjordes ett litet snitt genom bukväggen.

Vid det sista provtagningstillfället, den 6 augusti i Norrfors, avslutades försöket och återstående fiskar kontrollräknades. Fisk som fått något av kontrollfodren återfördes till Norrfors anläggning. Fisk som fått försöksfoder avlivades med en överdos av Tricaine pharmaq (MS222).

Tabell 1. Översikt över provtagningstillfällen, kronologisk tid (dag) och temperaturrelaterad tid (dygnsgrader) för de två olika försöksdjursanläggningarna.

| Provtagningstillfälle | Dag (Norrfors) | Dag (FFS) | Dygnsgrader (Norrfors) | Dygnsgrader (FFS) |
|-----------------------|-------------------|--------------|---------------------------|----------------------|
| 1 (Start) | 1 | 1 | 15 | 17 |
| 2 | 15 | 5 | 244 | 93 |
| 3 | 29 | 10 | 506 | 195 |
| 4 | 36 | 15 | 639 | 289 |
| 5 | 43 | 25 | 780 | 468 |
| 6 | 50 | 36 | 929 | 694 |
| 7 (Avslut) | 57 | 68 | 1063 | 1339 |

2.2 ANALYSER

2.2.1 Mortalitet

Sannolikheten för överlevnad inom de olika behandlingarna (fodertyperna), populationerna samt hög respektive låg tiaminhalt i rommen visualiserades genom Kaplan-Meier överlevnadskurvor. Data analyserades statistiskt både genom mixed-effekt Cox-regressioner samt genom Aalen-additiv-modeller för att kunna utvärdera relevanta kovariat. De två modellerna förutsätter olika riskkvoter som kan vara endera multiplikativ (Cox regression) eller additiv (Aalen additiv modell). Ynglen i samma tråg förutsätts vara mer lika varandra än yngel i olika tråg (klustring), och effekten anses slumpmässig. Av de två modellerna ger enbart Cox-regression utrymme för att testa slumpvisa effekter. Därför tillämpades båda modellerna och en sammantagen bedömning gjordes därefter.⁹

2.2.2 Histopatologiska undersökningar

Syftet med de histopatologiska undersökningarna var att 1) verifiera att försöksfodret (F23) framkallade samma patologiska förändringar som 2023, samt att utreda sjukdomsförloppet 2) i förhållande till exponeringstid, 3) i förhållande till tiaminstatus och 4) i förhållande till laxstam. Totalt 90 fiskar genomgick histopatologiska undersökningar vid SVA, uppdelade på olika laxpopulationer samt hög och låg tiaminnivå (HT/LT).

De helkroppsfixerade ynglen placerades i kassetter (i de sena provtagningarna fick huvudet kapas bort för att ynglen skulle få plats) som preparerades rutinmässigt för histopatologisk undersökning genom en serie dehydreringssteg och xylene-behandling, inbäddning i paraffin, snittning i längsgående vertikal riktning i tre olika nivåer/plan genom kroppen, med tre snitt per nivå. Snitten placerades på objektglas, rehydrerades samt färgades med Hematoxylin Eosin (HE, standard), Periodic Acid Schiff (PAS, färgar polysackarider) eller Ziehl Neelsen (ZN, syrafast färgning). Samtliga dessa färgningar användes vid diagnosställandet 2023, där ceroidliknande vätska (bildas vid felaktig fettoxidation) kunde observeras i HE-färgning samt var positiv för PAS men negativ för ZN. Slutligen lades ett täckglas på och förseglades mot objektglaset. Läsning av snitten gjordes i ljusmikroskop vid 40–400 x förstoring. Histopatologen var vid den första omgången bedömningar ovetande om/blind för vilken behandlingsgrupp de undersökta fiskarna tillhörde, och hade bara tillgång till id på respektive tråg samt vilken provtagning fisken tillhörde. Därefter utvärderades resultaten utifrån behandlingsgrupp och strategin för vidare undersökningar lades upp (se under resultat).

⁹ Emel Başar, 'Aalen's Additive, Cox Proportional Hazards and the Cox-Aalen Model: Application to Kidney Transplant Data', *Sains Malaysiana*, 46/3 (2017), 469-76.

2.2.3 Fettsyror

För att studera ett möjligt orsakssamband mellan fettsyrasammansättningen i fodret och den komplexa sjukdomsbilden analyserades fria respektive bundna fettsyror i både foder (totalt 21 prover) och i fiskyngel (totalt 60 prover). För foder analyserades tre replikat per fodertyp och storlek som använts i foderförsöket samt två gånger tre replikat av försöksfodret (F23) för att analysera fodret från båda försöksdjursanläggningarna.

Provberedning av homogenat av foder samt helkroppshomogenat av fiskyngel gjordes med hjälp av en homogenisator (13 000 rpm, ULTRA-TURRAX® T 25 basic, IKA®-WERKE) och vägdes upp till 20 mg och förvarades i eppendorfrör i -80°C i väntan på analys. Proverna analyserades vid Swedish Metabolomics Centre, Umeå. Utvärdering av resultat för bundna och fria fettsyror hos foder och yngel skedde med hjälp av principalkomponentanalys (PCA) och där skillnader mellan grupper utvärderades statistiskt genom parvisa jämförelser mellan grupper (PERMANOVA) samt genom Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA). Fettsyrasammansättningen i foder analyserades både individuellt med avseende på fodertyp (F23, K23 och K24) och storlek (0.5 mm, 0.8 mm, 0.5-1.0 mm) samt grupperat på enbart de tre fodertyperna (F23, K23 och K24).

2.2.4 Selen och Vitamin E

Foderprover vägdes upp (150 g per prov) från alla tre foderbehandlingar (F23, K23 och K24) och skickades med frystransport till Finska livsmedelsverket (Ruokavirasto) för analys av selen och vitamin E.

2.2.5 Astaxantin och karotenoider

Analyser av astaxantin och karotenoider som proxy för antioxidativ kapacitet analyserades i laxyngel och utfördes av Livsmedelsverket (SLV). För att nå en tillräcklig stor provmängd (ca 1 gram) gjordes samlingsprov av 2–9 individer per prov. Provberedning av homogenat av fiskyngel gjordes med hjälp av en homogenisator (13 000 rpm, ULTRA-TURRAX® T 25 basic, IKA®-WERKE) och provmängden noterades och förvarades i eppendorfrör i -80°C i väntan på analys.

Fiskar från försökets startpunkt analyserades från alla tre populationer och för både hög- och lågtiamingrupper (n=5) samt från dag 36 (694 respektive 929 dygnsgrader för Norrfors och FFS) från enbart högtiamingrupper som fått F23-foder (Dalälvslox och Umelax samt även från K23 för Umelax (n=9).

2.2.6 Statistik och databearbetning

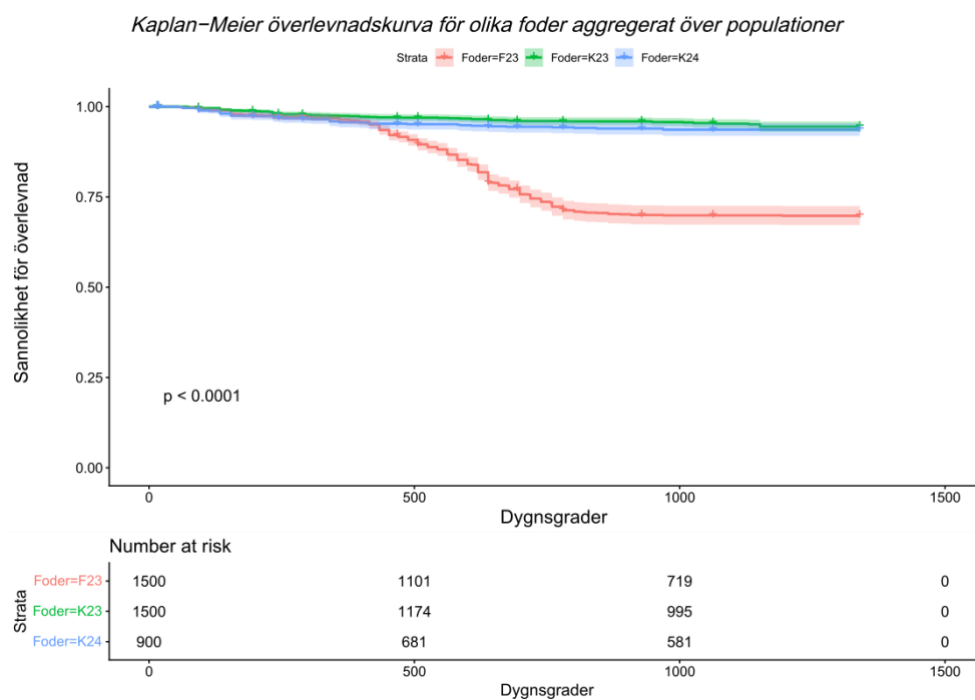
Alla statistiska figurer och analyser utfördes i statistikprogrammet R.¹⁰ Signifikans nivån sattes till $\alpha=0.05$.

¹⁰ R Core Team, 'R: A Language and Environment for Statistical Computing', (R version 4.5.1 "Great Square Root" edn.; Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing, 2025).

3 Resultat och diskussion

3.1 MORTALITET

Det fanns ett mycket starkt signifikant samband mellan behandling (fodertyp) och dödlighet, vilket syntes både på Kaplan-Meier-kurvorna och i den statistiska modellen för dödlighet där båda kontrollfodren signifikant ($p < 0.0001$) minskade risken att dö jämfört med fiskar som fått försöksfodret (F23) (Figur 2 och Tabell 2).

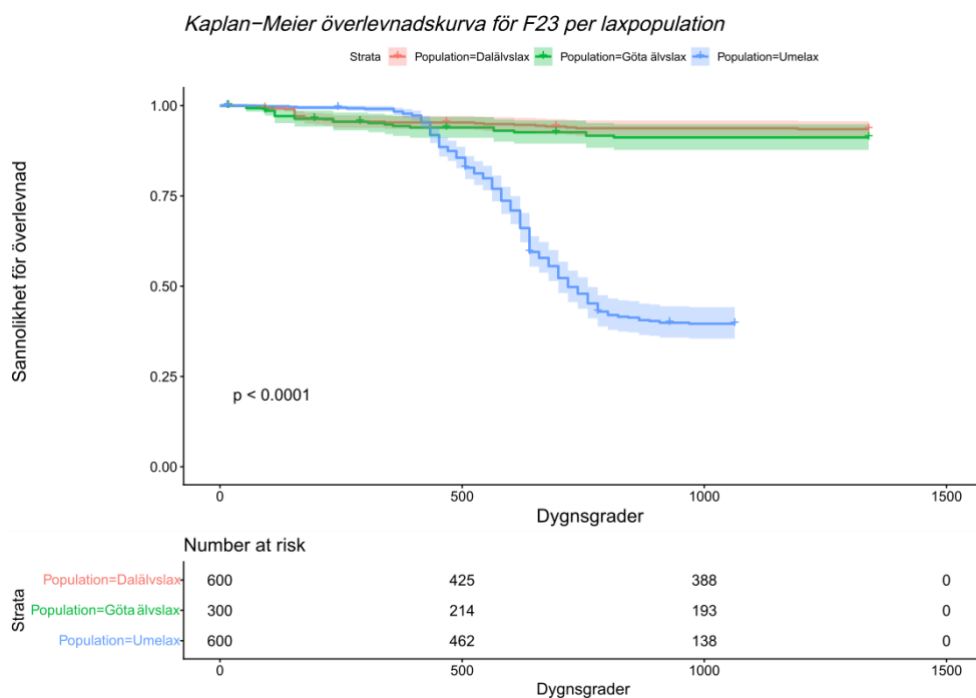


Figur 2. Kaplan-Meier överlevnadskurva för olika foder aggregerat över populationer. Strata visar antal individer som fortfarande lever (beräknat utifrån både provtagna och sjuka/döda individer) samt hur snabbt överlevnaden minskar i en grupp jämfört med en annan.

