



Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

## **Nefrokalsinose hos oppdrettslaks - mulige årsaker og virkninger**

En gjennomgang av litteratur rundt nefrokalsinose hos atlantisk laks (*Salmo salar*)

Kent Gøran Lillebo

Masteroppgave i Fiskeri og havbruksvitenskap, FSK-3961, mai 2021





## Forord

Arbeidet med masteroppgaven har vært en krevende, men utrolig lærerik opplevelse. Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder Helge K. Johnsen. Hans kunnskap om det meste har motivert meg når ting så ut som mørkest ut i innspurten. Covid-situasjonen har gjort fysisk veiledning utfordrende, men mail og telefon har fungert kjempefint.

Samtidig med master har jeg studert PPU-Y ved Nord universitet, hatt 100% stilling som kontaktlærer ved Kvaløya videregående skole, undervist ved folkeuniversitetet i Tromsø og losset båter på nattetid hos Lars Holm Shipping. Jeg vil ønske å takke min sjef Oddbjørn, A Johnsen som har tilrettelagt og vært løsningsorientert. Jeg vil også takke mine elever, som stadig vekk har spurt meg hvorfor kan jeg kan så mye om betong og fisk? Nå kan de også det.

Jeg vil også takke mine fantastiske kolleger på jobb, som garantert er utrolig lei av å høre hvor fascinerende fisk, nyrer, kjemi og nefrokalsinose er.

Jeg vil også takke for en tålmodig PPU-Y i Bodø, som har møtt mine trøtte øyne på Teams mange ganger. Stor takk også til Beate Kristin Andreassen og Raymond Lian.

Jeg vil også takke Ingunn Sommerset, Kristoffer Vale Nielsen, samt Anne Berit Olsen ved Veterinærinstituttet for bilder til min oppgave.

Jeg har lært at når en har mange baller i luften samtidig, må man ha fokus på det man gjør, når man gjør det. Mitt nye livsmotto under masteren har blitt «*Vær der du er, når du er der*».

Til sist vil jeg takke min samboer og forlovede Marina Veretenikova, som jeg gifter meg med 25/6-2021. Du har gjort tiden så mye mer givende, med fjellturer i Jotunheimen, padling i kajakk og bål i fjæra.

Tromsø, mai 21.

Kent Gøran Lillebo

## Sammendrag

I denne oppgaven er det sett på betydningen av ulike faktorer i vannmiljøet som utløsende årsaker til nefrokalsinose hos norsk oppdrettslaks (*Salmo salar*).

Nefrokalsinose er utfelling av kalkholdig materiale i nyret og en kjent lidelse hos flere fiskearter i oppdrett, inkludert regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Hos laks er nefrokalsinose et relativt nytt fenomen, som ser ut til å øke i omfang. Kunnskapen om lidelsens patogenese og etiologi er imidlertid varierende og til dels mangelfull for laksens vedkommende. Fisk som rammes og overlever den første tiden etter utsett i sjøen ser imidlertid ut til å klare seg godt.

Nefrokalsinose er først og fremst et «ferskvannsproblem», men er også observert hos oppdrettslaks i sjøvannsfasen. Høyt innhold av CO<sub>2</sub> i driftsvannet, som følge av fiskens metabolisme (og biofilterets metabolisme i RAS-anlegg) har lenge vært ansett som en hovedårsak til lidelsen, men tilførsel av mineraler via fiskefôret og bruk av buffere (spesielt i RAS-anlegg) spiller trolig også en viktig rolle i denne sammenheng. Karbondioksid er svært vannløselig og danner karbonsyre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) som i første omgang gir sluttproduktene H<sup>+</sup> og HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> når det reagerer med vann, og deretter karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) når vannets pH øker. Denne reaksjonen bidrar til redusert pH i driftsvannet over tid og krever som regel tilsetning av buffer for at pH skal være stabil. Økt konsentrasjon av CO<sub>2</sub> påvirker også fiskens syre/base-balanse og kan i kombinasjon med økt innhold av HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> og mineraler (spesielt Ca<sup>2+</sup>) i fiskens plasma skape fysiologiske utfordringer for fiskens nyre, som i neste omgang kan legge til rette for utvikling av nefrokalsinose. Dette skjer trolig ved at pH i urinen endres eller ved at løseligheten av utfellingsproduktene går ned slik at utfelling skjer, eller som en følge av begge forhold. Høye nivå av fosfor, selen og vitamin-C i fiskefôr kan muligens også ha betydning for utvikling av nefrokalsinose hos laks.

Det er neppe noen tvil om at en høy grad av nefrokalsinose vil påføre laksen en kronisk stressbelastning, som i seg selv kan forsterke utviklingen av nefrokalsinose. Økt stress kan i neste omgang føre til tertiære stressresponser (i henhold til GAS-konseptet), som i sin ytterste konsekvens kan føre til sykdom og død. Høy grad av nefrokalsinose må derfor betraktes som et velferdsproblem for fisken.

**Nøkkelord:** Nefrokalsinose, Multifaktoriell, Vannmiljø, RAS, CO<sub>2</sub>.



## Innhold

Innledning.....	1
Bakgrunn .....	1
Formål med oppgaven.....	2
Oppgavens oppbygging.....	3
Laksens biologi .....	4
Smoltifisering .....	4
Gjellene .....	5
Fiskenyret .....	6
Opptak av kalsium.....	9
Biologiske buffersystem.....	11
Syre/base-regulering.....	11
Stress og stressresponser .....	15
Måling av stress-parametere.....	16
Vannkjemi og laksens krav til vannmiljø.....	17
Alkalinitet.....	17
Karbon i vann .....	19
Kationer i vann .....	19
Anioner i vann.....	20
pH i vann .....	20
Temperatur i vann .....	21
Karbondioksid i vann .....	21
Sammensetning av fiskefôr .....	24
Fiskens metabolisme .....	24
Mineraler og sporstoffer i fiskefôr .....	25
Saltfor/Superfor.....	27

Nefrokalsinose (Urolitiasis) .....	29
Antatte årsaker til nefrokalsinose .....	32
Behandling og prognose .....	34
Fiskevelferd i oppdrett .....	35
Intensiv settefiskproduksjon - RAS.....	37
RAS anlegg - driftsrutiner .....	37
Fisketetthet i RAS .....	38
Produksjon av stor-smolt i RAS .....	38
Biofiltre i RAS .....	39
Vannkvalitet i RAS .....	39
Alkalinitet i RAS .....	39
Diskusjon.....	42
Referanseliste .....	52

# Innledning

## Bakgrunn

Norsk oppdrettsnæring har i mange år vært preget av sterk vekst. Det er spådd en femdobling i verdi og en åttedobling av mengde laks (*Salmo salar*) innen 2050 (Henriksen et al., 2012). Fortsatt vekst i næringen ser imidlertid ut til å være begrenset av miljø-utfordringer en ser i sjøfasen (Gullestad, 2011; Calabrese, 2017). Produksjon av settefisk skjer i lukkede, landbaserte systemer, hovedsakelig anlegg basert på RAS (Recirculation Aquaculture System), der fisken holdes til den er smoltifisert og klar for utsett i sjøen. (Calabrese, 2017). Smoltifisering er en naturlig fysiologisk prosess der fisken forbereder seg på livet i sjøen (Stefansson et al., 2008; Bjørnsson et al., 2011; McCormick, 2012). Fisken settes så ut som post-smolt i merder i sjøen for videre vekst. Oppdrettslaksen møter mange miljømessige utfordringer etter utsett i sjøen og den første tiden etter utsett er ofte preget av forhøyet dødelighet. Sjøfasens utfordringer er en av næringens flaskehals for videre vekst (Gullestad, 2011). I den senere tid er det imidlertid blitt mer vanlig å holde post-smolten i lukkede brakkvannsanlegg på land eller i sjøen før den settes i merd på havet som såkalt stor-smolt med vekt på opp mot 1 kg. Dette er en strategi for å unngå mange av risikoene en har ved tidlig sjøutsett (Calabrese, 2017).

For å imøtekomme de utfordringene næringen står over for i sjøfasen (bl.a. rømming og luspåslag), la Nærings- og fiskeridepartementet ut et høringsutkast den 11.12.2015, der de ønsket å oppheve kravet om dispensasjon i forhold til utsett av settefisk større en 250 gram. Reglene ble endret 01.06.2016 slik at oppdrett av stor smolt opptil 1 kg kunne gjøres innenfor de ordinære tillatelsene til landbasert oppdrett av laks (Regjeringen, 2021). Tanken bak regelendringen er at fiskens opphold i landbaserte anlegg forlenges slik at en forkorter oppholdet i sjøen hvor dødeligheten er størst (Calabrese, 2017). De fleste anlegg for settefisk som er under prosjektering i dag er for stor-smolt opptil 1 kg (Hagspiel et al., 2018).

Utvikling av nefrokalsinose er et kjent helsemessig problem hos oppdrettslaks, som i hovedsak er knyttet til ferskvannsfasen og som kan føre til økt dødelighet etter utsett i sjøen. Nefrokalsinose er en nyrelidelse som antas å være særlig knyttet til høye nivåer av CO<sub>2</sub> i karmiljøet og muligens sammensetningen av fôret som fisken spiser, noe som kan tyde på at lidelsen er multifaktoriell (Bjerknes et al., 1996; Vatsos & Angelidis, 2017; Fivelstad et al.,



2018). Fisk som ikke får en diett som er optimal vil heller ikke yte optimalt, og lidelser som nefrokalsinose vil kunne utgjøre en reell utfordring for næringens videre vekst (Ytrestøyl et al., 2015). God kvalitet på inntaksvannet og kontroll på pH i anlegget, samt fokus på rett førsammensetning, er sett på som viktige tiltak for å begrense eller unngå utvikling av nefrokalsinose hos oppdrettslaks.

Til nå er det særlig innen intensivt oppdrett av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) en har sett utfordringer med nefrokalsinose (Bjerknes et al., 1994). Men problemet gjelder også for produksjon av laks, der det har skjedd en økning i antall anlegg som har fått påvist nefrokalsinose de senere år. Ifølge Veterinærinstituttet ble i det 2018 påvist nefrokalsinose i 147 anlegg med laksefisk, sammenlignet med 107 og 126 anlegg i henholdsvis 2016 og 2017. Nefrokalsinose er p.t. ikke listeført i forskrift eller lov og er dermed ikke meldepliktig til tilsynsmyndighetene. Dette gjør at lidelsen er vanskelig å kartlegge.

I og med at utviklingen av nefrokalsinose synes å være knyttet til redusert vannkvalitet i ferskvannsfasen er det rimelig grunn til å anta at forlengelse av smoltperioden og økt bruk av lukkede anlegg, slik utviklingen ser ut til å gå, kan medføre økte problemer med nefrokalsinose. Dette gjelder i særlig grad for produksjon av settefisk i RAS-anlegg, der opptil 95% av driftsvannet gjenbrukes (Martins et al., 2010). Gjenbruk av driftsvann medfører bl.a. at nivåene av avfallsstoffer fra fisken (i særlig grad  $\text{CO}_2$  og  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) akkumuleres i karmiljøet.

På tross av at nefrokalsinose er et kjent og relativt utbredt problem i norsk lakseoppdrett er det fortsatt en del som er uklart når det gjelder hvilke faktorer som utløser nefrokalsinose og hvordan samspillet mellom ulike faktorer påvirker utviklingen av nefrokalsinose. Den velferdsmessige betydningen av nefrokalsinose hos oppdrettslaks synes også å være underkommunisert.

### **Formål med oppgaven**

Formålet med oppgaven er å belyse mulige faktorer, som kan utløse nefrokalsinose hos norsk oppdrettslaks. Videre tar oppgaven sikte på å belyse hvordan nefrokalsinose kan påvirke fiskevelferd i norsk lakseoppdrett.

Problemstillingen er tenkt løst ved å gå gjennom vitenskapelig litteratur rundt nefrokalsinose hos fisk, samt relevante rapporter fra næringen og myndigheter.

## **Oppgavens oppbygging**

Oppgaven er delt opp i flere deler. Første kapittel omhandler laksens biologi og fysiologi, dette er en forutsetning for forståelsen av lidelsens patogenese og mulige årsakssammenhenger. Kapittel 2 vil beskrive laksens krav til miljø. Kapittel 4 beskriver patogenesen til nefrokalsinose, samt at det beskriver lidelsen hos andre teleost fisk og vertebrater. Kapittel 5 beskriver velferd i oppdrett. Samt kort hvordan nefrokalsinose registres i velferdssammenheng. Kapittel 3 og 6 vil gi kunnskapsgrunnlaget der alle miljøpåvirkende faktorer og oppdrettsstrategier beskrives. Etter teori kommer kapittel 7 der diskusjon av mulige årsaker og årsakssammenhenger vurderes med tanke på formålet med oppgaven.

## Laksens biologi

Den atlantiske laksen er en iteropar anadrom fisk som tilhører familien *Salmonidae*. Vill laks har en utbredelse i de nordlige delene av Atlanterhavet (Bruno et al., 2013). Kjønnsmoden laks som er i havet starter med å trekke opp i elver og vassdrag i løpet av sommerhalvåret. Gytingen skjer i løpet av høsten samme år. Rogna (eggene) begravnes i grus på elvebunnen og klekker i løpet av senvinteren/våren (Keenleyside & Yamamoto, 1962). Etter klekking vil larvene skjule seg i bunnsubstratet den første tiden. Under denne tiden tar larvene ikke aktivt til seg næring, men utnytter næringen som ligger i plommesekken. Mens larvene ligger skjult i bunnsubstratet utvikler tarmkanalen seg, slik at larvene ved neste fase er klar til å ta til seg føde. Denne fasen kalles plommesekk-stadiet. Når yngelen i løpet av våren er klar til aktivt å søke og spise mat, vil den utvikle en territoriell adferd. Denne adferden kjennetegner parr-stadiet, hvor laksen har fått parrmerker (fingermerker) på siden (Keenleyside & Yamamoto, 1962). Det videre forløpet varierer med næringstilgang og temperaturforhold og medfører at laksen kan forbli på parr-stadiet i flere år. I løpet av ettersommeren registrerer laksen at daglengden blir kortere og starter prosessen med å klargjøre seg for om den skal vandre ut i sjøen den påfølgende våren. Avgjørende for denne prosessen er størrelsen til parren og hvilken ernæringsmessig status fisken har (Thorpe et al., 1998; Handeland et al., 2004).

### ***Smoltifisering***

Smoltifisering er prosessen der fisken gjennomgår tilpasning til et liv i det marine miljø. Prosessen omfatter morfologiske, fysiologiske og atferdsmessige endringer som bl.a. gjør at laksen endrer utseende fra en mørk pigmentert parr som lever i elva til en sølvfarget smolt tilpasset ett liv i havet (Stefansson et al., 2008). Vandring fra ferskvann til sjøvann skaper også utfordringer i forhold til laksens væskebalanse. I ferskvann lever laksen i et hypo-osmotisk miljø og må ta opp ioner fra miljøet, mens den i sjøvann er i et hyper-osmotisk miljø og må derfor skille ut ioner som trenger inn i fisken. På tross av forskjell i osmotisk trykk mellom fersk- og sjøvann holder fisken en stabil indre osmolalitet på rundt 300 mOsm kg<sup>-1</sup>, uavhengig av hvilket miljø den oppholder seg (McCormick et al., 1989; Farrell, 2011). Dette er mulig fordi laksen også gjennomgår osmoregulatoriske forandringer, som del av smoltifiseringen, før den vandrer til sjøen.

Smoltifiserings-prosessen starter under naturlige forhold i elva på høsten ved at daglengden blir kortere. Prosessen fortsetter gjennom vinteren, men det er først når daglengden øker i løpet av

våren at prosessen skyter fart. Endokrine akser mobiliseres og en ser økning i plasmaverdier for bl.a. veksthormon, tyroidea-hormoner og kortisol. Disse hormonene spiller en sentral rolle i utviklingen av de morfologiske og atferdsmessige endringene som skjer hos smolten (Baldisserotto et al., 2007; McCormick et al., 2007).

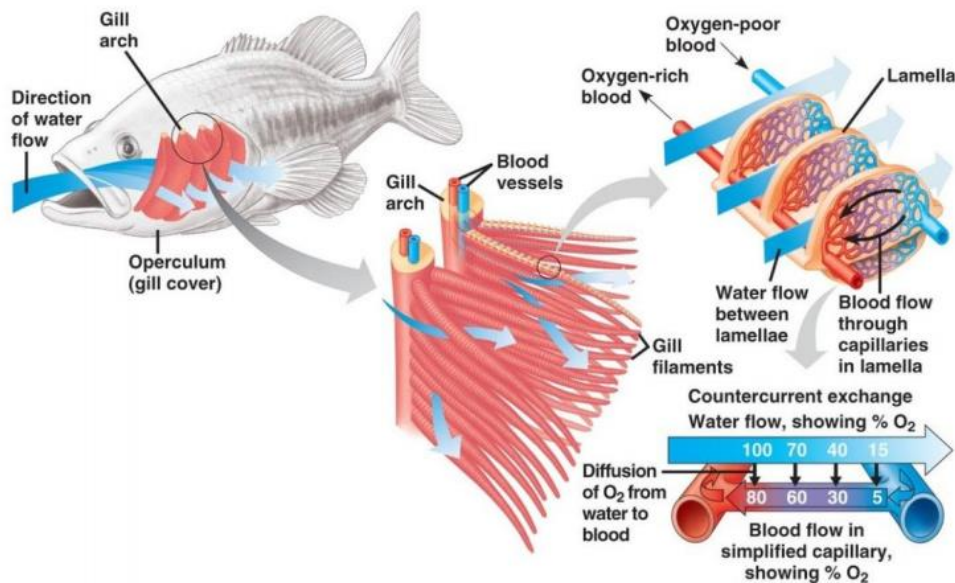
Før laksen vandrer ut får den en mer utpreget strømlinjet form og endrer adferd fra å være territoriell til å bli sosial og stimdannende. Når laksen er klar for å vandre til sjøen lar den seg drive nedover elven med strømmen mot havet.

### ***Gjellene***

Gjellenes hovedfunksjoner er i hovedsak utveksling av respirasjonsgasser ( $O_2$  og  $CO_2$ ), aktiv transport av monovalente ioner inn og ut av fisken ( $Cl^-$ ,  $Na^+$   $K^+$ ), pH-regulering av fiskens indre miljø og utskillelse av nitrogenholdig avfall ( $NH_4/NH_3^+$ ) (Claiborne et al., 2002; Evans et al., 2005).

Hos teleoster som laksen er gjellene dekket av operculum (gjellelokk) som beskytter gjellene. Vannet tas inn gjennom munnen og passerer over gjellefilamentene, der gassutviklingen skjer (Figur 1). Gjellefilamentene er lange projeksjoner som ligger lateralt for gjellebuen. Hvert filament er forsynt med blod fra en afferent arterie som løper langs filamentet. Blodet inne i filamentet krysser filamentet i lameller der opptaket av oksygen skjer (Figur 1). Gjelleepitelet består av flere celletyper, men primært pavement-celler (PVC) og mitokondrierike celler (MRC). Disse utgjør henholdsvis  $> 90\%$  og  $< 10\%$  av gjelleepitelets overflate. PVC utgjør størstedelen av overflaten i gjellefilamentene, og er viktige i gassutvekslingen i sekundærlamellene (Figur 1). PVC regnes som impermeable for ioner. MRC utgjør et mye mindre område av epitelets overflate i gjellene, sammenlignet med PVC, men de regnes for å være essensielle når det gjelder opptak/utskillelse av monovalente ioner i gjellene. MRC har høy tetthet av mitokondrier, og transportproteiner. Både den apikale, og basolaterale cellemembranen er polarisert. MRC kalles ofte for kloridceller hos teleoster (Evans et al., 2005).