Tabell 2. Resultat från Aalens additiv modell för modellering av mortalitet, med fodertyp som exponeringsfaktor. Fodertyp F23 användes som referensvariabel, dvs. man ser mortaliteten i grupperna K23 och K24 i förhållande till mortaliteten i grupp F23. Koefficient motsvarar en riskökning per dygnsgrad som läggs till den basala risken (intercept).

| Behandling | Koefficient | Standardfel | z-värde | p-värde |
|------------|-------------|-------------|---------|---------|
| Intercept | 0.00071 | 3.73E-05 | 19 | <0.0001 |
| K23 | -0.000604 | 4.06E-05 | -14.9 | <0.0001 |
| K24 | -0.00057 | 4.38E-05 | -13 | <0.0001 |

Inom fodertyp F23 fanns dessutom betydande skillnader i mortalitet mellan de olika laxpopulationerna (Tabell 33 och Figur 3). En modelljämförelse visade att tillägget av en slumpmässig variabel, tråg, förbättrar modellen signifikant ($\chi^2=13.79$, $p < 0.0002$) och att det fanns skillnader mellan tråg som påverkade överlevnaden. Umelax hade en 12 gånger högre risk för dödlighet ($p < 0.0001$) jämfört referenspopulationen som i detta fall är Dalälvslox, sett över hela studieperioden. Ingen signifikant skillnad i överlevnad fanns mellan Dalälvslox och Göta älvslox ($p=0.42$).



Figur 3. Kaplan-Meier överlevnadskurva för enbart F23 foder för olika laxpopulationer. Strata visar antal individer som fortfarande lever (beräknat utifrån både provtagna och sjuka/döda individer) samt hur snabbt överlevnaden minskar i en grupp jämfört med en annan.

Tabell 3. Resultat från en Cox-regression med slumpmässig effekt av tråg för modellering av mortalitet enbart för fodertyp F23, med population som exponeringsfaktor. HR: riskkvot. 95% CI nedre-övre: motsvarar det 95% konfidensintervall för riskkvoten.

| Parameter | Log-koefficient | HR | 95% CI nedre | 95% CI övre | p-värde |
|--------------|-----------------|-----|--------------|-------------|---------|
| Göta älvslox | 0.30 | 1.4 | 0.65 | 2.83 | 0.423 |
| Umelax | 2.47 | 12 | 6.83 | 20.37 | <0.0001 |

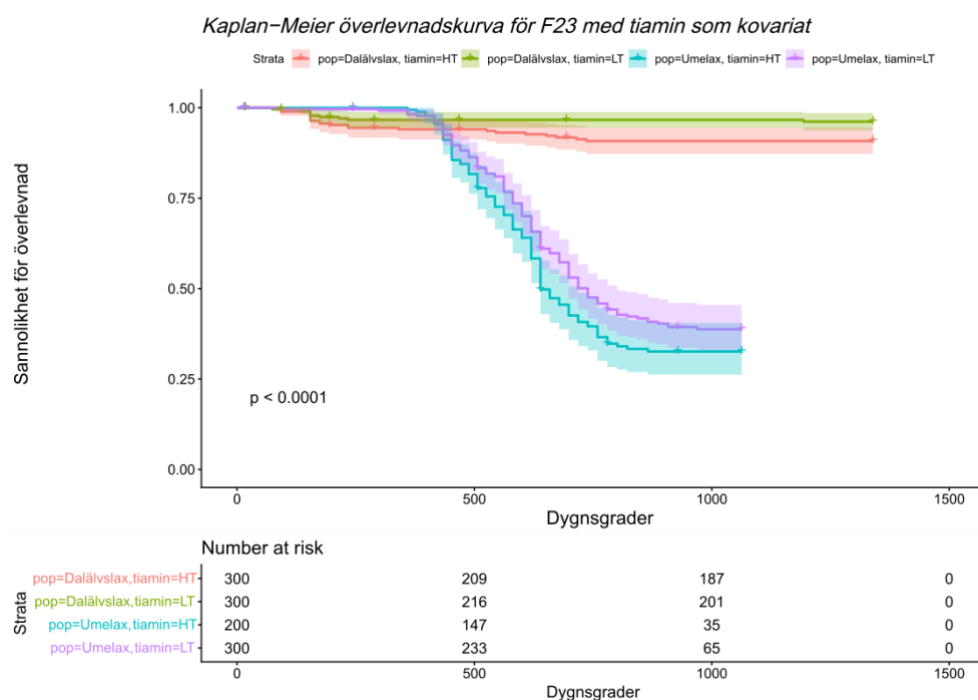
Slumpmässig effekt av tråg: $SD = 0.36$ ($Var = 0.13$)

Inom behandling F23 utvärderades även om mortaliteten påverkades av tiaminhalten samt om det fanns en interaktionseffekt med population (laxstam) och en slumpmässig effekt av tråg. En Cox-modell visade förutom en signifikant effekt av tråg ($p < 0.001$), en ökad riskkvot för Umelax (jämfört med Dalälvslox) samt att det fanns en signifikant effekt av tiaminnivå och där dödligheten var lägre vid lägre halter av tiamin i rommen (Tabell 4 och Figur 4). Däremot saknades det en signifikant interaktionseffekt ($p = 0.09$). Eftersom modellen inte håller för antagandet av proportionella (multiplikativa) risker för populationseffekter samt för interaktionseffekten utfördes även Aalens additiv modell som ett komplement. Denna modell visade på likartade resultat för populationseffekter ($p < 0.0001$), tiamin ($p = 0.01$) och interaktionseffekter ($p = 0.44$) (Tabell 5). För att visualisera effekten av den slumpmässiga variabeln tråg på dödligheten och olika tiaminnivåer illustreras även individuella trågs riskkvot där man ser en stor spridning inom framför allt hög tiamingruppen med både väldigt låg riskkvot (tråg 16, Umelax) och väldigt hög riskkvot (tråg F2, Dalälvslox) vilket kan tyda på att effekten av tiamin är en artefakt från framför allt tråg F2 med Dalälvslox (**Error! Reference source not found.**), även om Cox-regressionen i del ska ta hänsyn till detta.

Antaget att det finns en signifikant effekt av tiaminnehåll på överlevnaden vid intag av F23 så är den mekanistiska förklaringen till detta oklar. Ingen publicerad studie har återfunnits som påvisat en koppling med förhöjd dödlighet vid högre tiaminhalter. Däremot finns en äldre studie där fettlever inducerats i råttor med tiaminbrist som fått tiamintillskott.¹¹ Studien visade bland annat på fettförändringar i levern i

¹¹ R. W. Engel and Ph. Phillips, 'Fatty Livers as a Result of Thiamin Administration in Vitamin B1 Deficiency of the Rat and the Chick: Four Figures', *The Journal of Nutrition*, 18/4 (1939), 329-38.

jämförelse med kontrollgruppen. Fettlever i sig kan generera ökad lipidperoxidering¹² vilket skulle kunna försvåra ett sjukdomsförlopp redan kopplat till oxidativ stress. Detta är rent hypotetiskt men skulle kunna förklara skillnader mellan populationer i denna studie då Umelax till skillnad från Dalälvslox och Göta älvslox badats i tiamin som gulsäcksyngel och därmed kunna fått ett överskott av tiamin. Möjliga andra förklaringar till påvisade skillnader mellan, men även inom, populationer skulle kunna vara kopplade till maternell överföring av antioxidanter ifrån olika födosöksområden i Östersjön/Västerhavet och/eller ålder på återkommande honor d.v.s. tiden ute till havs innan lekperioden som skulle kunna påverka mängden antioxidanter till honan och i förlängningen deras avkomma.



Figur 4. Kaplan-Meier överlevnadskurva för enbart F23 foder för olika laxpopulationer med tiamin som kovariat. Strata visar antal individer som fortfarande lever (beräknat utifrån både provtagna och sjuka/döda individer) samt hur snabbt överlevnaden minskar i en grupp jämfört med en annan.

Tabell 4. Resultat från en Cox-regression med slumpmässig effekt av tråg för modellering av mortalitet enbart för fodertyp F23, med population och tiamin som exponeringsfaktorer samt interaktionseffekt. Dalälvslox samt HT användes som referensvariabler i modellen. HR: riskkvot. 95% CI nedre-övre: motsvarar det 95% konfidensintervall för riskkvoten.

| Parameter | Log-koefficient | HR | 95% CI nedre | 95% CI övre | p-värde |
|-----------|-----------------|------|--------------|-------------|---------|
| Umelax | 2.11 | 8.29 | 4.41 | 15.58 | <0.0001 |
| LT | -0.87 | 0.42 | 0.18 | 1.00 | 0.0502 |
| Umelax:LT | 0.88 | 2.41 | 0.88 | 6.55 | 0.086 |

Slumpmässig effekt av tråg: $SD = 0.28$ ($Var = 0.08$)

Tabell 5. Resultat från Aalens additiv modell för modellering av mortalitet enbart för fodertyp F23, med population och tiamin som exponeringsfaktorer samt interaktionseffekt. Dalälvslox samt HT användes som referensvariabler i modellen. Koefficient motsvarar en riskökning per dygnsgrad som läggs till den basala risken (intercept).

| Parameter | Koefficient | Standardfel | z-värde | p |
|-----------|-------------|-------------|---------|---|
|-----------|-------------|-------------|---------|---|

¹² Ze Chen et al., 'Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 152 (2020), 116-41.

| | | | | |
|-----------|-----------|----------|-------|---------|
| Intercept | 3.23E-04 | 6.73E-05 | 4.8 | <0.0001 |
| Umelax | 2.09E-03 | 2.09E-04 | 10 | <0.0001 |
| LT | -1.96E-04 | 7.82E-05 | -2.51 | 0.01 |
| Umelax:LT | 2.27E-04 | 2.93E-04 | 0.776 | 0.44 |

3.2 HISTOPATOLOGISKA UNDERSÖKNINGAR

De specifika resultaten per foder, tiaminstatus, tråg och individ finns i Tabell S1 och exempelbilder på patologin finns i Figur S2 och S3 i bilagan. Vid de histopatologiska undersökningarna utgick vi till att börja med från en tidpunkt när hög dödlighet uppstått, för att säkerställa att det fanns potentiell klinisk sjukdom att koppla patologin till, och till att börja med undersöktes enbart Umelax eftersom det var i det delförsöket högst dödlighet noterats. Provtagning 4 (dag 36/639 dygnsgrader) valdes därför som utgångspunkt. I fem kar, hos åtta av tio fiskar, identifierades ceroid i levern och njurskador i enlighet med den patologi som sågs 2023 (Figur S2 och S3) och dessa kar kategoriserades som sjuka. De två kvarvarande fiskarna i två kar samt en fisk från ytterligare ett kar hade antingen förekomst av förändringar i njuren eller lite ceroid i HE-färgningen men ingen ceroid i PAS-färgningen. Det sista karet kategoriserades därmed som misstänkt sjukt. Generellt hade fiskar med ceroid en lägre grad av normal vakuolisering i levercellerna än de som var misstänkt sjuka eller bedömdes som friska. I övriga tolv kar noterades inga förändringar motsvarande patologin 2023. Den normala vakuoliseringsgraden var generellt hög, och ett flertal fiskar uppvisade tecken på leverförfettning, sannolikt orsakad av den fria tillgången på foder. När data avseende behandling lades till de histopatologiska resultaten var det uppenbart att det enbart var fisk i kategorin F23 som uppvisade patologi samstämmig med 2023. Efter detta konstaterande valde vi att enbart gå vidare med ytterligare histopatologiska undersökningar på F23-fisk. För att undersöka hur snabbt förändringarna i levern och njuren uppstod efter startutfodring undersöktes även de tidigare provtagningarna (vid start (dag1/15 dygnsgrader, 15 dagar/244 dygnsgrader och 29 dagar/506 dygnsgrader) för Umelaxen i gruppen F23. Förändringarna kunde observeras vid provtagning 3 (506 dygnsgrader) i fyra av de sex F23-karen, där sex av åtta fiskar hade tydlig patologi och två hade misstänkta förändringar. I ett kar hade båda fiskarna misstänkta förändringar. Detta var samma kar som noterades som misstänkt i undersökningen för dag 36. I ett kar som hade tydlig patologi vid 639 dygnsgrader noterades båda fiskarna vid 506 dygnsgrader som friska. För fiskarna som provtagits vid 15 respektive 244 dygnsgrader noterades inga patologiska förändringar. I fisk från de tre första provtagningarna noterades en varierande grad av gulesäcksrester i fiskarna. Det fanns ingen uppenbar skillnad i utveckling av patologi mellan fisk från HT respektive LT-gruppen. Samtidigt genomfördes histopatologi på F23-laxen från Älvkarleby, med utgångspunkt i motsvarande antal dagar (36 dagar men 694 dygnsgrader) som för den primära histopatologiska analysen av Umelaxen. Hos Dalälvsaxen noterades då motsvarande patologi som 2023 i fyra av sex F23-kar, och hos fem av de åtta laxarna i dessa kar. Övriga laxar i dessa fyra kar var misstänkt sjuka, likaså var båda laxarna i det femte karet och en av laxarna i det sjätte karet misstänkt sjuka. Hos Göta älvslaxen noterades vid samma tidpunkt misstänkt patologi hos båda fiskarna i ett kar, och inga tecken på patologi men däremot tecken på överutfodring hos fisken i två kar. Baserat på detta valde vi att titta framåt i tiden i stället för bakåt i tiden på Älvkarlebyfisken, vilket innebar provtagningspunkt 7 vid försökets avslut (dag 68 /1339 dygnsgrader). Av Dalälvsaxen undersöktes då två LT-kar och två HT-kar från F23, varav tre hade tydlig patologi (i två kar på båda fiskarna, i ett kar tydlig patologi på en fisk samt ingen patologi på en fisk). I det fjärde karet noterades ingen patologi på de provtagna fiskarna, men patologi hade noterats för provtagning nr 6 så vi visste att det fanns en effekt i det karet också. För Götaälvslaxen uppvisade två kar (alla fyra fiskar) tydlig patologi och ett kar (båda fiskarna) misstänkt patologi vid detta tillfälle. Hos Älvkarlebyfisken (båda laxstammarna) var den normala vakuoliseringsgraden i levernarna hög med undantag för ett fåtal individer, som dessutom inte uppvisade tecken på att vara drabbade av ceroid-inlagring.

Vi kunde alltså konstatera att de histopatologiska förändringar som observerades vid det misstänkt foderrelaterade utbrottet 2023 kunde återskapas i försöket. Patologin i levern blev dock inte lika omfattande (inte lika höggradiga förändringar) som 2023, inte ens i de grupper som drabbades av hög dödlighet i försöket (Norrfors F23). Detta kan vara associerat till att vi 2023 enbart provtog yngel som var döende. Även om de yngel som provtogs i detta försök i första hand skulle vara yngel med symptom på sjukdom är det inte säkert att sjukdomen var i ett så avancerat stadium att de var döende, eller att de ens visade tecken på sjukdom. Oavsett så kunde vi här visa att patologin enbart var associerad till det foder som misstänktes vara orsak till sjukdom 2023. Lipoid liver disease orsakar inlagring av ceroid, en felaktig nedbrytningsprodukt från fettmetabolismen, i vakuoler i levercellerna. Ceroid beskrivs som ljusrosa i HE, samt positiv i färgningarna PAS och ZN.¹ Den ceroid vi observerade 2023 avvek från detta genom att den var negativ i ZN, vilket kan indikera att nedbrytningsprodukten inte är klassisk ceroid men en liknande, felaktig nedbrytningsprodukt. Att använda samtliga tre färgningar även i foderförsöket 2024 blev därmed viktigt för att visa att det var samma ceroid som 2023 om patologi skulle påvisas.

3.3 FETTSYRASAMMANSÄTTNING I FODER OCH YNGEL

För fodret fanns en signifikant skillnad i sammansättning av fria fettsyror mellan behandlingar ($p < 0.003$) och där parvisa jämförelser visade att det fanns signifikanta skillnader både mellan F23 och K24 ($p < 0.003$) och K23 och K24 ($p < 0.033$) (Figur S 4). Däremot sågs ingen signifikant skillnad mellan F23 och K23 ($p < 0.249$). F23 och K23 visade båda på en generellt högre mängd av fria fettsyror jämfört med K24 vilket skulle kunna vara en indikation på en tidseffekt. Detta då nedbrytning av framför allt triglycerider och fosfolipider till fria fettsyror sker genom hydrolys, en process som kan påverkas av förvaringstid, temperatur samt enzymatisk aktivitet.¹³ En tidigare publicerad studie har visat att hydrolyserade lipider (fria fettsyror) kan ha negativa effekter hos fisk¹⁴, däremot finns inga bevis för att en ökad mängd fria fettsyror skulle gett upphov till den komplexa sjukdomsbilden vi observerat. Detta stöds av att både F23 och K23 uppvisar samma mönster i fria fettsyror utan att båda fodren orsakat problem. Eftersom dessa resultat indikerar att det finns en tidseffekt av att F23-fodret var ett år gammalt vid foderförsöket bör resultat framför allt jämföras med K23-foder för att kunna utvärdera effekter utöver de orsakade av förvaringstid.

Även för bundna fettsyror fanns en signifikant effekt mellan behandlingar ($p < 0.001$). Här sågs signifikanta skillnader mellan både F23 och K23 ($p < 0.039$) och F23 och K24 ($p < 0.003$), däremot inte mellan K23 och K24 ($p = 0.79$) (Figur S 7). Detta indikerar att det fanns en tydlig skillnad i bundna fettsyror mellan försöksfodret och de två kontrollfodren. För att gå vidare och mer i detalj utreda hur fettsyrasammansättningen skilde sig mellan F23 och kontrollerna (K23+K24) utfördes en OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) där K23 och K24 samanalyserades för att minska antalet grupper. Generellt förklarade modellen gruppskillnader extremt bra ($R^2Y = 0.99$) och även den prediktiva förmågan var bra ($Q^2 = 0.98$). Permutationstest för kontroll av slump-effekter visade att modellen var robust ($Q^2 > pQ^2$) (Tabell 6 och Figur S 8). Dock ska nämnas att eftersom denna OPLS-DA endast innehöll 21 prover varav fler kan antas vara pseudoreplikat av samma foder bör resultaten egentligen verifieras i en större studie, även om det inte är möjligt i detta fall.

Tabell 6. Översikt av OPLS-DA för att modellera skillnader i bundna fettsyror mellan F23 och kontrollfoder (K23+K24). R^2X (cum): Kumulativ andel av variationen i X-matrisen (oberoende variabler) som modellen förklarar, R^2Y (cum): Kumulativ andel av variationen i Y-matrisen (beroende variabler) som modellen förklarar, Q^2 : Kumulativ förklaringsgrad i prediktion (korsvalidering), RMSEE: Root Mean Square Error of Estimation (modellens fel vid anpassning), pR^2Y : proportion av permuterade modeller som har högre R^2Y än ursprungliga modellen, pQ^2 : roportion av permuterade modeller som har högre Q^2 än ursprungliga modellen.

| Modell | R^2X (cum) | R^2Y (cum) | Q^2 (cum) | RMSEE | Prediktiva komp. | Ortogonal komp. | pR^2Y | pQ^2 |
|--------|--------------|--------------|-------------|-------|------------------|-----------------|---------|--------|
|--------|--------------|--------------|-------------|-------|------------------|-----------------|---------|--------|

¹³ María Dolores Suárez-Medina et al., 'The Effect of Low Temperature Storage on the Lipid Quality of Fish, Either Alone or Combined with Alternative Preservation Technologies', *Foods*, 13/7 (2024), 1097.

¹⁴ Øystein Sæle et al., 'Toxic Effects of Dietary Hydrolysed Lipids: An in Vivo Study on Fish Larvae', *British journal of nutrition*, 109/6 (2013), 1071-81.

| | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|--------|---|---|------|------|
| Total | 0.915 | 0.987 | 0.978 | 0.0636 | 1 | 3 | 0.01 | 0.01 |
|-------|-------|-------|-------|--------|---|---|------|------|

Bland de viktigaste fettsyrorerna för att separera dessa grupper återfanns flera enkelomättade fettsyror där de tre viktigaste var Gadoljesyra, Erukasyra och Nevronsyra (Figur 5). Nevronsyra är en av de primära fettsyrorerna i sfingolipider för nervvävnad och är viktig för hjärnans utveckling och funktion.¹⁵ Gadoljesyra eller eikodensyra är en viktig komponent i Arakidonsyra (ARA) som är en essentiell omega-3 fettsyra för fisk och spelar en viktig roll för fisken tillväxt, immunologi och reproduktion.¹⁶ Därtill fungerar även ARA som en prekursor ("föregångare") till eikosanoider som reglerar olika biologiska processer hos fisken.¹⁷ Erukasyra är en omega-9 fettsyra som förekommer i framför allt växter från Brassicaceae-släktet (kålväxter, raps m.m.) och där de högsta halterna har hittats i rapsolja.¹⁸ Då rapsolja innehåller en hög andel omättade fettsyror och har flera hälsofrämjande fördelar nyttjas oljan ofta som ett substitut till fiskolja i fiskfoder då den finns i stora mängder (tredje mest producerade växtolja i världen), är billig och innehåller ett högt näringsvärde.¹⁹ Däremot har det visat sig att Erukasyra i för höga nivåer kan ge upphov till en rad allvarliga effekter i olika djurslag inklusive fisk.^{20,21,22} Framförallt verkar Erukasyra kunna påverka fiskens lipidmetabolism vilket har setts hos flertal arter, bland annat hos svart karp (*Mylopharyngodon piceus*)²⁰ och Niltilapia (*Oreochromis niloticus*)²². Detta har i sin tur gett upphov till en ökad fettackumulering i fisken då genuttryck kopplat till lipofagi, lipolys och β -oxidering reducerats samtidigt som genuttryck för triglyceridsyntes ökat. Som en naturlig följd av en ökad fettackumulering har även lipidperoxidering ökat och resulterat i oxidativ stress i flera av de publicerade studierna.^{20,21,22}

¹⁵ Ghulam Hussain et al., 'Role of Cholesterol and Sphingolipids in Brain Development and Neurological Diseases', *Lipids in health and disease*, 18/1 (2019), 26.

¹⁶ Wm Nimal Ratnayake and Claudio Galli, 'Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism', *Annals of nutrition & metabolism*, 55/1/3 (2009), 8-43.

¹⁷ Alan R Brash, 'Arachidonic Acid as a Bioactive Molecule', *The Journal of clinical investigation*, 107/11 (2001), 1339-45.