Gjellene spiller også en viktig rolle i syre/base-reguleringen. Når fiskens indre miljø forsures som følge av respiratorisk eller metabolsk acidose, vil overskuddet av  $H^+$ -ioner skilles ut over gjellene (Figur 5).



**Figur 1.** Skjematisk framstilling av fiskegjellens anatomi med tanke på opptak av oksygen. Et viktig poeng er at opptaket av  $O_2$  skjer som følge av motstrømsutveksling mellom blod og vann, som sikrer optimalt opptak av  $O_2$  (Kumar et al., 2018).

### Fiskenyret

Nyret hos fisk er et sammensatt organ med mange funksjoner. Det er først og fremst et ekskretorisk organ som skiller ut metabolske avfallsstoffer gjennom filtrasjon av blodets plasma i nefronet. Nyret er i tillegg involvert i reguleringen av væskebalansen, reguleringen av syre/base-balansen (Figur 2 og 6), og sekresjon av hormoner (Farrell, 2011). Vi deler nyren histologisk og funksjonelt inn i tre deler; en blod-dannende del, en urinutskillende ekskretorisk del og en hormonproduserende eksokrin del. Den ekskretoriske delen utgjør 2/3 av den bakre nyren. Det er i også i denne delen av nyret en observerer utfellinger ved nefrokalsinose (Figur 9, 10 og 11).

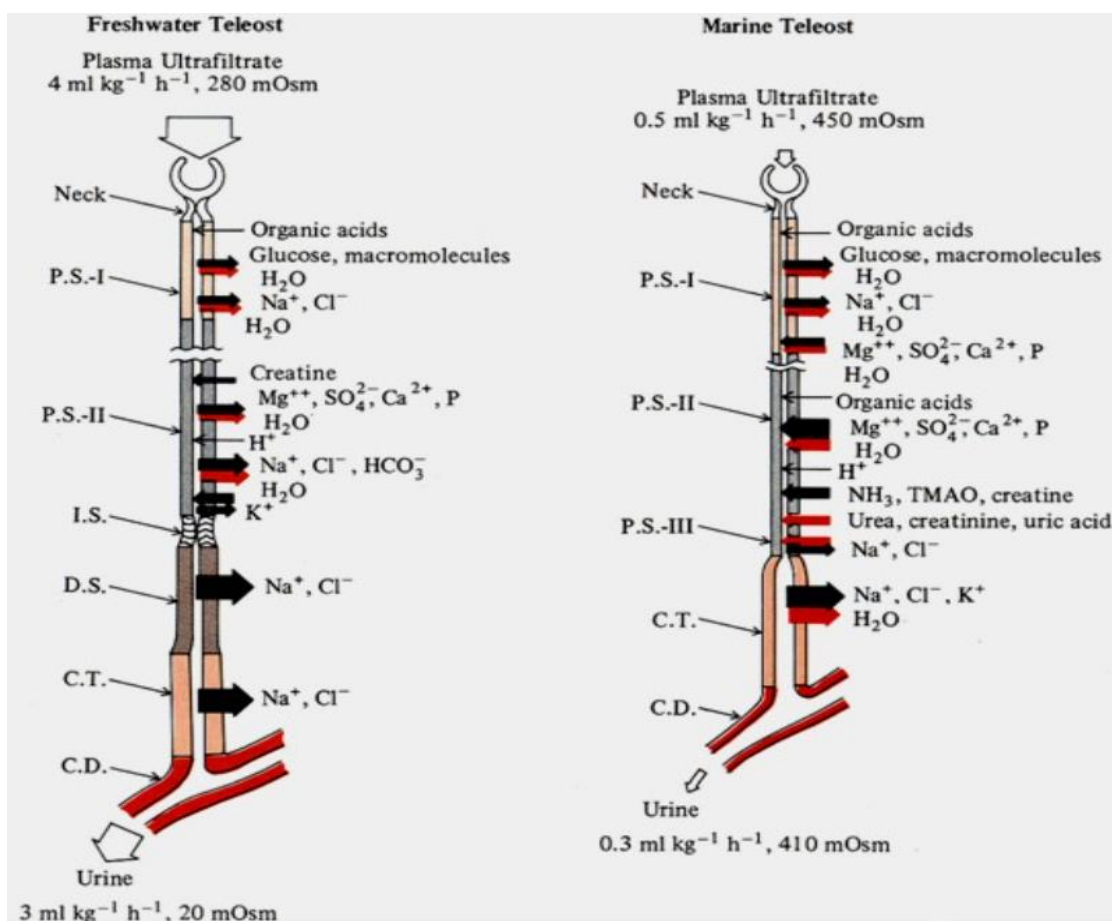
Nefronet er den funksjonelle delen i den urinutskillende delen av nyren og kan være av såkalt glomerulær type med Bowmans kapsel eller av en aglomerulær type uten Bowmans kapsel (Figur 2). Den glomerulære typen er i prinsippet lik det vi ser hos høyere vertebrater, hvor urindannelse skjer i det glomerulære nøstet ved at blodet som løper gjennom nøstet filtreres under et hydrostatisk trykk (blodtrykket). Urinen som dannes i Bowmans kapsel kalles ultrafiltrat (eller for-urin) og har i prinsippet samme sammensetning som blodet, med unntak av

blodceller og løste molekyler større enn ca. 70kDa. Filtrasjon skjer effektivt med hensyn på størrelse og elektrisk ladning, der kationer er mer permeable enn anioner (Breshears & Confer, 2017). Ultra-filtratet som dannes i Bowmans kapsel føres videre til nefronets tubulus, der sammensetningen av urinen kan endres som følge av reabsorpsjon av viktige molekyler og ioner fra for-urinen i tubulus til det omkringliggende cellevevet og/eller som følge av sekresjon av molekyler i motsatt retning (Figur 2). Ved utløpet av tubulus samles urinen i urinledere som munn ut i urinblæren. Derfra sendes urinen fra urinblæra via en kort kanal til gattet der den forlater fisken. Både reabsorpsjon og sekresjon av stoffer fra/til ultra-filtratet er omfattende, selektiv og variable prosesser som skjer ved behov når filtratet strømmer gjennom tubulus-systemet. Glomerulær filtrasjonsrate (GFR) er 7-10 ganger høyere hos ferskvannsfisk sammenlignet med saltvannsfisk, noe som reflekterer nyrens funksjoner i de to habitatene. Glomerulus er også større hos ferskvannsfisk som et resultat av dette (Brown et al., 1978; Baldisserotto et al., 2007). Fisken evner også å justere GFR igjennom vaskulære endringer, samt rekruttere individuelle nefroner etter behov (Baldisserotto et al., 2007). Hos regnbueørret er over 50% av nefronene rekruttert i ferskvannsfasen (Brown et al., 1980), mens antallet rekrutterte nefroner er ca 5% hos saltvannstilvennet regnbueørret. Gjennomsnittlig GFR er dermed langt høyere hos ferskvannstilpasset regnbueørret enn hos saltvannstilpasset regnbueørret, noe som kan være med på å illustrere at nyrene endres fra å være filtrerende i ferskvann til å være sekreterende i saltvann (Baldisserotto et al., 2007). Fisk mangler imidlertid Henley's sløyfe og kan derfor ikke produsere hypertont urin, slik som høyere vertebrater kan gjøre.

Hos teleoster vil hovedsaklig  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  og glukose reabsorberes fra tubulus (Farrell, 2011). En finner størst reabsorpsjon hos ferskvannsfisk, på grunn av deres behov for å holde igjen salter (Farrell, 2011). Typiske ioner som skilles ut i saltvann er,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  og  $\text{PO}_4^{2-}$ . Hos ferskvannsfisk vil sekresjonen gjenspeile hvilke ioner fisken får i seg gjennom fôret. Dersom fisken gis fôr tilsatt for eksempel  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{SO}_4^{2-}$  så vil disse skilles ut når behovet er dekket (Farrell, 2011).

Funksjonen til de proximale segmentene I og II i tubulus er omdiskutert, men det er enighet om at de har en sekretorisk funksjon i forhold til  $\text{Mg}^{2+}$ , spesielt hos saltvannsarter. Sekresjon av  $\text{Mg}^{2+}$  skjer ved apikal eksocytose fra vesikler i celler i segmentene (Renfro, 1999). Permeabiliteten for vann i det distale segmentet er hos ferskvannsfisk lav for å minske

reabsorpsjon av vann og sikre dannelse av isoton urin (Baldisserotto et al., 2007). Dette er forskjellig fra saltvannsfisk, der den distale delen av tubulus er permeabel for vann (Beyenbach, 2004) Det er antatt at både filtrerende og ikke-filtrerende nefroner deltar i vannutskillelse. Dette fasiliteter transport av ioner ut av tubulus, noe som er særlig viktig i nefroner med lav GFR. Hos ferskvannsfisk kan vannutskillelse i alle nefroner spille en viktig rolle i forhold til å redusere vannoverskudd (Beyenbach, 2004). Det er antatt at prolaktin, cortisol og veksthormon er viktig i reguleringen av vann- og ionebalansen (Manzon, 2002; Martinez et al., 2005; Breves et al., 2011).



**Figur 2.** Skjematisert framstilling av fiske-nefronets anatomi som starter med glomerulus (ikke oppgitt i figuren), der filtreringen av blodplasma skjer, samt proximale (P.S.) og distale (D.S.) segment og samlerør (C.T.) hos saltvannsfisk (SW) og ferskvannsfisk (FW). Viktig er sekresjon av divalente ioner i SW og reabsorpsjonen av salter hos FW (player, 2016).

De proximale segmentene deltar også i absorpsjon av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$ , samt glukose (Figur 2) (Dantzler, 2003; Beyenbach, 2004). Absorpsjonen skjer basolateralt ved hjelp av  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaser (Teranishi & Kaneko, 2010). Den primære oppgaven til den distale delen av nefronets tubulus og samlerøret hos både ferskvanns- og saltvanns-arter, er reabsorpsjon av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  (Kato et al., 2011).

### ***Opptak av kalsium***

Fisk har stort behov for kalsium til produksjon av skjelett, skjell og vedlikehold av elektrolytt-nivået. Behovet for kalsium dekkes ved opptak i gjellene og tilførsel i dietten er som regel ikke nødvendig, unntatt i veldig bløtt vann (Roberts, 2012). Siden  $\text{Ca}^{2+}$  er svært viktig for mange fysiologiske prosesser i organismen er det viktig at nivået i ekstracellulærvæsken holdes innfor ganske snevre grenser (Sand et al., 2001). Fisk regulerer  $\text{Ca}^{2+}$ -balansen ved opptak over gjellene, opptak i tarm, reabsorpsjon i nyretubuli (ferskvann) og utvekslingsprosesser med skjelett. Hos ferskvannsfisk utgjør opptaket av  $\text{Ca}^{2+}$  over gjellene inntil 97% av det totale opptaket (Farrell, 2011; Liao et al., 2007; Nilsson, 2016). Dette skjer ved hjelp av  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Hos de fleste ferskvannsfisk, inkludert salmonider, klarer gjellene alene og ta opp tilstrekkelige mengder ioner ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  og  $\text{Ca}^{2+}$ ) for å kompensere ione-tapet over skinn, gjeller og urin. Dette er vist med forsøk der fisken ikke har fått mat over lange perioder (Farrell, 2011).

Kalsiumsalter utgjør den viktigste uorganiske delen av skjelettet hos teleoster og omtrent 95% av organismens kalsium er lokalisert i beinvev. Dette gir vevene styrke, men representerer også forsynings- og lagringssted for kalsium (Graff et al., 2002). Hormonene som er involvert i kalsium-metabolismen hos fisk er prolaktin og stanniocalcin, som skilles ut av stannius-legemer i nyren (Ostrander, 2000).

Hos mennesket er vitaminet  $\text{D}_3$  relatert til opptak av kalsium i tarm, men det er motstridende resultater om dette er tilfelle også hos fisk (Graff et al., 2002). I forsøk med smolt av atlantisk laks gitt farmakologiske doser av vitamin- $\text{D}_3$ , ble det ikke registrert endringer eller forstyrrelser i kalsium-homeostasen eller beindannelsen (Graff et al., 2002). Men prosessene rundt smoltifisering og mekanismer som påvirker kalsium-homeostasen bør undersøkes videre (Graff et al., 2002).

Fisk i ferskvann har generelt et langt større opptak av  $\text{Ca}^{2+}$ , sammenlignet med fisk i saltvann, noe som reflekterer miljøet de lever i. I en sammenlignende undersøkelse ble det vist at



saltvannsfisk har 71% lavere opptak av  $\text{Ca}^{2+}$  i tarmen, sammenlignet med ferskvannsfisk (Schoenmakers et al., 1993). Dette korrelerte med en 28% lavere aktivitet av  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase og en 22% lavere aktivitet av  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -utveksler hos saltvannsfisken (Schoenmakers et al., 1993).

Hos pattedyr eksisterer to generelle opptaksveier for  $\text{Ca}^{2+}$  i tarmkanalsystemet; paracellulære og transcellulære veier. Forsøk viser at det samme gjelder hos fisk (Klinck & Wood, 2013). I den apikale membranen vil kalsium-kanaler i epitelet (ECaC) frakte  $\text{Ca}^{2+}$  inn i cytosol (Shahsavarani et al., 2006). Utskillelse over basalmembranen skjer via  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (NCX) og et plasmamembran protein (PMCA) (Baldisserotto et al., 2007; Farrell, 2011; Nilsson, 2016). Nivået av kalsium intracellulært holdes lavt i gjellenes ioneregulerende celler ( $< 1 \times 10^{-5}$  M). Dette gjør at opptak i gjellenes epitel  $\text{Ca}^{2+}$  komplekser som det apikale ECaC-komplekset kan skje selv om vannet har lav alkalinitet (Farrell, 2011). Det er antatt at PMCA i apikal-membranen er en begrensende faktor i opptaksmekanismen til ioneregulerende celler i gjellene (Farrell, 2011). Oppsummert vil fisken i ferskvannsfasen absorbere det meste av  $\text{Ca}^{2+}$  over gjellenes mitokondrierike-kloride celler.  $\text{Ca}^{2+}$  vil entre cellens cytosol passivt via apikale kalsium kanaler (ECaC), deretter går den over i plasma via de basolaterale kalsium transportørene NCX og PMCA (Shahsavarani et al., 2006; Liao et al., 2007). Miljøet ser ut til å påvirke hvor effektivt  $\text{Ca}^{2+}$  transporteres over kloride cellene, dette ved at blant annet ionse sammensetningen i vannet påvirker transkripsjonsfaktorer for NCX og ECaC. Disse endringene kan videre fremme eller hemme opptak av  $\text{Ca}^{2+}$ . Det er sett at nivåer av  $\text{Ca}^{2+}$  i vannet har sammenheng med cellens mRNA og protein-produksjon av strukturelle komponenter til disse kanalene, noe som indikerer at miljøet har betydning for opptak (Shahsavarani et al., 2006; Liao et al., 2007).

Hormoner som regulerer opptak av  $\text{Ca}^{2+}$  er kortisol, prolaktin og IGF-I (Insulin-Like Growth factor I). Cortisol stimulerer dannelse av mitokondrierike kloridceller med tilhørende pumpe-enzymmer. Kortisol stimulerer også dannelse av  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aser i tarmen. Prolaktin har en generelt stimulerende effekt på ione-opptakende celler i gjellene og reduserer permeabiliteten for ioner og vann i tarmkanalsystemet, som ledd i tilpasningen til ferskvann (Farrell, 2011).

I RAS systemer søker en og ha kalsium i råvannskilden, dette da det beskytter gjellene mot løste metaller i vannet. Kalsium-nivået i norsk råvann er relativt lavt, slik at en buffer som hensyntar dette vil gi ønsket effekt (Davidson et al., 2009).

## **Stanniocalsin**

Hos beinfisk reguleres homeostasen av kalsium og fosfater av hormonet stanniocalsin (STC). Generelt vil en plasmaøkning av  $\text{Ca}^{2+}$  stimulere sekresjon av STC som virker på målceller i gjeller, tarm og nyre (Greenwood et al., 2009). STC skilles ut fra nyrenes Stannius-legemer (SL). Dette er endokrine kjertler i nyret som en bare finner hos beinfisk (Greenwood et al., 2009). Forsøk har vist at dersom en fjerner SL vil hyperkalsemi inntreffe hurtig (Hanssen et al., 1989). Virkningen til STC på kalsium-homeostasen inkluderer hemming av kalsium-transporten over gjellene (So & Fenwick, 1977; Lafeber et al., 1988), redusert opptak i tarm (Sundell et al., 1992) samt en økt reabsorbering av fosfat i nyrenes proximale tubuli (Lu et al., 1994). Stanniocalcin-produserende celler er mer metabolsk aktive i saltvann, der de skiller ut mer STC. Nivået av plasma STC i saltvann, reflekterer det høye nivået av  $\text{Ca}^{2+}$  (10-100 høyere enn i ferskvann), og dermed behovet for å regulere  $\text{Ca}^{2+}$ -balansen i dette miljøet (Lu et al., 1994; Wagner et al., 1998; Greenwood et al., 2009).

## ***Biologiske buffersystem***

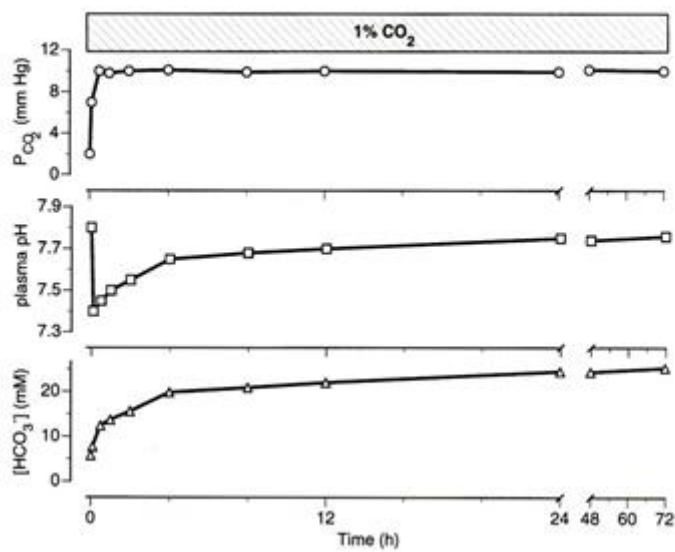
Buffersystemer fungerer som kjemiske «dempere» for svingninger i pH. Et buffersystem kan tilsettes en syre eller base uten at det skjer store endringer i pH. Biologiske buffersystem har størst kapasitet når den såkalte pKa-verdien ligger rundt kroppsvæskens normale pH. Bikarbonatsystemet er det viktigste buffersystemet når det gjelder håndtering av acidose som skyldes metabolske prosesser (metabolsk acidose), mens såkalte Non Bicarbonate Buffer Systems (NBBS, hovedsakelig svake organiske syrer) håndterer acidose som skyldes økt innhold av  $\text{CO}_2$  i kroppsvæska (respiratorisk acidose) (Figur 3. 4 og 5). Fisk kan også oppleve alkalose (forhøyet pH i plasma), men acidoser er mest vanlig.

## ***Syre/base-regulering***

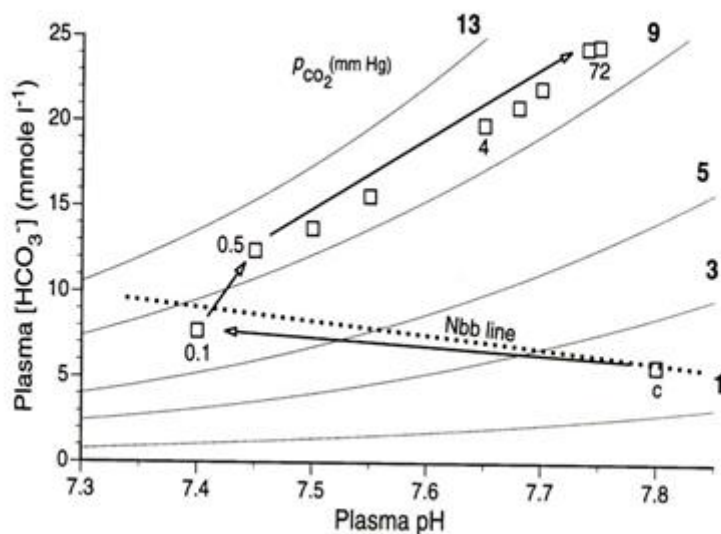
Buffring av syreoverskuddet i kroppsvæska i forbindelse med acidoser er det første trinnet i prosessen med å re-etablere normal pH intracellulært samt i plasma. Men fisken blir ikke kvitt overskuddet av  $\text{H}^+$ -ioner kun ved hjelp av buffere. Det neste trinnet i syre/base-reguleringen er derfor å skille ut overskuddet av  $\text{H}^+$ -ioner. Dette skjer hovedsakelig i gjellene, men også i noen grad i nyret (Figur 2 og 6). I gjellene er utskillelsen av  $\text{H}^+$ -ioner knyttet til utskillelsen av  $\text{CO}_2$ . Dette skjer i form av en ionebytteprosess vist i (Figur 5), der  $\text{HCO}_3^-$  skilles ut i bytte med  $\text{Cl}^-$  og  $\text{H}^+$  skilles ut i bytte med  $\text{Na}^+$  (Hyde & Perry, 1989; Evans et al., 2005). Karbonsyre-anhydrase (KA) er et viktig enzym i denne sammenheng og sørger for rask hydrering av  $\text{CO}_2$

samt katalysering av karbonsyre til  $\text{HCO}_3^-$  og  $\text{H}^+$ . KA er også delaktig i reabsorpsjon av  $\text{HCO}_3^-$  og forsuring av urinen (Figur 6) (Heisler, 1984).

Siden gjellene også er involvert i reguleringen av monovalente ioner ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Cl}^-$ ) hos både fersk og saltvannsfisk, er syre/base-reguleringen knyttet sammen med ione-reguleringen (Figur 5) (Gilmour & Perry, 2009). Dersom årsaken til forsuringen av blodet fjernes eller bortfaller vil homeostasen normalt reetableres i løpet av 2-7 døgn (Gilmour & Perry, 2009).

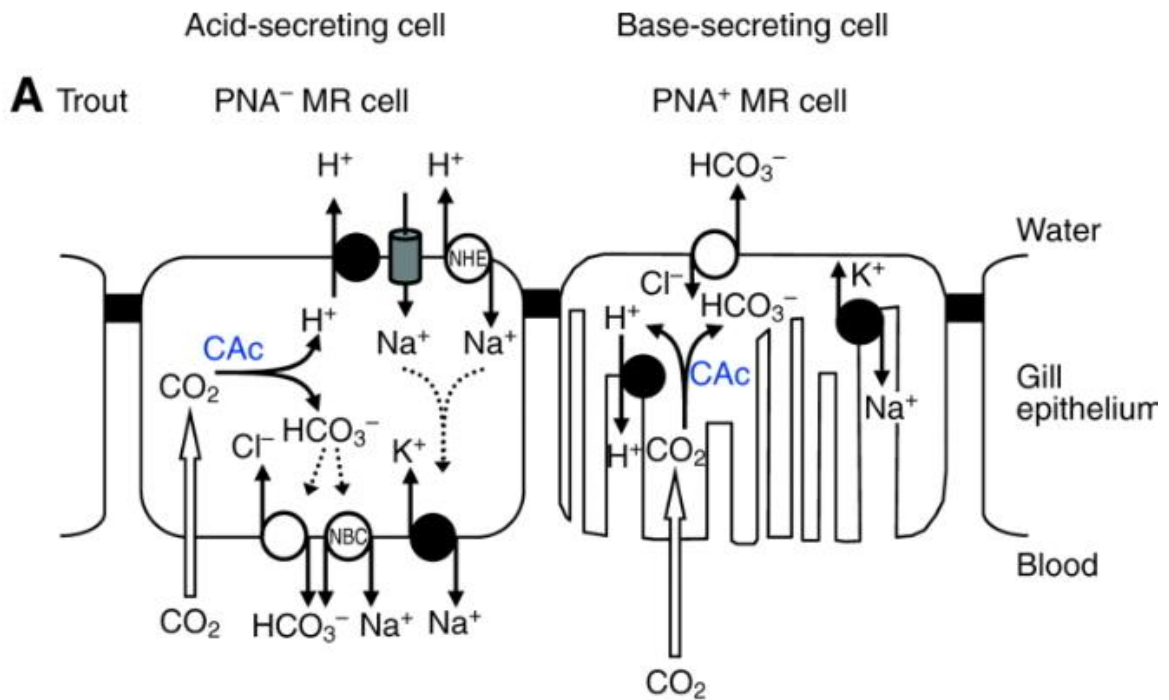


**Figur 3** Effekter av tilsetning av karbondioksid til vann på pH og bikarbonat i plasma hos fisk (Evans, 1998)

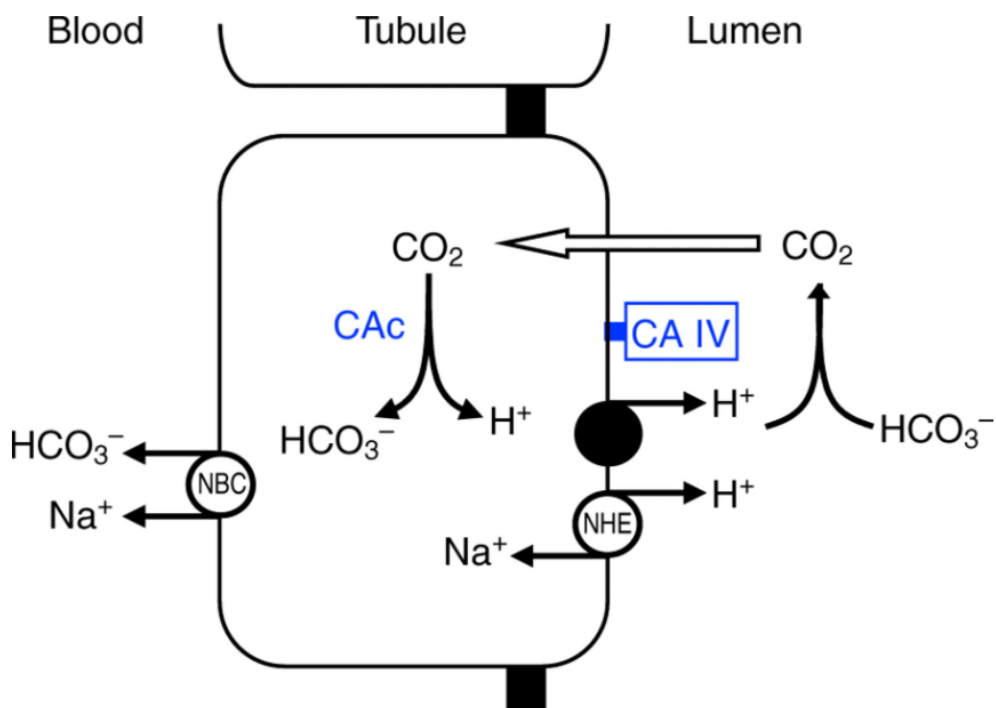


**Figur 4.** Figuren viser hvordan tilsetning av karbondioksid påvirker plasma pH i buffer-fasen (tid c til 0.1) og i regulerings-fasen (tid 0.1 til 72). Vi ser også av figuren at fallet i plasma pH i buffer-fasen følger fallet i pH kalkulert ut i fra innholdet av non bicarbonate buffer sytem (NBB). Isobarene (buede linjer) representerer forventet konsentrasjon av bikarbonat ved ulike partialtrykk av CO<sub>2</sub> i plasma for en gitt plasma pH (Evans, 1998).

Når vannet rundt fisken får en økning i salinitet, som ved overgang fra ferskvann til sjø, vil utskillelsen av HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> til tarm øke og felles ut som CaCO<sub>3</sub> (Figur 12). Dette reduserer osmolaliteten i tarmen og bidrar til absorpsjon av vann for å opprettholde osmoregulatorisk homeostase (Grosell, 2011). Når fisken sekreter HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> til tarm dannes det H<sup>+</sup> i tarmepitelcellene, som føres til gjellene og skilles ut via klorideceller (Figur 1 og 5) (Cooper et al., 2010). Ved overgang fra ferskvann til sjøvann faller pH i blodet, som fører til en kortvarig acidose (Maxime et al., 1991; Yao et al., 2021). Metabolsk acidose stimulerer også til sekresjon av SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Pelis et al., 2005).



**Figur 5.** Regulering av syre/base-balansen i gjellenes kloridceller. Karbonisk anhydrase (CA) er viktig i prosessen der karbondioksidet danner  $H^+$  og bikarbonat. Dette er en ionebytte-prosess der  $H^+$  utveksles med  $Na^+$  og  $HCO_3^-$  utveksles med  $Cl^-$ . Prosessen er viktig i forbindelse med acidoser og økt plasma  $CO_2$  (Gilmour & Perry, 2009).



**Figur 6.** Skjematisk framstilling av opptak av bikarbonat koblet til opptak av  $Na^+$  fra nefronets lumen til interstitialvæska hos fisk. Prosessen er mediert av enzymet karbonisk anhydrase (CA) (Gilmour & Perry, 2009)

### ***Stress og stressresponser***

Stress-konseptet ble først utledet av Hans Selye i 1936. Selye beskrev det kort som en generell alarmreaksjon hos organismen, og hans første definisjon av stress var at det var en «uspesifikk neuroendokrin respons i kroppen», samt at den neuroendokrine responsen til smertepåføring medførte utskillelse av katekolaminer (Rochette & Vergely, 2017). Stress kan beskrives som en forstyrrelse av homeostasen til organismen, som følge av at organismen utsettes for en biotisk eller abiotisk stressor. Stress aktiverer hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI), og har til hensikt å gjenskape organismens homeostase (Derek & Alaru, 2011). Stressorer kan være både fysiske og psykiske, som utfordrer organismens velvære og homeostase. Dette registreres av organismens sensoriske systemer og fortolkes i CNS før organismen eventuelt responderer på stressoren (Shores & Horvath, 2001). Stressorer innen oppdrett kan være aggresjon fra andre fisk (sosial stressor), predatorer, vaksinerings, sykdommer, lakselus, raske temperaturendringer i vannet, hypoksi, sub-optimal vannkvalitet osv. (Noble et al., 2018).

Vi deler stress i adaptivt stress og mal-adaptivt stress. Adaptivt stress er stress som er kortvarig og tilpasset situasjonen. Stressresponser deles videre inn i primære, sekundære og tertiære responser. Primære responser er neuroendokrine responser som utløses i løpet av sekunder (adrenalin/noradrenalin) eller minutter og timer (kortisol). Adrenalin/noradrenalin skilles ut direkte fra kromafine celler i hodenyren, som er innervert av det autonome nervesystemet. Kortisol følger deretter og skilles ut fra det interrenale cellevevet i hodenyren. Frigjøringen av kortisol er regulert av HPI (Hypothalamus-Pituitary-Interrenal)-aksen (Wendelaar, 2011). Sekundære responser som utløses er en direkte konsekvens av de primære responsene. Adrenalin og kortisol som skilles ut i primær-responsen er ansvarlig for mange fysiologiske reaksjoner. De viktigste konsekvensene er økt oksygen forbruk, redusert plasma glukose, frie fettsyrer, produksjon av laktat, samt redusert glykogen-lagre i muskel og lever. Generelt øker organismen sin metabolisme grunnet klargjøring til kamp eller flukt, og dette medfører behov for energi og oksygen (Derek & Alaru, 2011; Wendelaar, 2011). Primære og sekundære responser betraktes som adaptive for organismen, som betyr at det er en tilpassing organismen gjør for å overkomme stressor-indusert stress. Den tertiære responsen beskriver hva som skjer dersom organismen mislykkes i å gjenopprette homeostasen. Dersom stressor har kronisk karakter, vil forhøyet stress (sekundære responser) vedvare. Et plasma innhold av adrenalin, og

kortisol som ligger over de basale nivå for organismen over tid vil føre til at organismen ikke prioriterer vedlikehold, og anabolsk aktivitet i organsystemene. Over tid kan dette føre til redusert appetitt og vekst, undertrykt immunforsvar, redusert evne til forplantning og i verste fall død (Derek & Alaru, 2011).

### ***Måling av stress-parametere***

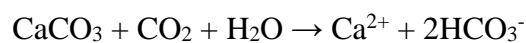
Fiskevelferd er meget komplekst og en kan ikke benytte en indikator alene for å måle om fiskevelferd er ivaretatt. Informasjon en får fra måling av stressresponser, sammenholdt med andre fysiologiske målinger som kunnskap om fiskens biologi, danner grunnlag for det kliniske bildet av en stress-situasjon. I praktisk oppdrett er det utarbeidet gode verktøy for å vurdere fiskens velferd. Dette omfatter bl.a. velferds-indikatorer som tolkes av kompetent personell. I «velferdsindikatorer for oppdrettsfisk» er nefrokalsinose oppgitt å være en individbasert, operativ velferds-indikator (Noble et al., 2018).

## Vannkjemi og laksens krav til vannmiljø

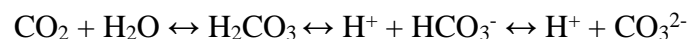
God vannkvalitet i oppdrettsanlegg er avgjørende for å ivareta fiskens velferd. Redusert vannkvalitet kan medføre at fisken blir mindre robust og sykdomsutsatt (Gullestad, 2011). Det er kjent at Salmonider er særlig sensitiv for sub-optimal vannkvalitet (Martins et al., 2011; Mota et al., 2014; Aslam et al., 2019). Forskning viser også at vannmiljøet i norske settefiskanlegg ofte er sub-optimale, noe som er antatt og bidra til utvikling av nefrokalsinose (Jensen et al., 2019; Grefsrud, 2012).

### *Alkalinitet*

Alkalinitet i en væske er væskens bufferevne og henviser til total konsentrasjon av baser som kan nøytralisere H<sup>+</sup>-ioner (Furtado et al., 2011). Bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) og karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) er i all hovedsak basene som står for total alkalinitet. Dette uttrykkes oftest som ekvivalenter til kalsiumkarbonat (mg CaCO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>). Alkaliteten i havet øker naturlig når bergarter som kalsitt, og dolomitt forvitrer. Disse binder CO<sub>2</sub> og i reaksjonen felles CO<sub>2</sub> ut som karbonater. Mineraler som Ca<sup>2+</sup> brukes i oppdrett til å binde opp løst CO<sub>2</sub> i form av bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) og karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) anioner (Tabell 2). Mineraler som kalsiumkarbonat tilføres og reagerer med vann og CO<sub>2</sub>. Sluttproduktet er Ca<sup>2+</sup> og 2HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:



Ved økende alkalinitet og dannelse av karbonater vil vannet ta opp mer CO<sub>2</sub>, grunnet forskjell i partialtrykk (Renforth & Henderson, 2017). Høy alkalinitet i inntaksvann til oppdrett kommer oftest av mye tilført karbonat fra kalkstein (Moran, 2010). I Norge er 88% av inntaksvannet hentet fra overflaten i innsjøer og har lav alkalinitet med sesongmessige svingninger. Kvaliteten på inntaksvannet er viktig med tanke på videre vannbehandling (Kristensen et al 2009). I intensivt oppdrett påvirkes pH hovedsakelig av CO<sub>2</sub> fra fiskens metabolisme, og løser seg i vannet etter følgende ligning (Furtado et al., 2011):



Høy fisketetthet fører til økt respirasjon og økte nivåer av CO<sub>2</sub>, som gir fall i pH (Ellis et al., 2002; Martins et al., 2012). Forsuring fra metabolsk aktivitet, og det faktum at norsk inntaksvann ofte har redusert pH, kompenseres ved å tilsette baser som øker pH. Buffere



inneholder ofte kationer som  $\text{Ca}^{2+}$ , magnesium  $\text{Mg}^{2+}$  og natrium  $\text{Na}^+$  som vist i (Tabell 2) (Kristensen et al., 2009).

Tilsetning av alkalinitet er vanlig i RAS, og er ansett som fremmede i produksjonen av fisk (Queiroz et al., 2004). I lukkede systemer som RAS må en ta hensyn til både fiskens, og biofilterets krav til vannmiljø. Biofilter forbruker alkalinitet og krever minimumsverdier som ligger over  $45 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$  (Biesterfeld et al., 2003). Det er biofilterets nitrifiserende bakterier som forbruker alkaliteten. For hvert gram ammoniakk-nitrogen (TAN) som oksideres til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) forbrukes cirka 4.18 gram oksygen og 7.07 gram alkalinitet (Ebeling et al., 2006). Ved å holde adekvat alkalinitet i vannmiljøet reduseres risikoen for at pH varierer utenfor fiskens toleransegrense (Furtado et al., 2014). Anbefalt alkalinitet i RAS-anlegg ligger mellom 100 og  $200 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$  for at biofilteret skal ha stabil vannkvalitet (Lekang, 2007), mens andre opererer med alkalinitet mellom 100 og  $500 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$  innenfor for oppdrett generelt (Ostrander, 2000).

Det finnes mange ulike forbindelser en kan tilsette driftsvannet for å øke alkaliniteten. Forsøk viser at kalsiumhydroksid ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) er mer kostnadseffektivt, sammenlignet med natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) og natriumbikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), og sikrer en bedre vannkjemi som ivaretar både fisk og biofilterets bakterier (Queiroz et al., 2004). Andre kjemiske forbindelser som brukes til å øke alkaliteten er natriumhydroksid ( $\text{NaOH}$ ), natriumkarbonat ( $\text{NaCO}_3$ ), kalsiumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), kalk ( $\text{CaO}$ ), dolomitt ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ), magnesiumkarbonat ( $\text{MgCO}_3$ ) og magnesiumhydroksid ( $\text{MgOH}_2$ ) (Ostrander, 2000). Forsøk med forskjellige nivåer av  $\text{CaCO}_3$  i RAS-anlegg for laksesmolt viser at lav alkalinitet ( $10 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ) gir en signifikant økning i TAN-konsentrasjon, sammenlignet med nivåer på henholdsvis 70 og  $200 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$  (Summerfelt et al., 2015). Det er også vist at vann i RAS-anlegg med høy alkalinitet (0,6-4 mM alkalinitet) og  $\text{CO}_2$  opptil  $24 \text{ mg l}^{-1}$  kan gi økt forekomst av nefrokalsinose (Fivelstad, 2013).