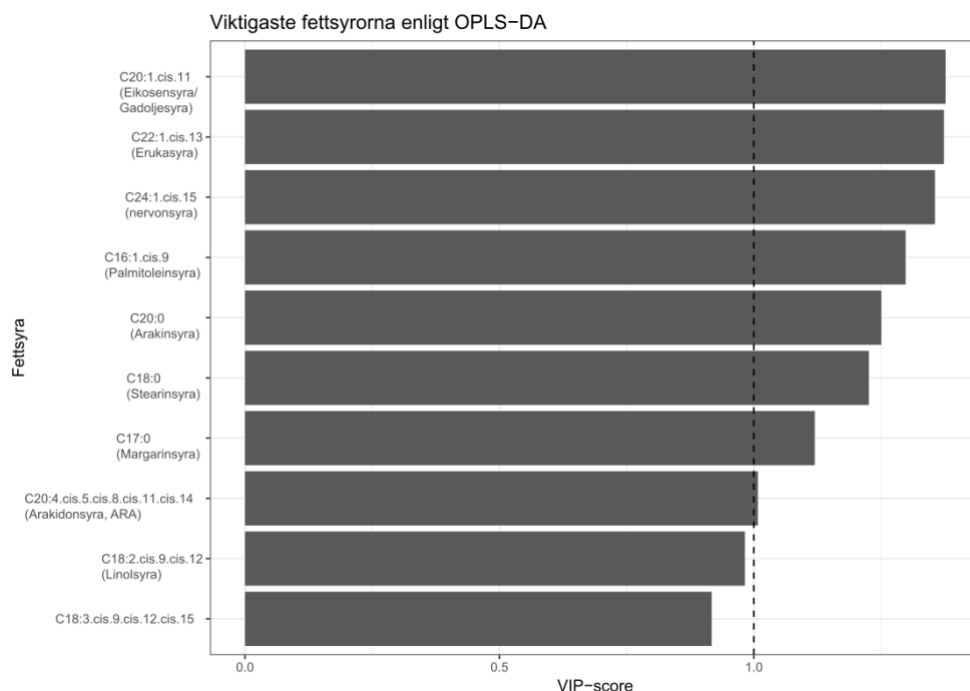
¹⁸ Agnieszka Galanty et al., 'Erucic Acid – Both Sides of the Story: A Concise Review on Its Beneficial and Toxic Properties', *Molecules*, 28/4 (2023), 1924.

¹⁹ Junjun Shen et al., 'A Comprehensive Review of Health-Benefiting Components in Rapeseed Oil', *Nutrients*, 15/4 (2023), 999.

²⁰ Yan Liu et al., 'High Levels of Erucic Acid Cause Lipid Deposition, Decreased Antioxidant and Immune Abilities Via Inhibiting Lipid Catabolism and Increasing Lipogenesis in Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*)', *Animals*, 14/14 (2024), 2102.

²¹ Dingfei Ma et al., 'Dietary Erucic Acid Induces Fat Accumulation, Hepatic Oxidative Damage, and Abnormal Lipid Metabolism in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)', *Aquaculture Nutrition*, 2024/1 (2024), 6670740.

²² Hua Mu et al., 'Effects of Replacement of Dietary Fish Oil by Rapeseed Oil on Growth Performance, Anti-Oxidative Capacity and Inflammatory Response in Large Yellow Croaker *Larimichthys crocea*', *Aquaculture Reports*, 16 (2020), 100251.



Figur 5. Modellerade viktigaste bundna fettsyrorerna som separerar F23 från kontrollfodren (K23+K24) enligt OPLS-DA (Tabell 6). VIP; Variable Importance in Projection.

För fettsyrasammansättningen i yngel, med fokus på dag 36, sågs en signifikant skillnad mellan behandlingar ($p < 0.01$) för de fria fettsyrorerna. Parvisa jämförelser visade att den var signifikant mellan F23 och K24 ($p < 0.05$) men inte mellan F23 och K23 ($p = 0.9$) eller mellan K23 och K24 ($p = 0.5$). Dock så finns en trend i PC2 att det är en ökad mängd fria fettsyror av framför allt C20:1 cis 11 (Gadoljesyra) och C22:1 cis 13 (Erukasyra) i F23-yngel jämfört med K23-yngel och framför allt K24-yngel (Figur S 9). För de bundna fettsyrorerna fanns däremot ingen signifikant skillnad ($p = 0.1$) i fettsyrasammansättningen för yngel som fått olika fodertyper (Figur S 10), även om ett liknande mönster för PC2 sågs även för denna grupp av fettsyror. I tidigare studier där man exponerat fisk för en koncentrationsgradient av Erukasyra har man i lever och muskel detekterat signifikant högre halter av Erukasyra men också av Gadoljesyra.^{20,21} Sammantaget överensstämmer fettsyrasammansättningen (fria och bundna) för F23-yngel i del med en högre mängd Erukasyra i dess foder vilket skulle kunna indikera att denna fettsyra kan vara orsaken till sjukdomsförloppet. Skillnader i halter (ng/mg) av fri och bunden Erukasyra i foder respektive i yngel utvärderades statistiskt genom t-test. Resultaten visade genomgående signifikant högre halter för F23 fodret eller för F23-exponerade yngel jämfört med respektive kontrollgrupp (K23+K24) (Tabell 7). Man ska dock vara medveten om att analysen innehåller pseudo-replikat då analyser av fettsyrasammansättningen gjorts i tripletter av samma foderbatch.

Tabell 7. Resultat från t-test för att jämföra halter av mellan fri och bunden Erukasyra (C22:1 cis 13) i yngel och foder. Grupp: F23 och kontroll (K23+K24). Medel: aritmetiskt medelvärde, SD: standardavvikelse; df: frihetsgrader; p: sannolikhetsvärde. Halter uttrycks i ng/mg prov.

| Matris | Erukasyra | Grupp | Medel | SD | t | df | p |
|--------|-----------|----------|-------|------|-----|------|-------|
| Yngel | Fria | F23 | | 208 | 112 | | |
| | | Kontroll | | 149 | 103 | 2.14 | 57.63 |
| | Bundna | F23 | | 1806 | 735 | | |
| | | Kontroll | | 971 | 579 | 3.46 | 26.56 |

| Foder | | | | | | |
|----------|------|------|------|-------|---------|--|
| Fria | | | | | | |
| F23 | 549 | 104 | | | | |
| Kontroll | 249 | 84.3 | 7.29 | 18.84 | <0.0001 | |
| Bundna | | | | | | |
| F23 | 7626 | 1587 | | | | |
| Kontroll | 4177 | 1813 | 4.55 | 15.99 | <0.001 | |

3.4 SELEN OCH VITAMIN E I FODER

Analyser av selen och vitamin E i foder visade inte på några skillnader i halter av vare sig vitamin E eller selen utan alla tre fodertyper visade på likvärdiga nivåer (**Error! Reference source not found.**). Att ynglen visat tecken på vitamin E brist under 2023 kan därför innebära att den generella antioxidativa kapaciteten varit påverkad vilket dränerat flera viktiga vitaminer och mikronäringsämnen och gett upphov till sekundära bristeffekter. En tidigare studie har visat att Lipoid liver degeneration/disease kan botas med tillsats av vitamin E eller vitamin E och selen i fodret.²³ De halter som användes var synbart lägre än de som uppmätts i denna studie, men våra värden är baserade på torrsubstans i jämförelse med våtvikt i studien, så det är oklart hur jämförbara de är.

3.5 ASTAXANTIN OCH KAROTENOIDER I LAXYNGEL

Analyser av astaxantin och karotenoider kräver en betydande provmängd hos kommersiella analyslaboratorier varför flera individer samanalyserades. Trots detta var det flera prover där inga mätvärden kunde påvisas vilket gör det svårt att dra större slutsatser utifrån de halter som ändå uppmätts. Däremot finns ett mönster som tyder på att det sannolikt var högra halter av astaxantin-derivat och karotenoider dag 36 i Dalälvlax jämfört med Umelax, framför allt för Lutein och Zeaxantin men också för β -kryptoxantin och β -karoten (Astaxantin och karotenoider). Detta skulle kunna vara en delförklaring till varför Dalälvlaxen klarat sig bättre än Umeälvlaxen i foderförsöket. Att Umelaxen helt saknar astaxantin och många av de karotenoider som analyserats och är potenta antioxidanter skulle kunna tolkas som en låg antioxidativ kapacitet hos den laxstammen. Sannolikt som ett resultat av hög produktion av fria syreradikaler från lipidperoxidering från en ökad och skev fettinlagring, vilken skiftat balansen och gett upphov till oxidativ stress i linje med de histopatologiska undersökningarna som utförts. De låga astaxantin-nivåerna skulle även kunna vara en sekundär effekt av låga A-vitamin nivåer i fodret då astaxantin kan fungera som ett provitamin A.²⁴ Även om så är fallet, saknas ändå viktiga antioxidanter hos fisken vilket ger samma slutresultat – oxidativ stress. Undersökningar har visat att lodda kan innehålla låga halter av vitamin A.²⁵ Till skillnad från många andra fiskarter med högt vitamin A innehåll, som gör att fiskmjöl och foder naturligt kan innehålla höga halter av vitamin A²⁶, kan ett fiskmjöl baserat på lodda förklara de låga halter som observerats i försöksfodret och därmed generera en lägre antioxidativ kapacitet. Detta ger i sin tur ytterligare stöd till hypotesen att det är fettsyrasammansättningen i fodret som kan ha påverkat fisken negativt i F23 behandlingen då kopplingen mellan fettinnehåll och antioxidativ kapacitet är betydande. Tidigare studier där fisk exponerats för en koncentrationsgradient av Erukasyra har oxidativa skador påvisat i lever²¹ samt nedreglering (uttömt) av genuttryck för de enzymatiska antioxidativa försvaret och ökning av väteperoxid (ROS).²⁰ Summerat innebär detta att Erukasyra sannolikt kan ge upphov till ett betydande påslag av ROS i fisk och ställer krav på proportionerlig antioxidativ

²³ So Roald, 'An Outbreak of Lipoid Liver Degeneration (Lld) in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) in a Fish Farm and Attempts to Cure the Disease (Author's Transl)', *Nordisk Veterinärmedicin*, 28/4-5 (1976), 243-49.

²⁴ R Christiansen, Ø Lie, and Oj Torrissen, 'Effect of Astaxanthin and Vitamin a on Growth and Survival During First Feeding of Atlantic Salmon, *Salmo Salar* L', *Aquaculture Research*, 25/9 (1994), 903-14.

²⁵ B Asbjørnsen, 'Vitamin a-Og E-Innhold I Fiskemel Fra Forskjellige Raastoffslag', *Meldinger fra SSF*, (1988).