Vannets hardhet og alkalinitet blandes noen ganger da det er de samme enheter som benyttes, men vannets hardhet er summen av alle metallioner i vannet. Disse ionene er dominert av divalente kationer ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$ ), og siden  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  er involvert har hardt vann ofte høy alkalinitet (Lekang, 2007).

Vannets hardhet defineres av summen til kalsium og magnesium ioner uttrykt som  $\text{mg l}^{-1} \text{CaCO}_3$ . Dersom kationene kalsium og magnesium er knyttet til bikarbonat og eller karbonater sier en at hardheten er karbonat-hardhet som styres av alkaliteten.

Total hardhet defineres av kalsium, magnesium og natrium. Men karbonater binder bare til noe og alt annet bundet kalles ikke karbonat-hardhet, men kan være anioner som  $\text{SO}_4^-$  og  $\text{Cl}^-$ . For å få hardhet ned må en fjerne magnesium og kalsium ved utfelling:



For at kalsiumkarbonat skal utfelles må pH være over 10.3 (bikarbonat/karbonat overgang), for magnesiumhydroksid må pH være over 11 for utfelling.

### ***Karbon i vann***

Vi deler ioner inn i lettløselige og tungtløselige molekyler. Alkaliske salter og ammonium-ioner er generelt lettløselige. Karbonater  $\text{CO}_3^{2-}$  er tungtløselige i basiske miljø, men tilsettes  $\text{H}^+$  til løsningen (pH reduseres) vil det dannes bikarbonat  $\text{HCO}_3^-$ , slik at karbonater binder opp  $\text{H}^+$  i sure miljø. Dermed gir karbonater vannet gode bufferegenskaper. Sjøvannet inneholder mer karbonater og har dermed bedre bufferegenskaper sammenlignet med ferskvann (Figur 7 og 8). Som vist av ligning under danner atmosfærisk  $\text{CO}_2$  en naturlig buffer når det oppnår likevekt i vannet. Løseligheten defineres av Henrys gasslov:



Ved lav pH er nesten alt karbon tilstede som karbonsyre. Ved pH 6,35 ( $pK_a$  for karbonsyre) vil karbonet foreligge som 50% karbonsyre og 50% bikarbonat. Ved pH 8-9 er all karbonsyre dissosiert og alt karbon vil være i bikarbonat-form. Når pH nærmer seg 10.33, som er  $pK_a$  for andre reaksjon, vil karbonet foreligge som henholdsvis 50/50% bikarbonat og karbonat. Dette skjer fordi bikarbonatet dissosierer. Ved pH over 12 vil alt være karbonat (Figur 7 og 8). Alkalinitet er summen av  $(\text{HCO}_3^{2-}) + 2(\text{CO}_3^{2-}) + (\text{OH}^-)$  minus  $(\text{H}^+)$ . I naturlig vann vil de største karbonatformene og fritt  $\text{H}^+$  samt  $\text{OH}^-$  være største donorer.

### ***Kationer i vann***

De vanligste kationer i naturlig vann er  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , og  $\text{K}^+$ . Utover dette finnes sporforekomster av  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ . Små mengder av de sistnevnte er helseskadelig for

mennesker og kan også ha toksisk effekt for vannlevende organismer. Oksygenfattig vann kan inneholde betydelige mengder  $\text{Fe}^{2+}$  og  $\text{Mn}^{2+}$ . I forurenset overflatevann kan  $\text{NH}_4^+$  finnes. Der  $\text{NH}_4^+$  finnes i grunnvann er det ofte på grunn av at mikrobielle forbindelser har redusert  $\text{NO}_3^-$  til  $\text{NH}_4^+$ . (Fiksdal, 1982). Kalsium og magnesium er to kationer som binder til fettsyrene i såpe, dette gir utfelling og redusert vaskeeffekt. Dagens vaskemidler inneholder sulfonater som ikke danner uløselige produkter med disse kationene. Et høyt kalsiuminnhold kan ved oppvarming av vannet danne «kjelestein» ( $\text{CaCO}_3$ ). Dette er en prosess som skjer på grunn av at løseligheten av  $\text{CO}_2$  blir mindre. Likevekten forskyves mot høyre og utfelling skjer (Fiksdal, 1982):



I naturlige vannmasser har innholdet av  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  nær sammenheng med geologiske forhold i nedbørsfeltet. Innholdet av disse definerer vannets hardhet.

### ***Anioner i vann***

Innholdet av anioner i ferskvann stammer fra reaksjoner med jordsmonn og berggrunn, men kan også skyldes forurensning. Viktigste anioner i ferskvann er  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  og  $\text{HCO}_3^-$ . I tillegg finnes mindre mengder  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  og  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Klorid og sulfatinnhold kan variere avhengig av kontakt med marine avleiringer og avstand til kyst (Fiksdal, 1982). Høyt innhold av klorider kan gi korrosjon. Høye konsentrasjoner av nitrater  $\text{NO}_3^-$  kan oppstå ved oksidasjon av reduserte forbindelser som  $\text{NH}_4^+$  og  $\text{NO}_2^-$ . Høyt innhold av  $\text{NO}_3^-$  i overflatevann kan skyldes tilsig av avrenning fra jordbruk. Dersom  $\text{NO}_3^-$ -holdig vann tilføres et reduserende miljø, kan  $\text{NO}_3^-$  reduseres til  $\text{NO}_2^-$ . Dette molekylet danner nitrosohemoglobin ved reaksjon med hemoglobin, som reduserer hemoglobinet transportkapasitet for oksygen (Fiksdal, 1982).  $\text{NO}_2^-$  foreligger vanligvis i lave konsentrasjoner og da ofte som mellomprodukt i oksidasjonsprosessen av  $\text{NH}_4^+$  til  $\text{NO}_3^-$ , eller i reduksjonen av  $\text{NO}_3^-$  til  $\text{N}_2$ . Høyt innhold av fosfat indikerer forurensning/avrenning fra gjødsel eller avløpsvann (Fiksdal, 1982). Innholdet av  $\text{HCO}_3^-$  og  $\text{CO}_3^{2-}$  er viktige, siden disse ionene vanligvis utgjør vannets bufferkapasitet (Tabell 2) og (Figur 7 og 8).

### ***pH i vann***

forskjellige arter reagerer ulikt på ulik pH i vann, varmtvannsarter er mer tolerante for lav pH en for eksempel salmonider (Heath, 1995). I oppdrett av laksefisk, spesielt i RAS-anlegg, er det meget viktig og ikke ha for høy pH i produksjonsvannet, dette da høy pH øker toksisiteten til

ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ). Lav pH i RAS-anlegg kan føre til økt dannelse av giftig ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) fra ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) og kan også gi lekkasje av elektrolytter fra gjellene, og dermed osmoregulatoriske problemer (Lekang, 2007; Fjellheim & Hess, 2017). Løseligheten av metallioner øker når pH går ned og vil kunne gi toksiske effekter og respirasjonsproblemer hos fisken (Lekang, 2007). Optimal pH for atlantisk laks er antatt å være 6,5-6,7 (Noble et al., 2018), mens pH 6,2-7 anbefales i RAS-anlegg for å oppnå god fiskevelferd og god effekt av biofiltre (Villaverde et al., 1997) I RAS-anlegg er det i hovedsak råvannet,  $\text{CO}_2$  fra fiskens metabolisme, og  $\text{CO}_2$  fra biofilterets heterotrofe bakterier som senker pH. Ved å benytte buffere kan pH og alkalinitet justeres (Lekang, 2007; Fjellheim & Hess, 2017).

### ***Temperatur i vann***

Temperatur er en viktig miljøfaktor for laksefisk. Optimal temperatur er den temperaturen fisken trenger for å oppnå best vekst. Temperatur-optimum varierer med livsstadier. I havet ligger optimal temperatur for laks på rundt  $14^\circ\text{C}$  (Handeland et al., 2008), med en øvre grense rundt  $17^\circ\text{C}$ , (Hevrøy et al., 2011; Noble et al., 2018). En viktig faktor i forbindelse med temperatur er løseligheten til oksygen. Jo høyere temperatur, desto mindre oksygen. Dette gjelder gasser generelt (Noble et al., 2018).

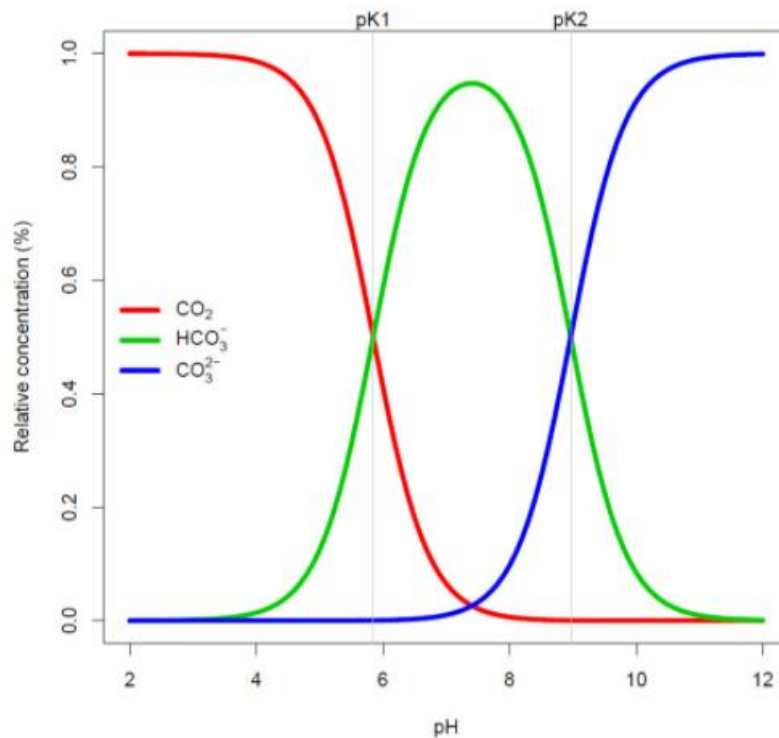
### ***Karbondioksid i vann***

Det er partielltrykket til atmosfærisk  $\text{CO}_2$  og metabolsk aktivitet hos fisken i vannet som hovedsakelig er ansvarlig for nivået av gassen i naturlige vannkilder. Noe av gassen hydreres til karbonsyre ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) i kontakt med vannet, mens resterende befinner seg i en likevekt mellom  $\text{CO}_2$  i gassform og karbonater. Likevekten til gassens konsentrasjon i vannet følger Henry Boyles gasslov. Når karbonsyren avgir protoner i vannet vil det dannes  $\text{H}^+$ -ioner, bikarbonat og karbonat (Figur 7 og 8) (Renforth & Henderson, 2017).  $\text{CO}_2$  er langt mer løselig i vann enn både  $\text{N}_2$  og  $\text{O}_2$ . Dette innebærer at små endringer i atmosfærisk  $\text{CO}_2$  gir relativt store endringer i oppløst  $\text{CO}_2$  (Fiksdal, 1982). Fisk som lever i hyperkapniske forhold vil får redusert plasma pH, økt plasmabikarbonat og redusert  $\text{Cl}^-$  og  $\text{Na}^+$  som vist av (Figur 3 og 4) (Fivelstad et al., 2003; Hosfeld et al., 2008).

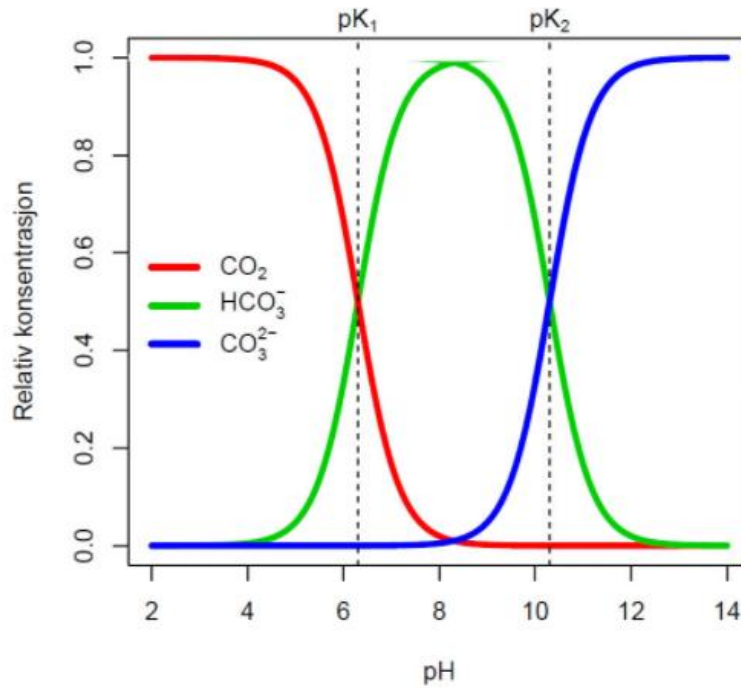
Oppdrettsfisken skiller ut 10 ganger mer  $\text{CO}_2$  enn  $\text{NH}_3$  (Sanni & Forsberg, 1996) og fører ofte til forhøyede nivå av  $\text{CO}_2$  i oppdrettsanlegg, spesielt i RAS-anlegg. Høye nivå av  $\text{CO}_2$  kan redusere fôrutnyttelse og vekst (Fivelstad, 2013). I forsøk med laksesmolt (Fivelstad, 2013) i

ferskvann med lav alkalinitet fant en at veksten ble redusert når konsentrasjonen av  $\text{CO}_2$  lå rundt 17-19  $\text{mg l}^{-1}$ , mens det i ferskvann med høy alkalinitet bare hadde mindre effekter på vekst ved konsentrasjoner opp til 24  $\text{mg l}^{-1}$ . I praktisk oppdrett er det satt en øvre grense på 15  $\text{mg l}^{-1}$   $\text{CO}_2$  som anses som trygt i forhold til fiskens vekst og velferd (Noble et al., 2018).

Ved høye nivå av  $\text{CO}_2$  kan de skadelige effektene av  $\text{CO}_2$  holdes i sjakk ved å øke vannets bufferkapasitet (alkalinitet  $\uparrow$ ). Kjemi bak dette kommer til syne fra ligningen under avsnittet karbon i vann. På den måten skapes et miljø der det meste av  $\text{CO}_2$  eksisterer som karbonat og bikarbonat (Figur 7 og 8). Akutte fall i pH kan imidlertid skyve likevekten mot venstre (Figur 7 og 8) slik at  $\text{CO}_2$  frigjøres. Dette kan i neste omgang føre til at fiskens aerobe kapasitet og evne til å håndtere stress reduseres (Khan et al., 2018).



**Figur 7** Bjerrumdiagram som viser sammenhengen mellom pH og uorganisk karbondioksid  $\text{CO}_2$ - karbonat  $\text{CO}_3^{2-}$  og bikarbonat  $\text{HCO}_3^-$  i sjøvann. I laksens pH optimum 6.5-6.7, vil det meste foreligge som  $\text{HCO}_3^-$  i sjøvann, grunnet bufferegenskaper i sjøvannet (Biovitenskap, 2020).



**Figur 8** Bjerrumdiagram som viser sammenhengen mellom pH og uorganisk karbondioksid  $\text{CO}_2$ - karbonat  $\text{CO}_3^{2-}$  og bikarbonat  $\text{HCO}_3^-$  i ferskvann. I laksens pH optimum 6.5-6.7, vil mye av det uorganiske karbonet foreligge som fritt  $\text{CO}_2$  samt som  $\text{HCO}_3^-$ , grunnet manglende bufferegenskaper i naturlig ferskvann (Biovitenskap, 2020).

## Sammensetning av fiskefôr

I naturlig tilstand har laksen en diett, tilpasset livsstadier, tilgang og behov. I oppdrett er det viktig å opprettholde laksens næringsbehov for å sikre en kostnadseffektiv produksjon med et minimalt tap av næringsstoffer som ikke tas opp i fisken (Hartviksen et al., 2014). Fiskefôr inneholder fett, protein, og karbohydrater i tillegg til vitaminer og mineraler.

Sett i et bærekraftperspektiv er det ikke ønskelig å fôre oppdrettsfisk med fôr basert på annen fisk som fôringredienser. Oppdrettsnæringen stimuleres derfor til å finne alternative kilder til fiskemel (Tran & Lebailly, 2017). Trenden innen oppdrett, både nasjonalt og globalt er at sammensetningen i fiskefôret endrer seg. Andelen fiskemel og fiskeolje i fôret går ned på grunn av stadig økende vegetabiliske substitutter til fôrmel. Laksen er en art som krever høy andel proteiner og lav andel karbohydrater, som er et betydelig innslag i vegetabiliske kilder. I et bærekraftperspektiv er det utfordrende å produsere laks av høy kvalitet uten å bruke råstoffer fra marine fiskebestander som ingredienser i fôr (Clay et al., 2000; Tacon & Metian, 2008).

### *Fiskens metabolisme*

Fiskens metabolisme kan deles i to hoveddeler; anabolisme som utgjør de biokjemiske prosessene som bygger opp enkle forbindelser til organiske molekyler og anabolisme som omfatter energikrevende prosesser i organismen. Katabolisme er det motsatte av anabolisme, og frigjør energi i organismen.

Når proteiner forbrennes skiller fisken ut nitrogenholdige metabolitter (TAN). Proteiner fordøyes i magen, og absorberes i tarmen som aminosyrer og peptider. Under nedbryting av proteiner er endeproduktene uorganiske nitrogenholdige forbindelser som  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  og urea, samt  $\text{CO}_2$  og vann (Fjellheim & Hess, 2017). I sjøvann skilles nitrogenet hovedsakelig ut som  $\text{NH}_3$  over gjellene, og i ferskvann som ammonium. Proteiner som er ufordøyelig for laksen skiller ut som organisk nitrogen via avføringen. Laksefôr inneholder 30-40% protein hvorav 10-15% er ufordøyelig. Fettandelen i foret kan enten lagres direkte eller inngå i energikrevende prosesser, som for eksempel svømmeaktivitet. Forbrenning av fett gir  $\text{CO}_2$  og vann som endeprodukter. Laksefisk er karnivore fisk og kan ikke utnytte karbohydrater i særlig grad. Karbohydrater i laksefôr benyttes som bindemiddel, og skilles i stor grad ut som ufordøyd materiale. Det som omsettes av karbohydrater har  $\text{CO}_2$ , og vann som endeprodukter (Waagbø et al., 2001; Lekang, 2007). En overgang til vegetabiliske alternativer kan skape utfordringer

ved at fordøyelsen i fisken endres, som i sin tur kan medføre dårligere opptak av både næring og sporstoffer. Dette kan kompenseres ved for eksempel å tilsette større mengder sporstoffer og mineraler, noe som kan føre til overdosering og toksiske effekter (Albrektsen et al., 2009; Thiry et al., 2012; Prabhu et al., 2020). Vegetabilske innslag i fôret har dermed gitt nye anbefalinger til innhold av mineraler og vitaminer, og i laksefor anbefales nå økt andel vitamin-C (Kyst.no, 2018; Hemre & Hamre, 2020).

Vannkvaliteten i RAS-anlegg påvirkes i særlig grad av fiskens metabolske avfallsprodukter, og større grad av vegetabilske ingredienser i laksefôret kan øke andelen ufordøyd materiale som skilles ut i driftsvannet (Lekang, 2007). Fôr basert på en høy grad av vegetabilske råstoffer vil derfor kunne påvirke renskapasiteten (biofiltre), og dermed vannkvaliteten i RAS-anlegg.

### ***Mineraler og sporstoffer i fiskefôr***

Mineraler og sporelementer er ofte grunnstoffer eller enkle kjemiske forbindelser av grunnstoffer. Det er rundt 90 slike forbindelser som tilføres fisken via fôret i større eller mindre grad. Slike forbindelser har betydning for både helse og vekst hos fisken. Mangel på fosfor gir dårlig vekst, fôrutnyttelse og beinmineralisering. Mangel på selen gir økt muskel-degenerering og økt dødelighet. Mangel på magnesium kan gi dårlig vekst, anoreksi og katarakt (Waagbø et al., 2001). Biotilgjengelighet er en viktig faktor med tanke på opptak av sporstoffer og mineraler. Tilgjengeligheten er først og fremst avhengig av at fôret fordøyes og absorberes i tarmkanal-systemet, slik at mineraler og sporstoffer kan frigjøres. Fôr som passerer tarmkanalen ufordøyd vil derfor generelt sett redusere den relative tilgjengeligheten ved at sporstoffer og mineraler følger med den ufordøyde andelen av fôret. Den faktiske tilgjengeligheten kan også være avhengig av mineralets/sporstoffets kjemiske form og mengde og tilstedeværelse av komponenter som kan hemme opptaket (Waagbø et al., 2001).

En ser at en ubalanse i mineral-forholdet, har gitt nefrokalsinose hos Langsnutet sjøhest (*Hippocampus reidi*) (Lewisch et al., 2013). Andre har pekt på direkte årsaker som høye nivåer av fosfor og selen som årsak til nefrokalsinose hos regnbueørret (Hicks et al., 1984). Lavt nivå av magnesium (Bruno et al., 1996; Chen et al., 2003), og et generelt lavt innhold av mineraler i fôret (Pope et al., 1999) er satt i sammenheng med nefrokalsinose hos fisk.

Fosfor (P) inngår i likhet med kalsium i fiskens beinstruktur, cellemembraner, og er en viktig bestanddel i DNA/RNA i alle cellevev. Opptaket av fosfor henger nøye sammen med



kalsiumreguleringen, men i motsetning til kalsium som hovedsakelig tas opp via vannet så tas fosfor opp via dietten som  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Waagbø et al., 2001). Andelen i fôret som absorberes ligger mellom 20 og 60% (Riche & Brown, 1996). For å øke opptaket av fosfor kan fôret tilsettes mixturer med bl.a. monokalsiumfosfat, som tas opp lettere i tarmen (Albrektsen et al., 2009). Fosfor som sirkulerer i blodbanen filtreres i nyret, og overskuddsfosfor skilles ut i urinen. Mangel på fosfor fører til at fosfor frigjøres fra fisken skjelett (Lekang, 2007). Hos rotter vil fosfor føre til hyperplasi i tubuli (økning i antall celler) og dermed økt størrelse på nyrene. Dette gir dyret redusert nyrefunksjon som settes i sammenheng med nefrokalsinose (Ritskes et al., 1989).

Tilgjengeligheten av fosfor i tarmen avhenger av form og løselighet for fosfor-forbindelsen. Primære uorganiske salter av fosfor som natriumfosfat har høy biotilgjengelighet hos laksen, mens fosfor bundet til kalsium (kalsiumfosfat) har lav tilgjengelighet (Nordrum et al 1997; Albrektsen et al., 2009). Kjemisk form er avgjørende for biotilgjengeligheten av fosfor, og kalsiumfosfat-salter gir ofte best opptak (Sugiura et al., 2000; Waagbø et al., 2001; Albrektsen et al., 2009).

Selen (Se) er et grunnstoff og essensielt sporstoff. Det inngår i mange biologiske prosesser hos fisk og andre vertebrater. Selen virker som en antioksidant mot frie radikaler og inngår bl.a. i immun- og betennelses-reaksjoner. Det er imidlertid et sporstoff med snevre toleransegrenser i forhold til behov og toksisitet. Toksiske nivå reduserer fôrintak og vekst. Det kan også påføre fisken oksidativt stress og forstyrrelser i fettsyresynteser (Berntssen et al., 2017). En regner Se i uorganisk form for å ha høyere toksisitet, enn den organiske formen (Thiry et al., 2012). Dietten er den viktigste kilden for Se-tilførsel, men den kan også tas opp over gjellene (Waagbø et al., 2001). Normal tilsetning til fôr varierer mellom 0.15 og 1.85 mg per kg fôr. Fiskemel inneholder naturlig rundt 1 mg Se  $\text{kg}^{-1}$ , men andelen fiskemel som benyttes i fiskefôr har sunket betydelig de siste år. Dette medfører at tilsetning av Se til fiskefôr er utfordrende å kontrollere. Et annet viktig poeng er at biotilgjengeligheten varierer i forhold til formen på Se-forbindelsen som tilsettes plantebasert fôr (Prabhu et al., 2020). Behovet for Se hos laksefisk er oppgitt å ligge mellom 0.15 og 0.38 mg per kg fôr (Hodson & Hilton, 1983) og 0.6-0.9 mg  $\text{kg}^{-1}$  hos post-smolt (Prabhu et al., 2019). Selen er nefro-toksisk og kan gi betennelse i interstitium og degenerering av tubulier, som i neste omgang kan føre til redusert evne for tubuliene til å skille ut ioner og utvikling av nefrokalsinose (Hicks et al., 1984).

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) er også et viktig mineral som inngår som kofaktor i minst 300 enzymsystemer og som deponeres i beinstrukturen hos fisk. Magnesium er også nødvendig for overføring av impulser mellom nerver og muskler. Magnesium inngår i «second messenger»-systemer i cellulære signalveier. Opptak av magnesium skjer i tarmen og/eller fra vannmiljøet, og overskudd skilles ut via nyret. I sjøvann er det høye nivåer av magnesium som fører til økt utskillelse over nyrenes tubuli (Figur 2). I ferskvann kan fisken oppleve mangel på mineralet, siden ferskvann ofte inneholder relativt lite magnesium. Kommersielt fôr inneholder rundt 1000 mg magnesium per kg fôr. Det foreligger imidlertid lite dokumentasjon om biotilgjengeligheten til magnesium (Waagbø et al., 2001).

### ***Saltfôr/Superfôr***

I de senere år er det blitt mer og mer vanlig å bruke såkalt salt-fôr i produksjonen av settefisk for å trigge osmo-/ioneregulatoriske systemer som laksen er helt avhengig av i sjøvannsfasen for å opprettholde ione- og væskebalanse. Tanken er at saltene (spesielt  $Ca^{2+}$ ) vil stimulere kalsium-sensitive reseptorer (CaSR) i tarmen, som i sin tur skal trigge de ione-/osmoregulatoriske mekanismene laksen er avhengig av etter utsett. Disse reseptorene er følsomme for  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ , og  $Cl^-$  ioner, som tilsettes foret (Tabell 1). Dermed slipper oppdretteren å benytte fotoperiodebehandling (kortdags-eksponering) for å stimulere til økt hyperosmoregulatorisk kapasitet. Dette gjør at oppdretteren oppnår en raskere vekst på smolten enn han ellers ville fått med bruk av kortdagsbehandling i en periode for å simulere «vinter» under fotoperiodebehandlingen. utfordringer med lys/mørke signaler er blant annet at fisken reduserer forinntaket med opptil 30% (Stefansson et al., 2008). Fortløpende fôring med saltfôr vil også gi oppdretteren et større «vindu» der fisken kan leveres til kunde (Gravdal, 2017). Saltfôr trekkes imidlertid fram av Pharmaq Analytiq som en av årsakene til økt utbredelse av nefrokalsinose hos settefisk (Dalum, 2019).

Innholdet av kalsium i vanlig oppdrettsfôr ligger mellom 8000-30000 mg  $kg^{-1}$ , basert på mengde  $Ca^{2+}$  i askeinnhold til fiskemelet som benyttes. I ferskvann er innholdet omtrent 15 mg  $l^{-1}$  mens det for saltvann ligger rundt 400 mg  $l^{-1}$ . Laksens minimumsbehov for kalsium er i litteraturen mangelfullt beskrevet, men for regnbueørret ligger det på rundt 300-2400 mg  $kg^{-1}$  fôr (Waagbø et al., 2001). Saltfôr inneholder mellom 20000 og 26000 mg per kg fôr. Dermed utgjør  $Ca^{2+}$  mellom 60 og 70 % av det totale mineralinnholdet i saltfôr (Lyngøy, 2019; FAO, 2021). Forsøk har også vist at diett tilsatt  $Ca^{2+}$  og kadmium hemmer mRNA syntesen av  $Ca^{2+}$

proteiner som ECaC og NCX hos regnbueørret (Galvez et al., 2007). Funksjonen av disse kanalene er beskrevet under opptak av kalsium

Tabell 1 Eksempel på mineralsammensetning i saltfôr (FAO, 2021)

Mineral	Element concentration <sup>4,5</sup> (mg/kg of feed)	Amount of supplement (g/100 kg of feed)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (9.9% Mg) <sup>2</sup>		
NaCl (45.6% Na) <sup>3</sup>		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (32.5% Mn)	30	9.23
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (20.1% Fe)	60	29.85
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (22.7% Zn)	75	33.03
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (25.5% Cu)	5	1.96
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (45.6% Se)	1	0.22
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (24.8% Co)	1.5	0.61
Ca(IO <sub>3</sub> ) H <sub>2</sub> O ( 65.1% I)	2	0.33
Carrier		924.77
Total		1000

## Nefrokalsinose (Urolitiasis)

Nefrokalsinose er en kronisk betennelses-lidelse som skyldes utfelling av kalkholdige forbindelser i nefroner og samlerør, plassering og utseende vist på (Figur 2. 9 og 10). Hos salmonidene skjer utfellingene i nefronets distale tubuli (se Figur 2) og samlerør. Utfellingene er sammensatt av kalsium og andre mineraler som hydroxyapatite (Klosterhoff et al., 2015). Avleiringene er ofte visuelt synlig som hvite, langsgående striper (Figur 9 og 10). Nyret kan også svulme opp og bli knudrete. Forandringene kan bli svært uttalte, og nyrets funksjoner kan bli kraftig redusert (Poppe et al., 1999). Diagnosen stilles ved at tidlige forandringer kan avdekkes mikroskopisk (histopatologisk), og viser seg som utfellinger av kalkholdig materiale (Figur 11) (Dalum, 2019). Slike utfellinger er vanlig i tarm, som en del av en naturlig kalsium-sekresjon i sjøvann (Figur 12). Utfellingen medfører dilatasjon og eventuelt ruptur av tubuli, med påfølgende fibrosedannelse, betennelsesreaksjon og eventuelt granulomdannelse i omkringliggende vev (Bruno et al., 2013). Hos oppdrettslaks opptrer nefrokalsinose som regel i ferskvannsfasen og det rapporteres om at post-smolt/stor-smolt er særlig utsatt (Gjessing, 2020; Grefsrud, 2021)



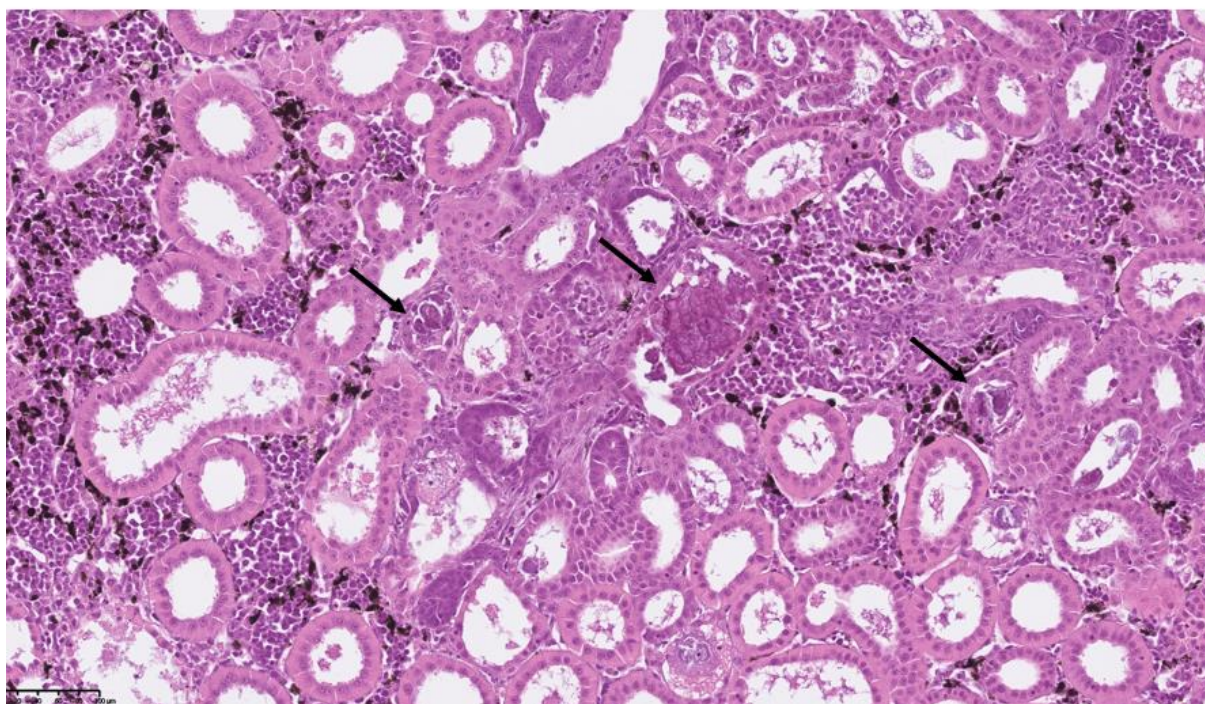
**Figur 9** bildet viser moderat utfelling i nyretubuli definert som nefrokalsinose. Dette er mest uttalt i bakre del av nyren som står for utskillelse av urin (Nielsen, 2021)



**Figur 10** Bildet viser uttalt nefrokalsinose i midtre og bakre del av nyren hos smolt. Tubuli og samlør er affiserte (Nielsen, 2021).

Det eksisterer begrenset dokumentasjon på hva utfellingene hos fisk består av, men mineraler som kalsium og magnesium nevnes som viktige komponenter (Bruno, 1996). Forsøk gjort med arten *Cobia (Rachycentron canadum)*, viste at den kjemiske sammensetningen av utfellingene bestod av rent kalsium (65%), oksalat (15%), kalsiumfosfat (16%) og u-spesifikke salter (4%) (Klosterhoff et al., 2015). Kaliumkarbonat og oksalat ( $C_2O_4^{2-}$ ) trenger høy pH for utfelling og det er vist at karbonat-dannelse i tarmen hos teleoster skjer ved pH 8-9 (Figur 12) (Whittamore, 2020). Oksalat er et metabolsk avfallsprodukt som dannes i nyrene. Høy andel oksalat i urinen (hyperoksaluri) kan gi oksalat-overmetning, og dersom pH i tubuli er høy vil dette predisponere for utfelling. Hyperoksaluri kan komme fra dietter med mye oksalat eller dens forløpere, men også defekter i oksalat-metabolismen (Asplin, 2002; Whittamore, 2020).

## Nefrokalsinose – laks, 80 g



**Figur 11** Viser histopatologisk snitt av nyren. Lyse felt er tubuliene. Pilene indikerer utfellingene og skader på tubuli epitelceller (Olsen, 2021)

Hos pattedyr inkludert mennesket, er det vist at nyrestein ofte består av kalsiumoksalat (CaOx) og kalsiumfosfat (CaP) (Sand et al., 2001; Han et al., 2019). Nefrokalsinose er relatert til økning av kalsium og/eller oksalat i urinveiene. Steinene felles ut som følge av lav pH i urinen, høy andel urinsyre, lav GFR, lav konsentrasjon av citrat i urinen, lav serum bikarbonat eller høy kalsium-konsentrasjon i urinen (Evenepoel et al., 2015). Det er vist at kalsium inngår i 85 % av tilfellene. I de tilfeller der kalsium ikke er involvert, er høy urinsyrekonsentrasjon og aminosyren cystein involvert. Det er også sett at infeksjoner leder til nyrestein. Infeksjonene er kalt Struvit-steiner, eller magnesium-ammonium-fosfat-steiner. Disse felles ut på grunn av urease-splittende bakterier, (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella Pneumonia*, *Pseudomonas* og *Staphylococcus epidermidis*). Sistnevnte årsak utgjør 10-15 % av nyrestein-tilfellene i humanmedisin (Schulsinger, 2015). Hos mennesket skiller en mellom intratubulær type og interstitiell type (Vervaeet et al., 2009).

Urinens pH (normalt pH 6) spiller en viktig rolle for dannelse av nyrestein hos mennesket. Stoffene som inngår i nyrestein hos pattedyr er CaOx og CaP. CaOx krystalliserer ved lavere

til nøytral pH i urinen, mens CaP krystalliserer ved litt høyere pH (Khan et al., 2008). Urinsyre har en pKa-verdi på 5,7, og kan dermed felles ut av nyrens relativt basiske miljø (Borup, 2014). Sagt på en annen måte vil dannelse av nyrestein skje, når konsentrasjonen av nyresteinens komponenter, overgår løseligheten for komponentene. Det oppstår en supermettet løsning og mindre væskemengde samt endringer i pH kan føre til umiddelbar utfelling.

### ***Antatte årsaker til nefrokalsinose***

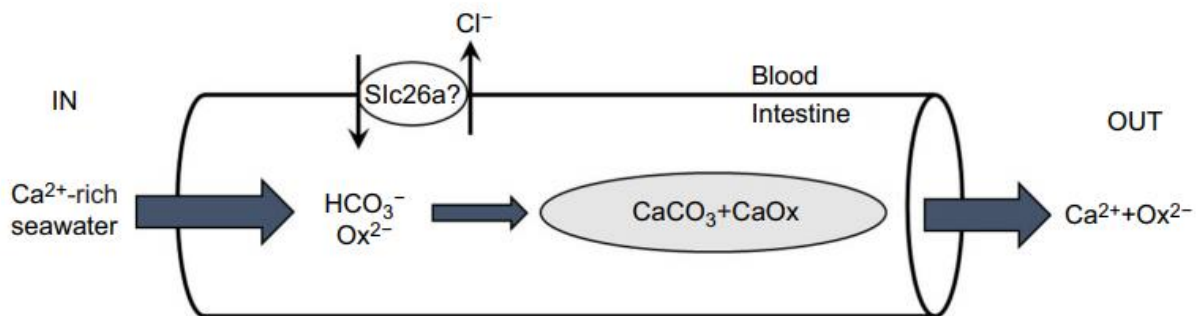
Hos laks er nefrokalsinose etter hvert blitt et kjent fenomen (Fivelstad et al., 1999; Fivelstad et al., 2003; Fivelstad et al., 2018; Gjessing et al., 2018; Jensen et al., 2019; Gjessing, 2020). Nefrokalsinose er også godt kjent blant andre arter, som det også drives oppdrett på. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Chen et al., 2003). Havabbor (*Dicentrarchus labrax*) (Arciuli et al., 2015), og torsk (*Gadus morhua*) (Damsgard et al., 2011) er alle arter der en har observert nefrokalsinose.