²⁶ B Grisdale-Helland, Sj Helland, and T Åsgård, 'Problems Associated with the Present Use of Menadione Sodium Bisulfite and Vitamin a in Diets for Atlantic Salmon', *Aquaculture*, 92 (1991), 351-58.

kapacitet. Eftersom resultat från dessa tidigare studier överensstämmer med de från vår studie kan Erukasyra i botten var orsaken till den förhöjda dödlighet och komplexa sjukdomsbild som påvisats 2023 och sedan igen i de aktuella foderförsöken. Utöver detta finns även en publicerad studie som tyder på att lodda kan innehålla högre halter av erukasyror under delar av året, framförallt vårsäsongen, då det kan motsvara närmare 20% av den totala mängden uppmätta fettsyror.²

4 Sammanfattning

Denna studie har visat på ett tydligt samband mellan det försöksfoder som resulterade i en förhöjd dödlighet 2023 och den dödlighet som rapporterats i denna studie. Vidare har histopatologiska undersökningar verifierat att förändringarna på organ-nivå varit desamma under foderförsöket som under 2023. Även om studien visat på tydliga effekter av population på utfallet så är det oklart vad som påverkat den vitt skilda dödligheten mellan Umelax och Dalälvslox respektive Göta älvslox. Låga tiaminnivåer har i sig inte visat sig påverka sjukdomsförloppet negativt, i stället kan ett ökat tillskott av tiamin eventuellt kunna ge högre dödligheten. Däremot har tiaminhalter inte bidragit till den övergripande sjukdomsbilden orsakad av själva fodret, då det gett upphov till skador på alla laxfiskar (Umelax, Dalälvslox och Göta älvslox). Skadorna kan kvarstå månader efter upphört intag (baserat på kunskap från Göta älvslox från 2023) och eventuellt vara irreversibla. Analyser av fettsyrsammansättningen i både foder och yngel indikerar att Erukasyra som finns både naturligt i höga halter i rapsolja samt även i lodda kan vara en orsakande faktor till sjukdomsförloppet. Huruvida de höga halterna Erukasyra samspelas med en lägre antioxidativ kapacitet i fodret är oklart men inte helt osannolikt då fodret innehöll lägre halter av flera antioxidanter och framför allt A-vitamin. Vill man gå vidare och verifiera denna hypotes kan man dels mäta genuttryck i kvarvarande fiskar från denna studie då tidigare studier tydligt påvisat hur olika gener kopplade till lipidmetabolism upp- respektive nedregleras som en effekt av ökat intag av Erukasyra. Man kan också mäta lipidperoxidering och det enzymatiska antioxidativa systemet i yngel vilket kräver analyskompetens utöver kommersiella laboratorium.

Tack

Denna studie har finansierats av Energiforsks forskningsprogram Vattenkraftens kompensationsodling (projekt VKU20012). Projektet hade inte varit möjligt att genomföra utan stöd från personal vid SLU:s båda försöksdjursanläggningar vid Norrfors laxodling, Umeå och Fiskeriförsöksstationen i Älvkarleby. Tack även till Vattenfall Vattenkraft AB för hjälp med bakgrundsinformation om sjukdomsförloppet 2023 och personalen vid SVA:s histopatologiska laboratorium för arbetet med prepareringen av alla histopatologiska snitt samt till personal vid SLU:s institutionen för akvatiska resurser för diskussioner kring statistisk bearbetning av data.

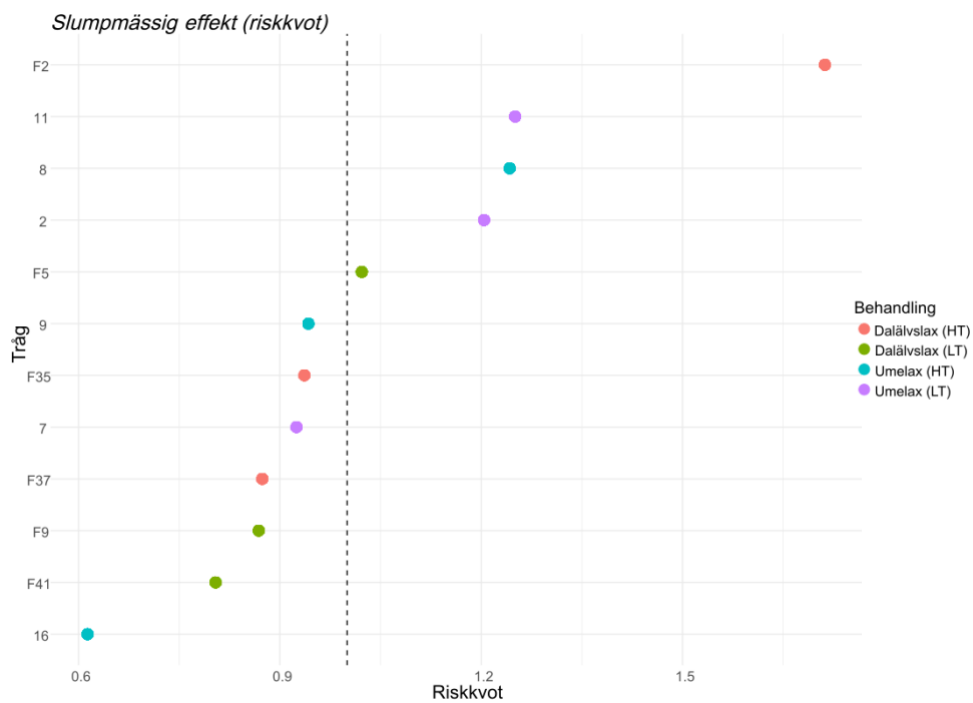
5 Referenslista

- Asbjørnsen, B (1988), 'Vitamin A-og E-innhold i fiskemel fra forskjellige raastoffslag', *Meldinger fra SSF*.
- Başar, Emel (2017), 'Aalen's additive, cox proportional hazards and the Cox-Aalen Model: Application to kidney transplant data', *Sains Malaysiana*, 46 (3), 469-76.
- Bragadóttir, Margrét, Pálmadóttir, Heiða, and Kristbergsson, Kristberg (2002), 'Seasonal changes in chemical composition and quality parameters in capelin (*Mallotus villosus*)', *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11 (3-4), 87-103.
- Brash, Alan R (2001), 'Arachidonic acid as a bioactive molecule', *The Journal of clinical investigation*, 107 (11), 1339-45.
- Chen, Ze, et al. (2020), 'Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 116-41.
- Christiansen, R, Lie, Ø, and Torrissen, OJ (1994), 'Effect of astaxanthin and vitamin A on growth and survival during first feeding of Atlantic salmon, *Salmo salar* L', *Aquaculture Research*, 25 (9), 903-14.
- Ek, C. (2025), 'Yngeldödligheten 2023 - en foderstudie', (Stockholm: Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet), 18.
- Engel, RW and Phillips, PH (1939), 'Fatty Livers as a Result of Thiamin Administration in Vitamin B1 Deficiency of the Rat and the Chick: Four Figures', *The Journal of Nutrition*, 18 (4), 329-38.
- Ferguson, Hugh William (2006), *Systemic pathology of fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease* (Scotian Press) 368.
- Galanty, Agnieszka, et al. (2023), 'Erucic acid—both sides of the story: a concise review on its beneficial and toxic properties', *Molecules*, 28 (4), 1924.
- Grisdale-Helland, B, Helland, SJ, and Åsgård, T (1991), 'Problems associated with the present use of menadione sodium bisulfite and vitamin A in diets for Atlantic salmon', *Aquaculture*, 92, 351-58.
- Hussain, Ghulam, et al. (2019), 'Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases', *Lipids in health and disease*, 18 (1), 26.
- Jomova, Klaudia, et al. (2024), 'Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants', *Archives of toxicology*, 98 (5), 1323-67.
- Keinänen, Marja, et al. (2022), 'High Lipid Content of Prey Fish and n-3 PUFA Peroxidation Impair the Thiamine Status of Feeding-Migrating Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Is Reflected in Hepatic Biochemical Indices', *Biomolecules*, 12 (4), 526.
- Kjær, MA, et al. (2008), 'Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid β -oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon', *Lipids*, 43, 813-27.
- Liu, Yan, et al. (2024), 'High Levels of Erucic Acid Cause Lipid Deposition, Decreased Antioxidant and Immune Abilities via Inhibiting Lipid Catabolism and Increasing Lipogenesis in Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*)', *Animals*, 14 (14), 2102.
- Ma, Dingfei, et al. (2024), 'Dietary Erucic Acid Induces Fat Accumulation, Hepatic Oxidative Damage, and Abnormal Lipid Metabolism in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)', *Aquaculture Nutrition*, 2024 (1), 6670740.
- Mu, Hua, et al. (2020), 'Effects of replacement of dietary fish oil by rapeseed oil on growth performance, anti-oxidative capacity and inflammatory response in large yellow croaker *Larimichthys crocea*', *Aquaculture Reports*, 16, 100251.
- Poston, Hugh A, Combs Jr, Gerald F, and Leibovitz, Louis (1976), 'Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs', *The Journal of nutrition*, 106 (7), 892-904.
- R Core Team (2025), 'R: A language and environment for statistical computing', (R version 4.5.1 "Great Square Root" edn.; Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing).
- Ratnayake, WM Nimal and Galli, Claudio (2009), 'Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism', *Annals of nutrition & metabolism*, 55 (1/3), 8-43.
- Roald, SO (1976), 'An outbreak of lipoid liver degeneration (LLD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a fish farm and attempts to cure the disease (author's transl)', *Nordisk Veterinærmedicin*, 28 (4-5), 243-49.
- Sæle, Øystein, et al. (2013), 'Toxic effects of dietary hydrolysed lipids: an in vivo study on fish larvae', *British journal of nutrition*, 109 (6), 1071-81.
- Sargent, J. R., Tocher, Douglas R, and Bell, J. Gordon (2002), 'The lipids', in Ronald W Hardy and Sadasivam J Kaushik (eds.), *Fish nutrition* (3rd edn.: Elsevier Science (USA)), 181-257.

- Shen, Junjun, et al. (2023), 'A comprehensive review of health-benefiting components in rapeseed oil', *Nutrients*, 15 (4), 999.
- Suárez-Medina, María Dolores, et al. (2024), 'The effect of low temperature storage on the lipid quality of fish, either alone or combined with alternative preservation technologies', *Foods*, 13 (7), 1097.