Det antas at et høyt innhold av bikarbonat i urinen, sammen med høy pH i urinen, vil predisponere for nefrokalsinose (Smart et al., 1979). I tarmen hos marine teleoster er miljøet høyt på alkalinitet, gjerne med en pH på rundt 8.4-9 (Figur 12) (Whittamore, 2020). Her foregår det også en sekresjon av  $\text{HCO}_3^-$  som legger til rette for dannelse av karbonatene til  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  (Figur 12) (Whittamore, 2020), og derved ekskresjon av disse mineralene. Dette bidrar til å opprettholde ione-balansen i fiskens intra- og ekstracellulærvæske (Wilson et al., 2002). Dette bidrar også til å redusere plasma  $\text{CO}_2$ , siden karbonisk anhydrase spalter  $\text{CO}_2$  til  $\text{HCO}_3^-$  og  $\text{H}^+$  og kan derfor være en del av syre/base-reguleringen hos fisk i saltvann (Figur 12) (Wilson & Grosell, 2003).

I saltvann skilles det meste av divalente ioner ut via nyren (Figur 2), samtidig som GFR er lav (Evans, 1993). Dette gjør at konsentrasjonen av divalente kationer kan bli høy i tubuli. Ved høye konsentrasjoner av  $\text{HCO}_3^-$ , som filtreres ut i urinen, kan  $\text{Ca}^{2+}$  reagere med  $\text{HCO}_3^-$  og danne utfellinger av kalsium-karbonater i nyret (Wilson & Grosell, 2003).

Det er antydning at et høyt nivå av  $\text{CO}_2$  i settefisk oppdrett, kan være en årsak til utvikling av nefrokalsinose hos atlantisk laks (Fivelstad et al., 2003; Fivelstad et al. 2013; Good et al., 2018). I lukkede oppdrettssystemer som RAS er det ofte høye verdier av  $\text{CO}_2$  der en ser utfellinger av kalsium-forbindelser i nyret hos fisken (Fivelstad et al., 2018). Dette skjer på tross av at laksen har høy urinføring i ferskvann, i motsetning til i saltvann. Dette kan være med å bidra til at

forbindelser som ellers ville bli deponert i nyretubuli, for eksempel oksalat-forbindelser, blir skylt ut med urinen. Dette problemet har neppe saltvannsfisk siden utskillelsen av oksalat skjer via tarm sammen med kalsium-karbonat. Fisken drikker saltvann og ionene følger svelg og tarmkanal (Figur 12) (Whittamore, 2020). Mekanismen hos marine telesoster der de feller ut divalente kationer som karbonater i tarmen er lite beskrevet, men (Figur 12) viser hvordan karbonatet byttes mot  $\text{Cl}^-$  og binder seg til  $\text{Ca}^{2+}$  for så å konjugere seg til  $\text{CaOx}$  (Whittamore, 2020).



**Figur 12** Viser måte kalsium og oksalat skilles ut i saltvann. Bikarbonat transporteres inn i lumen fra blod i bytte med  $\text{Cl}^-$ . Dette skjer i kanal proteinet *Slc26a*. i tarmen binder bikarbonatet til kalsium og danner kalsiumkarbonat som konjugeres med oksalat og skilles ut over gatt (Whittamore, 2020)

Hos mennesket betraktes nefrokalsinose som en multifaktoriell lidelse, der metabolisme, genetik og livstil er viktige utløsende faktorer. De kan løse ut alene eller i kombinasjon. Det er i litteraturen også nevnt at utløsende årsaker kan være kosthold, høyt inntak av kalsium, tilskudd av oksalat og vitamin-C (metaboliseres til oksalat), lavt nivå av citrat (hemmer krystallisering av forbindelser), dehydrering, diett, medisiner, lite kroppsbevegelse og anatomiske faktorer (Schulsinger, 2015; Han et al., 2019).

Årsaker hos fisk er muligens like sammensatte som hos pattedyr. I forsøk med Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) der det var høy fisketetthet ( $110 \text{ kg m}^{-3}$ ). Ble det etter 4 måneders drift, funnet uttalt nefrokalsinose hos fisken i anlegget. Alkaliteten ble grunnet manglende pH kontroll justert underveis. Først ble alkalinitet justert med en buffer av natrium-karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) som deretter ble byttet med kalsium-karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ). Begge buffere førte til nefrokalsinose hos fisken (Wooster et al., 2001).



### ***Behandling og prognose***

En har i dag ikke noe klart definert behandlingsregime for nefrokalsinose hos laks. Dersom tilstanden er mild til moderat, og årsaken fjernes, vil fisken muligens klare å leve med redusert nyrefunksjon. Laks som ikke har pådratt seg irreversible skader med nefrokalsinose ser ut til å komme seg etter utsett i sjøen. Fisk har imidlertid evne til å reparere skader i nyrene, såkalt neo nefrogent potensiale (Watanabe et al., 2009; Davidson, 2014), som kan bidra til økt overlevelse etter en nefrokalsinose-belastning (Klinck & Wood, 2013).

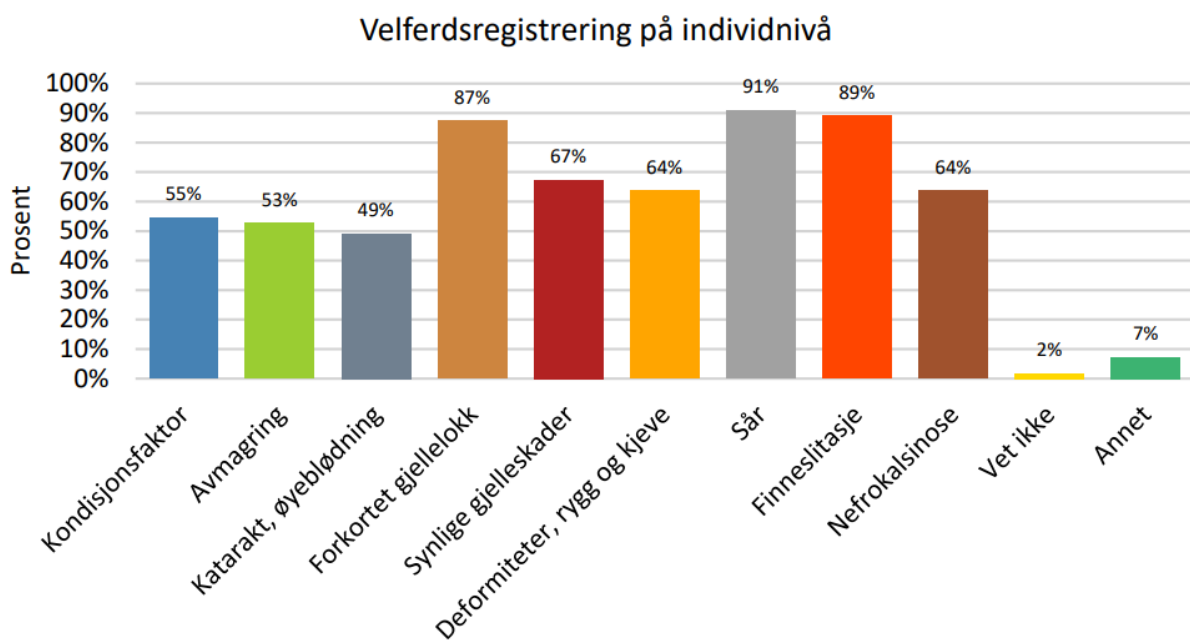
Hos pattedyr er det mulig å reversere/fjerne lidelsen ved å øke væskeinntaket (Sand et al., 2001). Andre viktige funn fra humanmedisin er påvisning av spesifikke reseptorer på celleoverflaten i nyretubuli som mineralkrystaller kan binde seg til. Oppregulering av disse reseptorene kan fremme binding i startfasen av nefrokalsinose-utviklingen (Verkolen et al., 2000; Yasui et al., 2002; Verhulst et al., 2003), men affiniteten til reseptorene kan hemmes av nefrokalsin, citrat og glukosaminglykaner (Sayer & Sommons, 2002).

## Fiskevelferd i oppdrett

Oppdrett av laks og andre fiskearter i Norge er strengt regulert, i blant annet. Dyrevelferdsloven og Akvakulturloven, som legger klare føringer i forhold til hva en kan/skal gjøre, og ikke kan/skal gjøre, med tanke på omgang med oppdrettsfisk. I Dyrevelferdsloven heter det bl.a.:

§24-a «*dyr skal beskyttes mot skade, sykdom, parasitter og andre farer. Syke og skadde dyr skal gis forsvarlig behandling og avlives om nødvendig*» (Lov om dyrevelferd)

Krav til fiskevelferd finner en også i Akvakulturdriftsforskriften § 6. Slakteriforskriften § 11 og Transportforskriften § 12 (Lovdata). En viktig intensjon bak lovene er at oppdrettsfisk skal ha det bra og på linje med det som gjelder for hold og produksjon av dyr i landbruket. God fiskevelferd er en forutsetning for at fisken skal takle sykdommer og stressorer (Segner et al., 2012). Fiskevelferd kan defineres på flere måter, men som regel gir godt dyrehold også god fiskevelferd. God fiskevelferd gir i sin tur som regel også god økonomi (Noble et al., 2018). Myndighetenes krav til godt dyrehold i fiskeoppdrett skaper derfor en vinn-vinn situasjon for oppdretteren.



**Figur 13** Viser forekomsten av ulike indikatorer på individ nivå. Nefrokalsinose er hyppig brukt (64%) som rapportert indikator som måles i oppdrett. Samlet er dette de vanligst kriteriene for å måle fiskevelferd hos laksen. Lidelsen er ikke smittsom dermed er 64 % et relativt høyt tall som kan si noe om miljøet fisken lever i (Jensen et al., 2019)

I lukkede systemer som RAS er utfordringene til fiskevelferd knyttet til biologisk-sikkerhet, vanntilførsel, miljøsvingninger og rutiner (Noble et al., 2018). Nefrokalsinose hører inn under miljøbaserte velferdsindikatorer og påvirker enkeltindivider og ikke populasjoner, siden dette ikke er en smittsom lidelse. Men en ser ofte at en større andel av en fiskegruppe er affisert når nefrokalsinose først inntreffer i et anlegg (Noble et al., 2018).

## Intensiv settefiskproduksjon - RAS

Lukkede anlegg tas i bruk i stadig større grad for å produsere laksesmolt i Norge. Dette er en anleggstype som domineres av RAS-konseptet og som så langt har vært en suksess i norsk settefiskproduksjon og i Europa for øvrig (Bergheim et al., 2009). Denne driftsformen gir god vekst på fisken, lavt fôrforbruk, lav dødelighet forårsaket av typiske bakterie- og virus-sykdommer samt mulighet for jevn levering av smolt gjennom hele året (Nilsen et al., 2020).

### *RAS anlegg - driftsrutiner*

Drift av RAS-anlegg krever en langt dypere og bredere biologisk, kjemisk og teknologisk kompetanse, sammenlignet med drift av tradisjonelle gjennomstrømningsanlegg. Dette skyldes først fremst, at produksjonen i RAS-anlegg er basert på gjenbruk av produksjonsvannet (ofte rundt 95%). Dette stiller store krav til mekanisk og biologisk rensing av avløpsvannet, før det sendes ut i anlegget på nytt. Renseprosessene er imidlertid ikke 100% effektive og en konsekvens av dette er opphopning av avfallsstoffer i driftsvannet. Dette gjelder først og fremst CO<sub>2</sub> (fra fisk og biofiltre), og nitrogenholdige avfallsstoffer fra fiskens metabolisme. Også andre stoffer som enten skilles ut av fisken eller som lekker fra fôret, kan akkumuleres og forurense vannet, dersom de ikke blir fjernet. Økt innhold av CO<sub>2</sub> vil endre driftsvannets pH og krever vanligvis tilsetning av buffer for at driftsvannet skal holde stabil pH (Fjellheim & Hess, 2017).

Vannmiljøet i settefiskanleggene er ofte sub-optimale sett i fra fiskens ståsted. Ifølge risikovurderinger av norsk fiskeoppdrett oppgir nesten 30% av anleggene at de har hatt en eller flere episoder med dårlig vannkvalitet, og nesten 20% oppgir at de har hatt vedvarende sub-optimal vannkvalitet. Samme rapport etterspør data og statistikk på vannmiljø, og konsekvenser av dette. Nefrokalsinose er ifølge rapporten et økende problem det mangler god statistikk på. Nefrokalsinose vurderes til å ha et moderat omfang, samt at det ikke er en unormal tilstand settefisk-fasen. Det vurderes også som positivt at overlevelse etter sjøutsett er relativ høy (Gjessing et al., 2018). Av fiskehelse rapporten (2018) framkommer det at nefrokalsinose har en økende trend i RAS.

### ***Fisketetthet i RAS***

Tetthet av fisk er en viktig parameter som påvirker lønnsomheten i RAS-anlegg. I utgangspunktet ønsker en holde høyest mulig turnover, med lavest mulig kostnader (Nilsen et al., 2020). Maksimal tetthet bestemmes ofte ut ifra de begrensinger som vannutskiftingen setter. Hensyn som må ivaretas i denne sammenheng er bl.a. kravet til god vannkvalitet, tilgjengelighet av fôr og naturlige sosiale interaksjoner hos fisken (Ellis et al., 2002). For høy fisketetthet virker negativt på fiskevelferden (Turnbull et al., 2005; Macintyre et al., 2008). Maks tetthet er antydnet å ligge rundt 80-100 kg fisk per m<sup>3</sup> (Thorarensen & Farrel, 2011; Sveen et al., 2018), mens optimal fisketetthet er antydnet å ligge rundt 75 kg per m<sup>3</sup> (Calabrese, 2017).

Fisketettheten er koblet opp mot det spesifikke vannforbruket (SWC) og høy fisketetthet med lavt SWC er vist og ha negative effekter på fiskens helse og velferd. Minimum SWC som kreves for å fjerne CO<sub>2</sub> og andre metabolitter på en tilfredsstillende måte varierer noe ifølge litteraturen, men er antydnet å ligge rundt 0.06-0.12 l kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Forsberg, 1995), 0.07-0.2 l kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Nilsen et al., 2017) og 0.3 l kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Calabrese, 2017). Det er ikke funnet litteratur som omtaler anbefalt fisketetthet, annet enn at en ivaretar god vannkjemi ved å ha fisketettheten lav og vannutskifting høy.

### ***Produksjon av stor-smolt i RAS***

Produksjon av såkalt stor-smolt mellom 100 og 1000 g er en økende trend i norsk settefiskproduksjon. Hensikten er å korte ned tiden fisken er i sjø, og dermed redusere risikoen for sykdommer og parasitter som lakselus. Storsmolt-produksjon er mer arealkrevende enn normal smolt-produksjon og også mer kompetanse-krevende (Holan & Kolarevic, 2015). Slik produksjon har foregått i 5-10 år her i landet og det har vært en klar dreining mot bruk av RAS-systemer for produksjon av stor smolt (Bjørndal et al., 2018). Storsmolt-produksjonen har sine utfordringer og nefrokalsinose er et problem som ofte er nevnt. Det er særlig vannutskifting og kontroll på CO<sub>2</sub> som produsentene sliter med i storsmolt-produksjonen. En ser også at det er rett etter utsett i sjøen at dødeligheten er høyest. Det er også sett sammenheng mellom hemoragisk smoltsyndrom HSS og nefrokalsinose i denne produksjons-formen. Fiskeri og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF) har derfor bevilget midler til et pågående prosjekt «Stonehunt», der nefrokalsinose og HSS skal kartlegges. Tema som skal kartlegges i tillegg til HSS er storsmoltens fysiologi, vannmiljø og produksjonsfaktorer (Gjessing et al., 2018; Gjessing, 2020) .

### ***Biofiltre i RAS***

Biofilterets funksjon er å fjerne ammoniakk/ammonium (TAN; Total Ammonia Nitrogen) fra fiskens metabolisme. Ammoniakk finnes i ionisert form som  $\text{NH}_4^+$ , og i uionisert form som  $\text{NH}_3$ . Uionisert ammoniakk diffunderer lettere over cellemembraner og er svært giftig for fisken. Hvilken form det foreligger mest av er avhengig av pH. Høy pH (>8.2) skyver likevekten mot  $\text{NH}_3$  (Furtado et al., 2014).

Fjerning av ammoniakk skjer ved hjelp av bakterier i biofiltre som konverterer TAN til nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) og videre til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ved hjelp av oksiderende bakterier (Martins et al., 2010). Rester av nitrat og nitritt kan videre konverteres til nitrogen-gass ( $\text{N}_2$ ) av nitrifiserende bakterier (Colt, 2006). Dette gjør at en får en god kontroll på anleggets indre omsetning av nitrogenholdig avfall og hva en slipper ut til det ytre miljø (Ytrestøy et al., 2015).

### ***Vannkvalitet i RAS***

Inntaksvannet i RAS-anlegg kan være fra ulike kilder som elv, innsjøer, grunnvann og sjøen. Rundt 70% bruker vann hentet fra overflaten i innsjø som den primære vannkilden, og 29% at elv er den primære kilden (Jensen et al., 2019) Uavhengig av vannkilde må vannet behandles før det sendes ut i anlegget. Oksygenering, desinfisering, lufting, pH-justering, fjerning av suspendert materiale og oppvarming eller nedkjøling er vanlige behandlingsrutiner for inntaksvann. Behandlingen foregår i en rensesløyfe før vannet kommer i kontakt med fisken. Behandlingen av både inntaksvann og driftsvann skjer kontinuerlig for å opprettholde optimal vannkvalitet (Bjerknes, 2007; Lekang, 2007; Fjellheim, 2009).

### ***Alkalinitet i RAS***

Alkalitet er et mål på vannets buffer kapasitet og bør ikke ligge under  $45 \text{ mg l}^{-1}$  (målt i  $\text{CaCO}_3$ ) i RAS-anlegg (Biesterfeld et al., 2003) Anbefalt alkalinitet over minimums-nivå i RAS-anlegg er mellom  $100$  og  $200 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCO}_3$  for at biofilteret skal ha stabil vannkvalitet (Lekang, 2007), mens andre opererer med alkalinitet mellom  $100$  og  $500 \text{ mg l}^{-1}$  innenfor oppdrett generelt (Ostrander, 2000).

Norsk inntaksvann har lav alkalinitet, og lav alkalinitet fører normalt til høyere nivåer av TAN, sammenlignet med høyere alkaliteter. Andre utfordringer ved for lav alkalinitet er at en relativt liten mengde syre kan gi store endringer i pH. I RAS er dette veldig negativt og kan få store konsekvenser med tanke på giftigheten til TAN-metabolitter. Med tanke på nefrokalsinose er

det usikkert hva alkaliteten gjør med patogenesen. Det er mulig at mengde, type, og hvilken form alkaliteten foreligger i kan ha innvirkning på nefrokalsinose. I RAS er det ønskelig med stabil alkalinitet av hensyn til både biofilter og fisk (Fjellheim, 2009).

Navn	Kjemisk formel	Løselighet/hastighet for løselighet
Lut	NaOH	høy/rask
Natrium-karbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	høy/rask
Natrium-bikarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	høy/rask
Kalsium-karbonat	CaCO <sub>3</sub>	moderat/moderat
Brent kalk	CaO	høy/moderat
Hydrat kalk	Ca(OH) <sub>2</sub>	høy/moderat
Sjøvann		høy/rask

*Tabell 2. Tabellen viser de vanligste buffere som benyttes for å øke alkaliteten i settefiskanlegg. Grunnet at sjøvann også brukes som buffer er den medtatt. Videre viser den at løseligheten varierer. Der basen er natrium er løseligheten høy og rask sammenlignet med buffere der basen er basert på kalsium. Sjøvann har også høy og rask løselighet (Fjellheim, 2009).*

## Fjerning av CO<sub>2</sub> i RAS

Akkumulering av CO<sub>2</sub> i RAS er som nevnt et uttalt problem som skaper utfordringer i slike anlegg. Høye CO<sub>2</sub>-nivå i vannet reduserer pH, dersom bufferevnen er lav (Figur 7 og 8) og kan føre til redusert oksygenopptak og forstyrrelser i syre/base-reguleringen hos fisken (Figur 4. 5 og 6), samt sekundære skader pga. forsuring av vannet. Høyt innhold av CO<sub>2</sub> settes også, som tidligere nevnt, i sammenheng med nefrokalsinose.

Fjerning av CO<sub>2</sub> i RAS skjer ved at vannet luftes. Prinsippet går ut på å øke vannets overflate slik at gassen kan diffundere passivt ut av vannfasen. Det er forskjellen i gassens partialtrykk i vannet, og gassens partialtrykk i atmosfærelufta som driver gassen ut av vannfasen. Denne

forskjellen kan økes ved å skape et svakt undertrykk i rommet gassen luftes ut til (Lekang, 2007; Moran, 2010).

I rapporten «Velferd i settefiskproduksjon har 40 % av respondentene N=55 oppgitt at de benytter seg av CO<sub>2</sub> lufter på hele anlegget. 38 % på deler av anlegget og 22 % svarte at de ikke brukte lufter. Lufterne skal holde CO<sub>2</sub> under anbefalt nivå (15 mg/L) noe som er viktig når det tilsettes rent oksygen til vannet (Jensen et al., 2019). Ved lufting er det også viktig å ta hensyn til hvilken form karbonet har, noe som avhenger av temperatur, salinitet og pH (Figur 7 og 8) (Moran, 2010).

Ionisk sammensetning påvirker hvor lett CO<sub>2</sub> lar seg lufte ut. I saltvann vil en større andel av det uorganiske karbonet hele tiden ioniseres til CO<sub>2</sub>. Dette gjør det vanskelig å lufte ut gassen i saltvann (Moran, 2010).



## Diskusjon

Nefrokalsinose er en betennelsesaktig lidelse som skyldes avsetninger av kalkholdig materiale i fiskens nyre (Figur 9, 10 og 11). Lidelsen er dokumentert og beskrevet hos en rekke fiskearter, inkludert atlantisk laks, og synes i all hovedsak å opptre i intensiv produksjon av fisk i fangenskap. Ifølge Mattilsynet er dette et økende problem i norsk lakseoppdrett, spesielt i forhold til produksjon av settefisk i ferskvannsfasen (Gjessing et al., 2018; Jensen et al., 2019). Nefrokalsinose er imidlertid ikke en meldepliktig lidelse og det er derfor noe usikkert hvor stort dette problemet er i norsk lakseoppdrett (Grefsrud, 2021; Mattilsynet, 2015).

Den økte utbredelsen av nefrokalsinose de senere år har skjedd i en periode der produksjonen av settefisk har blitt stadig mer intensiv, med bruk av høye vanntemperaturer (relativt sett), økt vekst og kortere produksjonssyklus, og ikke minst som følge av implementering av RAS. Det er derfor nærliggende å tro at økningen i nefrokalsinose i norsk lakseoppdrett de seneste år henger sammen med denne utviklingen, og at problemet i stor grad kan tilskrives sub-optimale miljøforhold for fisken som følge av den intensive produksjonen. Dette gjelder spesielt i forbindelse med bruk av RAS og sjøvannstilsetning som kan legge til rette for utvikling av nefrokalsinose (Grefsrud, 2021) på grunn av akkumulering av komponenter som inngår i utfellinger i nyret hos laksen.

Selv om nefrokalsinose som lidelse er godt beskrevet for laksefisk, mangler det fortsatt mye kunnskap rundt årsaker og virkningsmekanismer som ligger bak. For bedre å kunne legge til rette for et forebyggende vannmiljø og eventuell behandling, må en ha bedre kjennskap til den eksakte patofysiologien og mekanismene som forårsaker nefrokalsinose. Videre er det viktig med inngående kunnskap om utfellingenes kjemiske sammensetning, siden dette kan påvirke tiltak rettet mot forebygging og behandling. Dagens metoder for diagnose av nefrokalsinose bør også gjøres raskere og non-invasive (Poppe et al., 1999; Thomsen, 2019). Det eksisterer mye kunnskap om nefrokalsinose hos pattedyr, men overførbarheten fra pattedyr til beinfisk er noe usikker, all den tid fiskenyret har en litt annerledes anatomi og fysiologi sammenlignet med pattedyr (Resende et al., 2010).

Nefrokalsinose er definert som en multifaktoriell lidelse, der etiologi og patogenese ikke er fullstendig kartlagt. Litteraturen antyder at utfellinger kan utløses av en rekke ulike faktorer som sykdom, infeksjon, genetikk, metabolske prosesser, forgiftning, miljømessige faktorer,

førsammensetning, parasitter og vannkjemi (Lewisch et al., 2013). Bildet er derfor ganske komplekst. For å forstå hvorfor og hvordan nefrokalsinose oppstår må en ta utgangspunkt i de kjemiske og fysiologiske prosessene som ligger bak. Utfellingene foregår i nyrets nefroner og samlerør (Figur 2), og skjer som en følge av at det skapes forhold under dannelsen av urin som gjør at løseligheten for utfellingskomponenter synker slik at utfelling skjer. Dette kan i hovedsak skje enten ved at konsentrasjonen av en eller flere av bestanddelene som inngår i utfellingene øker under dannelsen av urin, eller ved at pH i nefronets tubulus endres slik at løseligheten synker. Hos mennesket ser en at både lav og høy pH kan gi utfelling, avhengig av den kjemiske sammensetningen til utfellingene (Han et al., 2019). Hos regnbueørret som utsettes for respiratorisk acidose (forhøyet  $p\text{CO}_2$  i plasma) ser en økt utskillelse av  $\text{HCO}_3^-$  i urinen som framkommer i (Figur 3 og 4) (Evans, 1998; Pery & Gilmore, 2006). Det er videre vist at økt utskillelse av  $\text{HCO}_3^-$  i urinen fører til økt pH, noe som i sin tur legger til rette for utfelling (Schulsinger, 2015; Fivelstad et al., 2018; Whittamore, 2020). Det kan derfor virke som mengden bikarbonat i urinen har betydning for utfelling som fører til nefrokalsinose, mens pH bestemmer hva som felles ut (Smart, 1979). Ultrafiltratets pH spiller derfor en viktig rolle for utfelling av kalkmateriale i fiskenyret (S. R. Khan et al., 2008; Lewisch et al., 2013).

I humanmedisin er det sett at defekter i syre/base-reguleringen spiller en viktig rolle for patogenesen til nefrokalsinose (Evenepoel et al., 2015). Det er også observert at metabolsk acidose reduserer konsentrasjon av citrat som skilles ut i nyretubuli. Citrat fungerer som en naturlig hemmer av kalsiumfosfat-utfelling og redusert citrat-konsentrasjon settes derfor i sammenheng med utvikling av nefrokalsinose hos mennesket (Lau, 1989) Det finnes ikke tilsvarende data hos fisk, men det er ikke utenkelig at citrat kan gi en tilsvarende beskyttelse mot nefrokalsinose også hos fisk.

Det er sparsomt med dokumentasjon med tanke på hvilke forbindelser som inngår i nefrokalsinose hos atlantisk laks, men utfelling av kalsium, oksalat og andre mineraler som hydroxyapatite i nyrenes distale tubuli og samlerør er beskrevet (Bruno et al., 2013; Klosterhoff et al., 2015; Whittamore, 2020). Hos andre arter ser en at sammensetningen varierer og at ioner som kalsium, fosfat og magnesium går igjen (Elliot et al., 1959; Smart et al., 1979; Lewisch et al., 2013; Klosterhoff et al., 2015). Forsøk gjort med arten cobia (*Rachycentron canadum*) viste at den kjemiske sammensetningen av utfellingene bestod av rent kalsium (65%), oksalat (15%), kalsiumfosfat (16%) og uspesifikke salter (4%) (Klosterhoff et al., 2015).

Oksalat er et metabolsk avfallsprodukt som felles ut i nyret, dersom store mengder av saltet skilles ut i urinen (hyperoksaluri). Høy andel oksalat i urinen fører til overmetning av kalsium-oksalat som kan gi utfelling. Dette er en vanlig årsak til nyrestein hos pattedyr, dersom løseligheten for kalsium-oksalat-salter er lav (Asplin, 2002; Whittamore, 2020). Hyperoksaluri kan komme fra dietter med mye oksalat eller dens forløpere, men kan også skyldes defekter i oksalat-metabolismen (Asplin, 2002; Whittamore, 2020).

En viktig fysiologisk faktor som har betydning for utfelling i nyret er den glomerulære filtrasjonsraten (GFR). Dersom GFR synker kan dette utløse utfelling (Sand et al., 2001; Han et al., 2019). Fisk i sjøvann er derfor i prinsippet mer utsatt for nefrokalsinose enn fisk i ferskvann. Forklaringen er at GFR hos fisk i saltvann er 7-10 ganger lavere en GFR hos fisk i ferskvann, slik at gjennomskyllingen av nyrets tubuli og samlør, relativt sett, er lav. Nyret hos fisk i sjøvann er i tillegg å betrakte som et sekretorisk nyre der det skjer en kontinuerlig utskillelse av divalente ioner, spesielt  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$ , som bidrar til et høyt innhold av ioner i urinen (Figur 2) (Brown et al., 1980; Baldisserotto et al., 2007). Nyret hos ferskvannsfisk er derimot å betrakte som en filtrasjonsnyre med høy urinføring og generelt lave konsentrasjoner av ioner (Figur 2). En kunne derfor forvente at nefrokalsinose ville vært mer utbredt hos laks i sjøvann sammenlignet med laks i settefiskfasen.

Forklaringen på hvorfor bildet er omvendt, er trolig fordi vannmiljøet i settefiskfasen ofte er sub-optimalt. Settefiskfasen preges av utfordrende forhold med vannkjemi, og forbindelser som kan utløse nefrokalsinose. Mens laksen i sjøvannsfasen holdes i et mer naturlig vannmiljø som er tilnærmet optimalt, og langt mindre utfordrende for laksen i denne fasen. Selv om utbredelsen av nefrokalsinose er større i ferskvann (settefiskfasen), synes dødeligheten å være lav (Klinck & Wood, 2013). Dette kan ha sammenheng med rekruttering av flere nefroner og høy GFR/urinføring i ferskvann, som samlet sett gjør at belastningen blir mindre (stor grad av utvasking) (Farrell, 2011). Nefrokalsinose kan imidlertid også forekomme hos laks i sjøvannsfasen og er observert i forbindelse med bruk av luseskjørt (Grefsrud, 2021).

Den fysiologiske endringen fra filtrasjon i ferskvann til sekresjon i sjøvann utgjør en fysiologisk prosess som er svært energikrevende ((Calabrese, 2017; Damsgaard et al., 2020), og dersom laksen har fått utfellinger i nyretubuli i ferskvannsfasen kan overgangen til sjø bli belastende for nyret. Dersom nyretubuli er delvis eller helt blokkert med utfelt materiale (Figur 9 og 10)

vil fisken også slite med sekresjon av  $Mg^{2+}$  og  $Ca^{2+}$  (Figur 2), som i sin tur kan føre til ytterligere utfelling og problemer med regulering av ionebalansen (Farrell, 2011; Kryvi & Poppe, 2016). Det er også mulig at en rask overgang fra ferskvann til sjøvann kan utgjøre en tilleggsbelastning, dersom fisken ikke er fullstendig smoltifisert (Maxime et al., 1991; Yao et al., 2021). En slik situasjon kan gi laksen osmotiske utfordringer og redusert evne til å restituere seg, dersom nefrokalsinose er under utvikling. Raske overføringer ser også ut til å påføre fisken en større totalbelastning da syre/base regulering og osmotisk reguleringen er sammenknyttet (Figur 4. 5 og 6) (Maxime et al., 1991; Evans, 1993; Evans 1998; Evans et al., 2005; Yukihiro et al 2008; Yao et al., 2021). En ser imidlertid at fisk som ikke har pådratt seg irreversible skader på grunn av nefrokalsinose kan komme seg etter utsett i sjøen (Klinck & Wood, 2013). Det skal også nevnes at beinfisk, til forskjell fra pattedyr, har evne til å renege ødelagte nefroner *de novo* i forbindelse med både kroniske og akutte skader. Responsen kalles neo-nefrogen, og er særlig tilstede etter akutt skade i mesonfriske nyrer (Watanabe et al., 2009; Davidson, 2014). Dette er muligens mekanismen en ser hos fisk med nefrokalsinose som er i stand til å re-etablere nyrefunksjonene etter utsett i sjøen (Noble et al., 2018). Fra et fiskevelferds-perspektiv vil gradvis overgang til økende saliniteter uansett være å foretrekke, slik en ser i fiskens liv i det fri (Calabrese, 2017; Damsgaard et al., 2020).

Forskjellen i GFR hos fisk i sjøvann versus ferskvann er et viktig moment som en bør ta hensyn til ved produksjon av stor-smolt i RAS basert på sjøvann. Produksjon av såkalt stor-smolt er et relativt nytt konsept i norsk lakseoppdrett og en ser flere utfordringer knyttet til slik produksjon (Frisk et al., 2020) der nefrokalsinose er et av problemene som rapporteres hyppigst i denne sammenheng (Figur 13) (Gjessing et al., 2018; Dalum, 2019; Gjessing, 2020). Avhengig av salinitet (hvor mye sjøvann som blandes inn) og lengde på perioden laksen skal holdes i RAS, er det grunn til å anta en mer eller mindre redusert toleranse i forhold til utvikling av nefrokalsinose pga. suboptimale miljøforhold. Sjøvannet vil utgjøre en tilleggsbelastning med tanke på evnen til å kvitte seg med spesielt  $Ca^{2+}$ , men også i forhold til andre forbindelser som akkumuleres i slike system. Dette kan være en av årsakene til økt hyppighet av nefrokalsinose i sjøvannsbasert RAS. Fisk som produseres i sjøvannsbasert RAS bør derfor følges nøye opp med tanke på utvikling av nefrokalsinose.

$CO_2$  er uten tvil en meget viktig faktor, spesielt i RAS-anlegg, som kan påvirke fisken på ulike måter, avhengig av konsentrasjonen av  $CO_2$  i produksjonsvannet. Mattilsynet har derfor satt en

grense på  $15 \text{ mg l}^{-1}$  løst  $\text{CO}_2$  som ikke bør overstiges (Mattilsynet, 2014). Grenseverdien er først og fremst relevant for settefiskanlegg, der problemet med akkumulering av  $\text{CO}_2$  er størst. Det er derfor overraskende at en ganske høy andel settefisk-produsenter oppgir at de ikke har adekvat fjerning av  $\text{CO}_2$  i sine anlegg (Jensen et al., 2019). Dette kan ha sammenheng med at fjerning av  $\text{CO}_2$  er en stor kostnadsdriver i settefiskoppdrett, samt at utstyret som kreves for å fjerne  $\text{CO}_2$  legger beslag på viktige arealer (Colt et al., 2012; Noble et al., 2012).

Økt konsentrasjon av  $\text{CO}_2$  i produksjonsvannet vil i første omgang påvirke oksygentransport (Noble & Summerfelt, 1996) og syre/base-balansen (Gilmour & Perry, 2009; Aslam et al., 2019; Damsgaard et al., 2020), og ved konsentrasjoner over rundt  $15 \text{ mg l}^{-1}$  vil også fôrinntak og vekst avta (Good et al., 2018). Høye konsentrasjoner av  $\text{CO}_2$  er også en faktor som kan predisponere for nefrokalsinose (Smart et al., 1979; Saether et al., 2016; Fivelstad et al., 2018; Noble et al., 2018; Jensen et al., 2019). Det er rapportert at laksesmolt som eksponeres for  $\text{CO}_2$ -verdier ned mot  $7 \text{ mg l}^{-1}$  i ferskvannsfasen kan utvikle nefrokalsinose (Fivelstad et al., 1999) og vedvarende eksponering til  $\text{CO}_2$  er vist å føre til nefrokalsinose (Fivelstad et al., 1999a; Khan et al., 2018). Men også hyppige episoder med store variasjoner i  $\text{CO}_2$  virker å være skadelig med tanke på nefrokalsinose (Fjellheim et al., 2017). God vannbehandling er derfor viktig med tanke på overmetning av  $\text{CO}_2$ . Tilførsel av alkalinitet, sjøvann og dårlig avlufting kan føre til at mengden og formen uorganisk karbon forblir høy i produksjonsvannet (Figur 7 og 8) (Lekang, 2007; Fjellheim et al., 2017).

$\text{CO}_2$  har lenge vært framholdt som en hovedårsak til utvikling av nefrokalsinose hos laks i oppdrett (Smart et al., 1979). Dette er kanskje årsaken til at mange studier i nyere tid har vært rettet mot  $\text{CO}_2$  eksponering. Felles for flere forsøk er at fisken først har vært holdt i ferskvann eller brakkevann med forhøyet  $\text{CO}_2$ , før utsett i full styrke sjøvann (Fivelstad et al., 2003). Nefrokalsinose ble påvist i 3 forsøk (Fivelstad et al., 2003) der det ble påvist avleiringer i nyretubuli etter eksponering til  $\text{CO}_2$ -verdier mellom 2 og  $30 \text{ mg l}^{-1}$ , mens det i ett forsøk kun ble observert etseskader på dermis ved de høyeste konsentrasjonene ( $26\text{-}40 \text{ mg l}^{-1}$ ) av  $\text{CO}_2$  (Mota et al., 2019). Avleiringene var særlig uttalt ved eksponeringer over  $15 \text{ mg l}^{-1} \text{ CO}_2$ . Et viktig funn i forsøkene der nefrokalsinose ble påvist var at avleiringene var mest uttalt rett etter sjø-utsett og noen uker etter. Deretter avtok graden av nefrokalsinose og fisken som overlevde virket upåvirket. Det er også interessant å registrere at det i et av forsøkene (Good et al., 2018) ikke ble påvist noen effekt av  $\text{CO}_2$  ( $20 \text{ mg l}^{-1}$ ), noe som viser en varierende respons til  $\text{CO}_2$ .