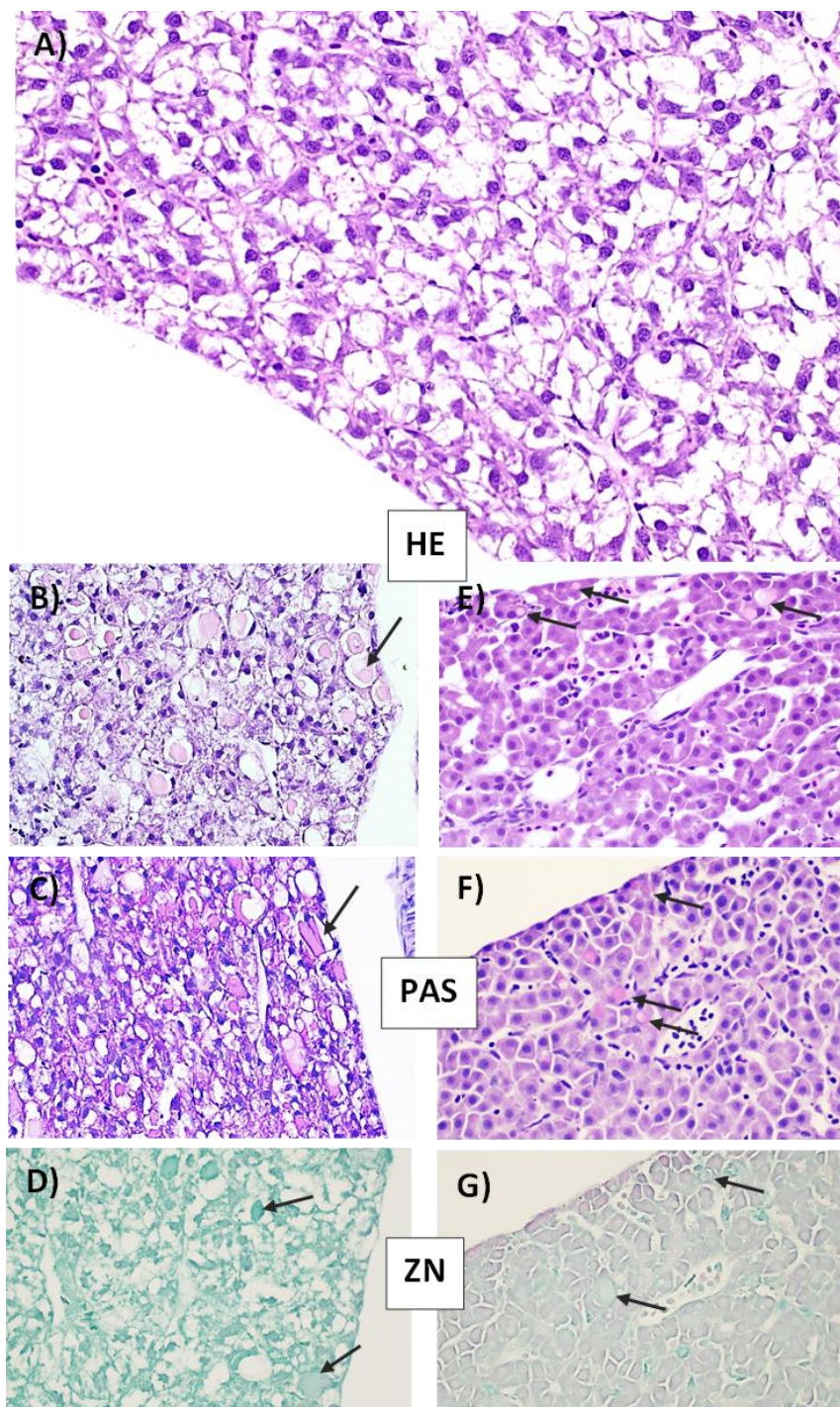
6 Bilaga

6.1 MORTALITET

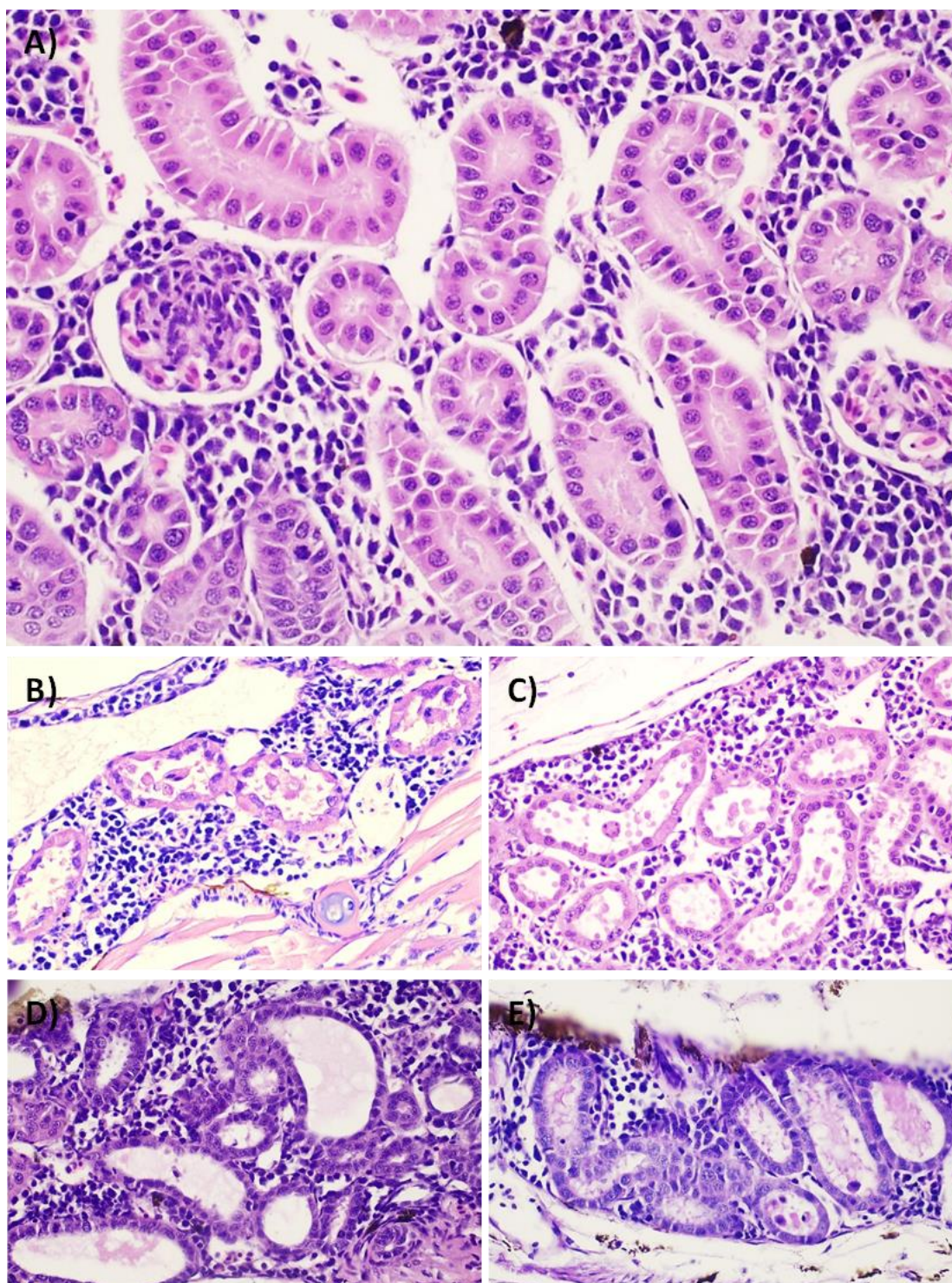


Figur S 1. Resultat av slumpmässig effekt av tråg för modellering av mortalitet enbart för fodertyp F23, med population och tiamin som exponeringsfaktorer samt interaktionseffekt (Tabell 4). HT: högtiamin, LT: lågtiamin.

6.2 HISTOPATOLOGISKA UNDERSÖKNINGAR



Figur S 2. Figur S 2. A) Lever med kraftig vakuolisering utan ceroid, fisk från K23 HT, 639 dygnsgrader, HE. Pilar i bilderna pekar mot ceroidgranula. B-D) HE, PAS och ZN av lever från ett av ynglen med omfattande patologiska förändringar 2023. Levern är mycket ojämnt vakuoliserad. I HE noteras ljusrosa vätskeansamlingar (ceroid) i levervakuolerna. I PAS färgar dessa vakoler rosa (=PAS-positivt) mot cellernas blåliga grundton, och i ZN saknas infärgning (kraftigt rödrosa=positiv) mot den gröna grundfärgen. E-G) HE, PAS och ZN av lever från fisk i F23 LT, 506 dygnsgrader. Levercellerna saknar nästan helt vakuolisering, men en måttlig förekomst av små vakuoler med ceroid kan ses. I ZN färgade levercellerna in diffust (rosa ton), vilket är en artefakt, men ceroiden var inte kraftigare infärgad än levercellerna och därmed är ceroiden ZN-negativ. Färgtonen mellan bilderna varierar något även när samma infärgning använts, vilket kan bero på något olika infärgningstid, tjocklek på vävnadssnittet och vilken ljusstyrka som använts vid fotografering. A och D-G är fotograferade vid 400 X, B vid 600 X och C vid 200 X förstoring, men bilderna B-G har justerats mot varandra för att cellerna ska ha ungefär samma storlek.



Figur S 3. A) Njure med normala nefron, fisk från K23 HT, 639 dygnsgrader, HE. Nefronet består av en glomerulus (filtreringsenhet, stjärna) och tubuli (gångar, pil). B-C) Akut nefros, HE. B är ett yngel från 2023, C är ett yngel från F23 LT, 506 dygnsgrader. Tubuli är vidgade, tubulicellerna är kraftigt påverkade och håller på att tappa kontakten med varandra, material avknoppas från cellerna och en del celler har lossnat. D-E) Omfattande vidgning av tubuli, som innehåller en vätska som färgar in ljusst rosa i HE (D) samt är PAS-positiv (E). I E) syns även cellrester i tubuli. Yngel från F23 LT, 639 dygnsgrader. Förändringarna i D-E) noterades även 2023 men visas inte här. Samtliga bilder är fotograferade vid 400 X förstoring, och A-D) är färgade med HE, medan E) är färgad med PAS. Färgtonen mellan bilderna varierar något även när samma infärgning använts, vilket kan bero på något olika infärgningstid, tjocklek på vävnadssnittet och vilken ljusstyrka som använts vid fotografering.

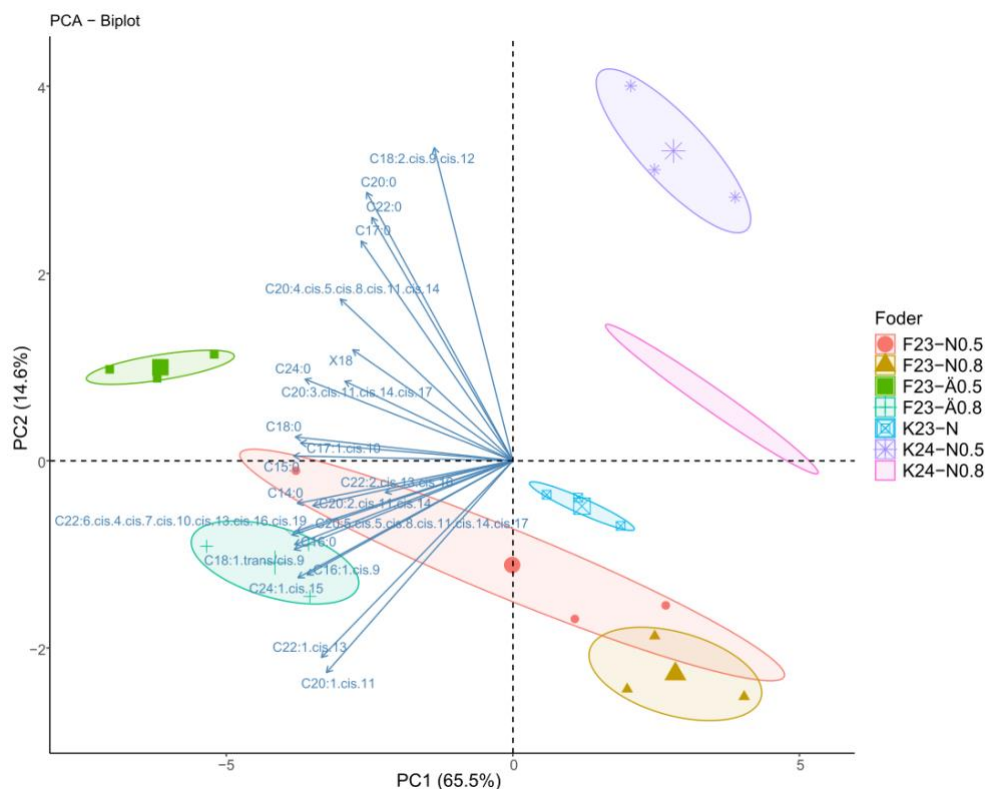
Tabell S 1. Resultat av histopatologiska undersökningar på individnivå. Observera att en individ bara undersökts vid ett tillfälle och en rad för ett tråg därför inte representerar samma individ utan den ena av två individer som undersöktes vid respektive provtagningstillfälle.

| Population | Foder | Tiamin-status | Tråg | Provtagningstillfälle dag/dygnsgreder | | | | | |
|-------------|-------|---------------|------|---------------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | | 1/15 | 15/244 | 29/506 | 36/639 | 36/694 | 68/1339 |
| Umelax | F23 | LT | 2 | | | misstänkt ¹ | misstänkt ² | | |
| Umelax | F23 | LT | 2 | | | misstänkt ² | negativ | | |
| Umelax | F23 | LT | 7 | ej bb | negativ ¹ | positiv | positiv | | |
| Umelax | F23 | LT | 7 | negativ | negativ ¹ | misstänkt ² | positiv | | |
| Umelax | F23 | LT | 11 | negativ | negativ | positiv | misstänkt ² | | |
| Umelax | F23 | LT | 11 | negativ | negativ | positiv | positiv | | |
| Umelax | F23 | HT | 8 | negativ | negativ | positiv | positiv | | |
| Umelax | F23 | HT | 8 | negativ | negativ ¹ | misstänkt | positiv | | |
| Umelax | F23 | HT | 9 | ej bb | negativ ¹ | positiv | positiv | | |
| Umelax | F23 | HT | 9 | ej bb | negativ ² | positiv | misstänkt | | |
| Umelax | F23 | HT | 16 | | | negativ | positiv | | |
| Umelax | F23 | HT | 16 | | | negativ ¹ | positiv | | |
| Umelax | K23 | LT | 3 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K23 | LT | 3 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | LT | 6 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | LT | 6 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | LT | 10 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | LT | 10 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | HT | 5 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | HT | 5 | | | | negativ | | |
| Umelax | K23 | HT | 14 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K23 | HT | 14 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K23 | HT | 15 | | | | negativ ¹ | | |
| Umelax | K23 | HT | 15 | | | | negativ | | |
| Umelax | K24 | HT | 4 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K24 | HT | 4 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K24 | HT | 12 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K24 | HT | 12 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K24 | HT | 13 | | | | negativ ² | | |
| Umelax | K24 | HT | 13 | | | | negativ ² | | |
| Dalälvslox | F23 | LT | F5 | | | | | positiv ² | positiv ¹ |
| Dalälvslox | F23 | LT | F5 | | | | | positiv ² | positiv |
| Dalälvslox | F23 | LT | F37 | | | | | misstänkt ² | |
| Dalälvslox | F23 | LT | F37 | | | | | misstänkt ² | |
| Dalälvslox | F23 | LT | F41 | | | | | positiv ² | negativ ¹ |
| Dalälvslox | F23 | LT | F41 | | | | | misstänkt | negativ ¹ |
| Dalälvslox | F23 | HT | F2 | | | | | misstänkt ² | |
| Dalälvslox | F23 | HT | F2 | | | | | negativ | |
| Dalälvslox | F23 | HT | F9 | | | | | positiv ¹ | positiv ¹ |
| Dalälvslox | F23 | HT | F9 | | | | | misstänkt ¹ | positiv ¹ |
| Dalälvslox | F23 | HT | F35 | | | | | positiv ¹ | positiv ¹ |
| Dalälvslox | F23 | HT | F35 | | | | | misstänkt ² | negativ |
| Götaälvslox | F23 | okänd | F4 | | | | | negativ ² | positiv ¹ |
| Götaälvslox | F23 | okänd | F4 | | | | | negativ ¹ | positiv ¹ |
| Götaälvslox | F23 | okänd | F12 | | | | | misstänkt ² | positiv ¹ |
| Götaälvslox | F23 | okänd | F12 | | | | | misstänkt | positiv ¹ |
| Götaälvslox | F23 | okänd | F31 | | | | | negativ | misstänkt ¹ |
| Götaälvslox | F23 | okänd | F31 | | | | | negativ | misstänkt ¹ |

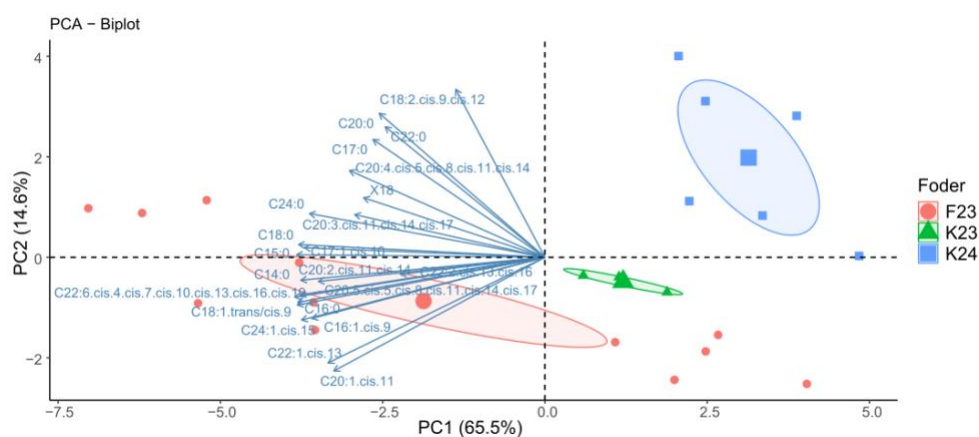
positiv = patologi motsvarande 2023; misstänkt = vissa patologiska förändringar motsvarande 2023; negativ = patologi motsvarande 2023 ej påvisad; ej bb=för lite levervävnad med i något av snitten för att möjliggöra bedömning av leverstatus; tom ruta= ej undersökt; ¹ tendens till leverförfettning; ² leverförfettning.

6.3 FETTSYRASAMMANSÄTTNING

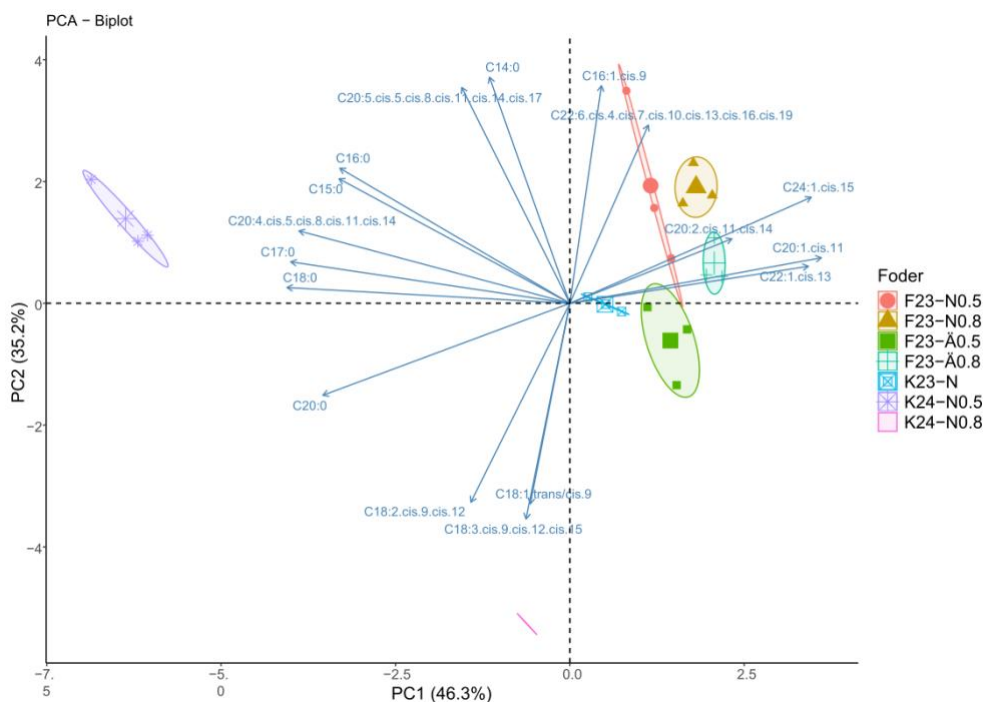
6.3.1 Fettsyrasammansättningen i foder



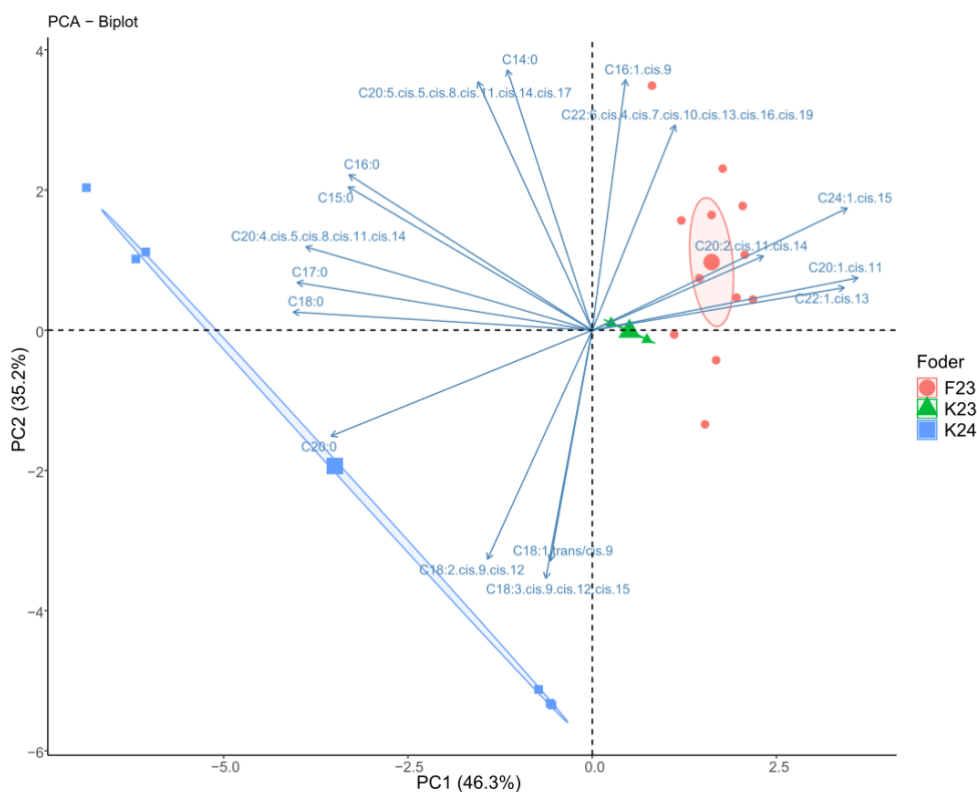
Figur S 4. PCA för sammansättningen av fria fettsyror i olika fodertyper och storlekar. F23-N, försöksfoder från Norrfors; F23-Å, försöksfoder från Älvkarleby. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.



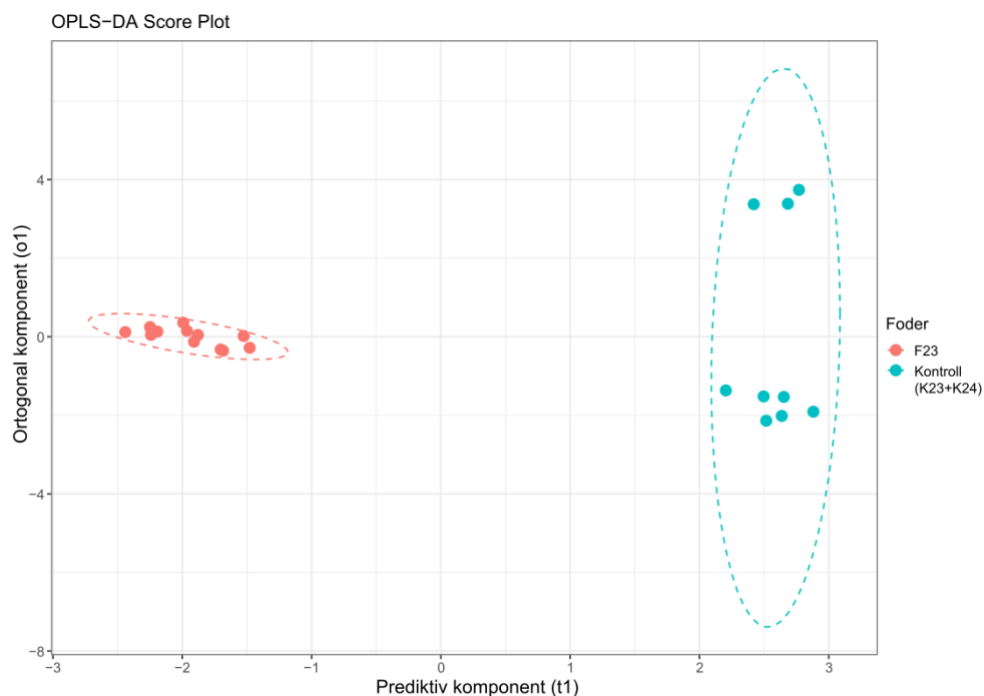
Figur S 5. PCA för sammansättningen av fria fettsyror för olika fodertyper aggregerat över storlekar. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.



Figur S 6. PCA för sammansättningen av bundna fettsyror i olika fodertyper och storlekar. F23-N, försöksfoder från Norrfors; F23-Å, försöksfoder från Älvkarleby. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.

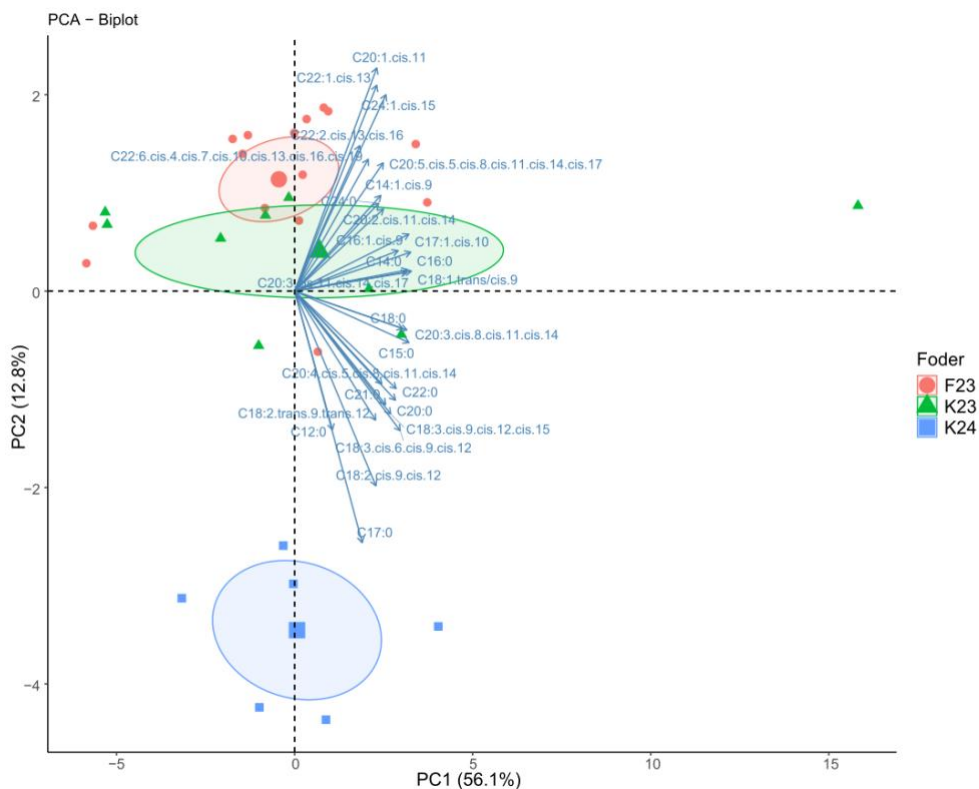


Figur S 7. PCA för sammansättningen av bundna fettsyror för olika fodertyper aggregerat över storlekar. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.

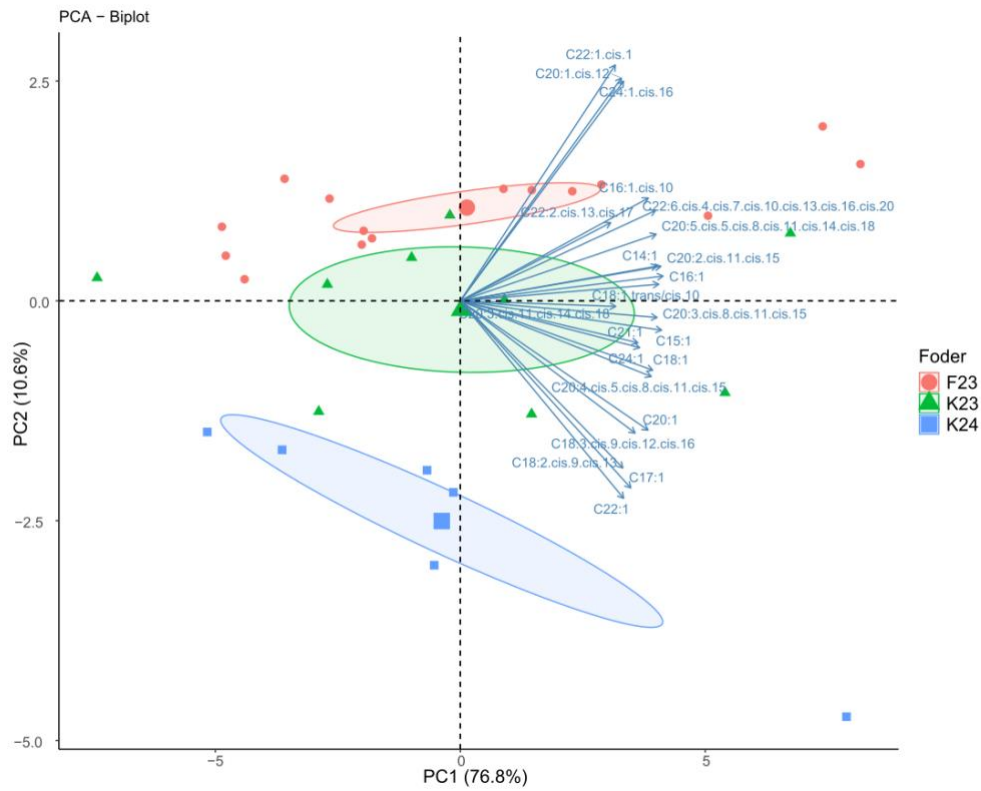


Figur S 8. Visualisering av separationen mellan F23 och kontrollfoder (K23+K24) utifrån resultaten från OPLS-DA (Tabell 6). Varje punkt representerar ett prov och de rumsliga avstånden mellan punkterna visar separationen mellan de olika grupperna. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.

6.3.2 Fettsyrasammansättningen i yngel



Figur S 9. PCA för sammansättningen av fria fettsyror i yngel från olika foderbehandlingar från dag 36 i respektive anläggning. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.



Figur S 10. PCA för sammansättningen av bundna fettsyror i yngel från olika foderbehandlingar från dag 36 i respektive anläggning. Ellipsen representerar ett 95% konfidensintervall för gruppens bivariata medelvärde antaget en normalfördelning.

6.4 SELEN OCH VITAMIN E

Tabell S 2. Analysresultat för selen och vitamin E i de tre olika foderbehandlingarna (F23, K23 och K24).

| Foder (0.8-1.5 mm) | Vitamin E (mg/kg) | Selen (mg/kg) |
|--------------------|-------------------|---------------|
| F23 | 370 | 1.4 |
| K23 | 400 | 2 |
| K24 | 670 | 1.3 |

6.5 ASTAXANTIN OCH KAROTENOIDER

Tabell S 3. Analysresultat för astaxantin och andra karotenoider i laxyngel vid start och vid dag 36. Tiamin: HT – högtiamin, LT – lågtiamin. Fetmarkering indikerar uppmätta värden.

| No | Tid (dag) | Stam | Tiamin | Foder | Individer | Provvikt (g) | Astaxantin $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | Lutein $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | Zeaxantin $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | β -kryptoxantin $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | α -karoten $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | β -karoten $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | Lykopen $\mu\text{g}/100\text{ g}$ |
|----|--------------|------|--------|-------|-----------|-----------------|--|--------------------------------------|---|---|---|--|---------------------------------------|
| 1 | Start | DAL | HT | - | 9 | 1.0 | e.p. | 39.7 | 16.3 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 2 | Start | DAL | LT | - | 9 | 1.1 | e.p. | e.p. | 12.2 | e.p. | 58.0 | e.p. | e.p. |
| 3 | Start | GÄ | - | - | 6 | 0.6 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 4 | Start | UME | HT | - | 9 | 1.0 | e.p. | <6 | 12.8 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 5 | Start | UME | LT | - | 6 | 0.7 | e.p. | 10.1 | 10.1 | 17.6 | 39.5 | e.p. | e.p. |
| 6 | 36 | DAL | HT | F23 | 2 | 1.2 | e.p. | 28.1 | 9.1 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 7 | 36 | DAL | HT | F23 | 2 | 1.6 | e.p. | 44.9 | 35.9 | 41.2 | e.p. | 15.3 | e.p. |
| 8 | 36 | DAL | HT | F23 | 2 | 1.2 | e.p. | 14.4 | 16.1 | 10.5 | e.p. | 10.3 | e.p. |
| 9 | 36 | UME | HT | F23 | 2 | 0.8 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 10 | 36 | UME | HT | F23 | 2 | 0.8 | e.p. | e.p. | <10 | e.p. | e.p. | <10 | e.p. |
| 11 | 36 | UME | HT | F23 | 2 | 1.2 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 12 | 36 | UME | HT | K23 | 2 | 1.5 | e.p. | e.p. | 9.0 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 13 | 36 | UME | HT | K23 | 2 | 1.3 | e.p. | e.p. | 17.6 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |
| 14 | 36 | UME | HT | K23 | 2 | 0.8 | e.p. | e.p. | <10 | e.p. | e.p. | e.p. | e.p. |

LOD: 6-10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, LOQ: 16-30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, e.p.: ej påvisa

YNGELDÖDLIGHETEN 2023

Under våren och sommaren 2023 drabbades flera svenska odlingar av Atlantlax och havsöring av en ovanligt hög dödlighet bland yngel – i vissa fall upp till 80 %. Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) kunde utesluta bakterieinfektioner, och istället visade analyser att fiskarna uppvisade ett tillstånd snarligt lipoid liver disease (LLD), en ämnesomsättningssjukdom kopplad till fettinlagring. En gemensam nämnare för alla drabbade odlingar var att de använt foder från samma leverantör.

När fodret byttes ut minskade dödligheten inom en vecka, vilket pekar på en stark koppling mellan fodret och sjukdomen – även om den exakta orsaken ännu inte är helt klarlagd. Man misstänker att obalanser i fodrets fettsyror, särskilt från den feta fisken lodda som använts som råvara, kan ha lett till den komplexa sjukdomsbild och förhöjda dödlighet som rapporterats. Dessutom kan laxyngel från Östersjön redan vara extra känsliga på grund av en känd brist på vitamin B₁ (tiamin), vilket påverkar både fettomsättning och nervsystem.

Ett nytt steg i energiforskningen

Forskningsföretaget Energiforsk initierar, samordnar och bedriver forskning och analys inom energiområdet samt sprider kunskap för att bidra till ett robust och hållbart energisystem. Energiforsk är ett politiskt neutralt och icke vinstutdelande aktiebolag som ägs av branschorganisationerna Energiföretagen Sverige och Energigas Sverige, det statliga affärsverket Svenska kraftnät, samt gas- och energiföretaget Nordion Energi. Läs mer på energiforsk.se.