Dette er også en indikasjon på at det må være en eller flere andre faktorer som samvirker med CO<sub>2</sub>, med tanke på utvikling av nefrokalsinose. Resultatene fra forsøkene gir imidlertid ikke noe grunnlag for å konkludere hvilke faktorer dette kan være.

Et annet viktig poeng i denne sammenheng er at høye nivå av CO<sub>2</sub> vil normalt forårsake respiratorisk acidose og aktivering av mekanismer for å hindre fall i plasma pH (Figur 3 og 4). Regulering av syre/base status er som nevnt en 2-trinns prosess som innebærer 1) aktivering av buffersystem og dernest sekresjon av H<sup>+</sup> over gjeller og nyre for å re-etablere homeostase (Figur 4 og 5). Dersom fisken greier å motvirke fallet i plasma pH (på grunn av acidosen), vil dette resultere i høye plasma-nivå av bikarbonat (Figur 4). Dette kan i sin tur øke pH i urinen ved at bikarbonat som filtreres ut i nyretubuli binder opp H<sup>+</sup> (Figur 2 og 4) (Evans, 1998; Perry & Gilmour, 2006), som i neste omgang kan lede til utfelling i nyretubuli (Schulsinger, 2015; Fivelstad et al., 2018). En kan derfor ikke utelukke forhøyet CO<sub>2</sub> som en utløsende årsak med tanke på utfellinger i nyretubuli.

Ved siden av CO<sub>2</sub> er trolig divalente kationer som Mg<sup>2+</sup> og Ca<sup>2+</sup> viktige faktorer som kan utløse nefrokalsinose hos fisk. Kalsium er kanskje mest interessant i denne sammenheng fordi dette kationet virker å være en faktor som akkumuleres i spesielt RAS-anlegg. Det er flere årsaker til dette. Kalsium inngår i flere ulike buffere som benyttes for å regulere pH i RAS. Konsentrasjonen av Ca<sup>2+</sup> vil derfor øke jevnt med tilførselen av buffer og vil ikke forsvinne ut av anlegget med mindre det skjer en utfelling. Noe av kalsiumet vil naturlig nok assimileres av fisken og benyttes som byggesteiner i skjelett og kroppsvev, men det er all grunn til å tro at det likevel vil bli et overskudd av Ca<sup>2+</sup> i produksjonsvannet over tid. Dersom det er mye kalsium tilgjengelig i driftsvannet vil også opptaket av Ca<sup>2+</sup> være høyt.

En annen kilde til Ca<sup>2+</sup> (og Mg<sup>2+</sup>) er sjøvann som blandes inn for ulike formål. Dette vil kunne bidra til overskudd og akkumulering av spesielt Ca<sup>2+</sup>, dersom det i tillegg benyttes buffere som inneholder Ca<sup>2+</sup>. En tredje viktig kilde som kan øke Ca<sup>2+</sup>-belastningen i denne sammenheng er bruken av såkalt «saltfôr», eller «Supersmolt-fôr», som er tilsatt kalsium og magnesium i ulike former (Tabell 1). Hensikten er å stimulere såkalte Ca<sup>2+</sup>-sensitive reseptorer (CaSR) i laksens tarmkanalsystem, som i neste omgang skal trigge utviklingen av det osmo-/ioneregulatoriske apparatet som laksen er avhengig av etter utsett i sjøen. Dette er etter hvert blitt en nokså vanlig strategi som mange settefiskprodusenter benytter seg av for å unngå bruk av fotoperiode-

behandling og/eller sjøvann for å øke fiskens hyper-osmoregulatoriske evne. Hvor mye kalsium og magnesium som tilsettes er imidlertid litt uklart, siden det finnes lite tilgjengelig dokumentasjon på eksakt innhold av ingredienser i fôrtypene som produsentene tilbyr. Ifølge (Waagbø et al., 2001) varierer tilsetningen av kalsium i fra 8 000 til 30 000 mg kg<sup>-1</sup> fôr, basert på analyser av Ca<sup>2+</sup> i askeinnhold. Andelen Ca<sup>2+</sup> som tilsettes utgjør rundt 60-70% av den totale sammensetningen av mineraler i saltfôr (Lyngøy, 2019; FAO, 2021). I ferskvann er innholdet omtrent 15 mg l<sup>-1</sup> mens det for saltvann ligger rundt 400 mg l<sup>-1</sup>. Laksens minimumsbehov for kalsium er lite dokumentert, men for regnbueørret ligger det rundt 300-2400 mg kg<sup>-1</sup> (Waagbø et al., 2001). Saltfôr trekkes forøvrig fram av Pharmaq Analytiq, ifølge (Dalum, 2019), som en av årsakene til økt forekomst av nefrokalsinose hos settefisk.

Bruken av Ca<sup>2+</sup>-tilsatt fôr i settefiskproduksjonen har en annen side ved seg som også er interessant i denne sammenheng. I ferskvann skjer det et netto opptak av Ca<sup>2+</sup>, hovedsakelig over gjellene, og en netto reabsorpsjon i nyret. I sjøvann, derimot, skjer transporten av Ca<sup>2+</sup> i motsatt retning, med en netto utskillelse over nyret og tarm. Denne reverseringen av Ca<sup>2+</sup>-transporten er i prinsippet lik det en ser for transporten av Na<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> under smoltifisering, noe som krever inngripende fysiologiske endringer hos laksen. Det er derfor nærliggende å tenke at mekanismene bak reverseringen av Ca<sup>2+</sup>-transporten også kan være knyttet til smoltifiseringen, selv om dette er lite dokumentert. I så fall vil det ligge fysiologiske reguleringsmekanismer bak som tar tid å gjennomføre (smoltifiseringen tar flere uker) før reverseringen er gjennomført. Det er også uklart i hvor stor grad reverseringen av Ca<sup>2+</sup>-transporten faktisk skjer ved bruk av saltfôr. En kan derfor ikke utelukke at laksen, for en periode i alle fall etter oppstart med saltfôr, vil oppleve en betydelig Ca<sup>2+</sup>-belastning som kan utløse nefrokalsinose, siden mekanismene som skal sørge for ekskresjon av Ca<sup>2+</sup> tar tid å få på plass.

Alkaliteten i vannmiljøet som laksen produseres i er trolig en viktig faktor med tanke på utvikling av nefrokalsinose. Norske settefiskprodusenter bruker ferskvann fra naturlig forekommende kilder som har en naturlig lav konsentrasjon av Ca<sup>2+</sup>. Tilsetning av buffere for å øke alkalinitet og regulere/stabilisere pH i oppdrettsmiljøet er derfor viktig. (Figur 7 og 8) viser hvordan pH kan skifte formen det uorganiske karbonet foreligger i, svingninger i pH er noe tilført alkalitet begrenser (Lekang, 2007). God kontroll på vannmiljøet er essensielt for å oppnå god fiskevelferd og redusere risiko for utbrudd av sykdommer (Gullestad, 2011). Dette er spesielt viktig i lukkede system som RAS der både pH og alkaliniteten i vannmiljøet vil endre

seg etter hvert som fisken vokser (Grefsrud, 2021), men også fordi biofiltre forbruker alkalinitet (Khan et al., 2018). Lavere grense for alkalinitet er antatt å ligge rundt 45 mg l<sup>-1</sup> målt i CaCO<sub>3</sub>, mens de faktiske nivåene i slike settefiskanlegg normalt ligger mellom 100 og 500 mg l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> (Ostrander, 2000). Siden biofiltre forbruker alkalinitet, vil høyere mengde TAN kreve større behov for alkalinitet (Ostrander, 2000; Summerfelt et al., 2015). Det finnes lite dokumentasjon som peker på en klar sammenheng mellom alkalinitet og nefrokalsinose, men i forsøk der det har vært benyttet høy alkalinitet har en også sett økt forekomst av nefrokalsinose (Wooster et al., 2001; Fivelstad, 2013).

Type buffer (kjemisk sammensetning) som benyttes for å regulere pH/alkalinitet er trolig også viktig med tanke på utvikling av nefrokalsinose (Tabell 2). Studier viser at lav mengde Ca<sup>2+</sup> i vannet vil kunne fremme transkripsjon av protein-komplekser (ECaC) som inngår i kalsium-reguleringen hos fisken. Hos zebrafisk (*Danio rerio*) kan lave nivåer av Ca<sup>2+</sup> i vannet fremme transkripsjonen av (ECaC), noe som igjen vil øke opptaket av ionet. Det er også sett at opptaket muligens foregår i både de mitokondrierike kloridecellene og pavement cellene. Det er ukjent om dette gjelder hos laksen og bør undersøkes nærmere (Shahsavarini & Perry, 2006; Liao et al., 2007). Hos regnbueørret er det sett at for tilsatt Ca<sup>2+</sup> gir redusert transkripsjon av protein-komplekser som regulerer inntaket til Ca<sup>2+</sup> (ECaC og NCX) (Galvez et al., 2007). Siden Ca<sup>2+</sup> går igjen som en faktor som inngår i nefrokalsinose-utfellinger, vil buffere som inneholder kalsium føre til økt nivå av fritt Ca<sup>2+</sup> i driftsvannet (Wooster et al., 2001) og derved bidra til en større belastning for fisken, som nevnt tidligere. I forsøk med Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fant en at bruk av CaCO<sub>3</sub> resulterte i langt lavere blodverdier av bikarbonat og høy grad av nefrokalsinose sammenlignet med NaHCO<sub>3</sub> som gav langt høyere verdier av bikarbonat og kun moderate avleiringer i nyretubuli (Wooster et al., 2001). Men det er også sett at produksjonsvann som inneholder mye bikarbonat kan gi nefrokalsinose (Fivelstad et al., 1999). Løseligheten til buffere som benyttes kan også tenkes å spille inn i utviklingen av nefrokalsinose (Wooster et al., 2001; Fjellheim et al., 2017; Van de Vis et al., 2020). Det typiske er at buffere basert på divalente kationer som Ca<sup>2+</sup> løses tregere, sammenlignet med buffere basert på Na<sup>+</sup> (Tabell 2).

Fôrets sammensetning kan også ha betydning for utvikling av nefrokalsinose hos fisk. Høye nivåer av fosfor og selen, samt lave mengder magnesium har vist seg å predisponere for nefrokalsinose (Hicks et al., 1984; Bruno et al., 2013). Hos pattedyr ser en også at forholdet



mellom kalsium og fosfor kan predisponere for nyrestein (Cockell et al., 2002). I fiskefôr vil kalsium og fosfat ofte være bundet kjemisk som kalsiumfosfat-salt, som gir god biotilgjengelighet (Albrektsen et al., 2009). Overskudd av fosfor skilles ut via nyret (Lekang, 2007) og hos rotter kan fosfor føre til hyperplasi i nyretubuli, som reduserer nyrefunksjonen og øker sannsynligheten for nefrokalsinose (Ritskes et al., 1989). Det er ikke funnet litteratur om samme patogenese hos fisk, men det kan tenkes at den er tilsvarende.

Selen er ett grunnstoff som inngår i mange av fiskens biologiske prosesser. Selen har ett smalt terapeutisk område og kan være meget toksisk (Thiry et al., 2012; Berntssen et al., 2017). Dette kan i neste omgang føre til betennelse i nyrevevets interstitium og derved redusere evnen til å skille ut ioner som så felles ut slik at nefrokalsinose oppstår (Hicks et al., 1984).

Magnesium er hovedsakelig bundet til benstrukturen sammen med kalsium. Det er et mineral som inngår som kofaktor i minst 300 enzymsystemer (Waagbø et al., 2001). Det er sett at lave nivåer kan predisponere for nefrokalsinose hos rotter. For lite magnesium kan føre til skader i glomerulus og brush border til proximale tubuli, som samlet sett vil føre til redusert nyrefunksjon og økt risiko for nefrokalsinose (Kikuchi et al., 1998). Samme patogenese kan tenkes å opptre hos fisk, men det er ikke funnet litteratur på dette.

Vitamin-C er en antioksidant som tilsettes fiskefôr for å unngå at fettsyrer i foret skal oksidere. I den senere tid er det også kommet anbefalinger om høyere nivå av vitamin-C i fôret (Kyst.no, 2018; Hemre & Hamre, 2020). I humanmedisin er det kjent at overskudd av vitamin-C metaboliseres til oksalat og økt oksalsyre som skilles ut i urinen og som kan inngå i utfellinger nyrene (Schulsinger, 2015; Han et al., 2019). Hvorvidt dette også kan skje hos fisk er ikke kjent og bør derfor undersøkes.

Det er neppe noen tvil om at uttalt grad av nefrokalsinose vil kunne føre til en stressbelastning hos fisken, selv om sammenhengen mellom nefrokalsinose og stress er lite undersøkt hos fisk. Utfellinger i nyret vil kunne føre til en generell belastning på nyrefunksjonen og fiskens homeostase. Dersom fisken ikke greier å opprettholde homeostasen, vil dette med stor sannsynlighet utløse tertiære, maladaptive responser i henhold til GAS-konseptet. Vi snakker da om en kronisk stressbelastning som i sin ytterste konsekvens kan føre til sykdom og død. Men bakenforliggende årsaker til nefrokalsinose kan også føre til stressbelastninger, før en ser tegn til utvikling av nefrokalsinose. Forhøyet partialtrykk av CO<sub>2</sub> i driftsvannet vil normalt

utløse en stressrespons (Espmark et al., 2019). Hyperkapni (forhøyet CO<sub>2</sub>) kan også redusere N<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-aktiviteten i gjellene som igjen kan føre til at fisken får osmo-/ioneregulatoriske problemer, og som belaster nyrene ytterligere (Fivelstad et al., 2003; Hosfeld et al., 2008). En initiell stressbelastning kan dermed forsterke graden av utfelling i nyret hos fisken. I forsøk med humane cellelinjer er det for øvrig også vist at stress kan utløse dannelse av krystallbindende reseptorer i nyre-tubulienes overflate-epitel som gir økt adhesjon til utfellingsproduktene, og som derved kan forsterke nefrokalsinosen (Vervaeet et al., 2009).

Nefrokalsinose betraktes som en miljøbasert velferdsindikator og regnes for å være et symptom på sub-optimal vannkvalitet. Begrepet «miljøbasert» indikerer at det er fiskens omgivelser som er grunnlaget for lidelsen. I styringsverktøyet «velferdsindikatorer for oppdrettslaks» har fisk med nefrokalsinose nedsatt fiskevelferd (Noble et al., 2018). I undersøkelse av norske settefisk-anlegg ble nefrokalsinose brukt som indikator i 64 % av tilfellene (se Figur 13), noe som tyder på at tilstanden er vanlig når en vurderer settefiskens velferd ute på anleggene. Hvor høy andel som er registrert av kompetente fiskehelsebiologer er ikke kjent, men det er mulig at en viss andel registreres av røktere på anleggene (Jensen et al., 2019).

## Referanseliste

- Albrektsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. (2009). Phosphorous (P) deficiency due to low P availability in fishmeal produced from blue whiting ( *Micromesistius poutassou*) in feed for under-yearling Atlantic salmon ( *Salmo salar*) smolt. *Aquaculture*, 296(3), 318-328. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.08.033
- Arciuli, M., Brunetti, A., Fiocco, D., Zacchino, V., Centoducati, G., Aloï, A., . . . Gallone, A. (2015). A multidisciplinary study of the extracutaneous pigment system of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). A possible relationship between kidney disease and dopa oxidase activity level. *Fish and Shellfish Immunology*, 42(1), 184-192. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.031
- Aslam, S. N., Navada, S., Bye, G. R., Mota, V. C., Terjesen, B. F., & Mikkelsen, Ø. (2019). Effect of CO<sub>2</sub> on elemental concentrations in recirculating aquaculture system tanks. *Aquaculture*, 511, 734254. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734254
- Asplin, J. R. (2002). Hyperoxaluric calcium nephrolithiasis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 31(4), 927-949. doi:10.1016/s0889-8529(02)00030-0
- Baldisserotto, B., Mancera, J. M., & Kapoor, B. G. (2007). *Fish osmoregulation*. Enfield, N.H: Science Publishers.
- Bergheim, A., Drengstig, A., Ulgenes, Y., & Fivelstad, S. (2009). Production of Atlantic salmon smolts in Europe—Current characteristics and future trends. *Aquacultural Engineering*, 41(2), 46-52. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.04.004
- Berntssen, M., H, G., Sundal, T. K., Olsvik, P. A., Amlund, H., Rasinger, J. D., Sele, V., . . . Ørnstrud, R. (2017). Sensitivity and toxic mode of action of dietary organic and inorganic selenium in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol*, 192, 116-126. doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.014
- Beyenbach, K. (2004). Kidneys sans glomeruli. *American Journal of Physiology*, 55(5), F811-F827.
- Biesterfeld, S., Farmer, G., Russell, P., & Figueroa, L. (2003). Effect of Alkalinity Type and Concentration on Nitrifying Biofilm Activity. *Water Environ Res*, 75(3), 196-204. doi:10.2175/106143003X140971
- Biovitenskap, I. f. (2020). Bjerrumdiagram Retrieved from <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/b/bjerrumdiagram.html>
- Bjerknes, E., Thorud, K., Berntssen, M., & Bjerknes, E. P. M. (1996). Skader på fisk ved Sørnes Smolt A.S. på Trengereid. (Fish injuries and mortalities at Sørnes Smolt A.S. fish hatchery, Trengereid, West Norway.). In.

- Bjerknes, V., & Liltved, H. (2007). *Vannkvalitet og smoltproduksjon*. Rykkin: Juul forl.
- Bjerknes, V., Lydersen, E., Golmen, L., Hobæk, A., Holtet, L., & Bjerknes, V. P. M. (1994). Nefrokalsinose hos regnbueørret i oppdrettsanlegg ved Trengereid. Miljømessig årsaker. In.
- Bjørndal, T., Holte, A., Even, Hilmarsen, Ø., & Tusvik, A. (2018). *Analyse av lukka oppdrett av laks- landbasert og i sjø: Produksjon, økonomi og risiko*. (1). Retrieved from <http://fisk.no/attachments/article/6572/landbasert-lakseoppdrett-analyse.pdf>
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O., & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 290-298. doi:10.1016/j.ygcen.2010.07.003
- Borup, V. D. (2014). *Biokemi* (2 ed.). København: FADL's Forlag.
- Breshears, M. A., & Confer, A. W. (2017). Chapter 11 - The Urinary System1. In J. F. Zachary (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease (Sixth Edition)* (pp. 617-681.e611): Mosby.
- Breves, J. P., Seale, A. P., Helms, R. E., Tipsmark, C. K., Hirano, T., & Grau, E. G. (2011). Dynamic gene expression of GH/PRL-family hormone receptors in gill and kidney during freshwater-acclimation of Mozambique tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 158(2), 194-200. doi:10.1016/j.cbpa.2010.10.030
- Brown, J., Jackson, B., Oliver, J., & Henderson, I. (1978). Single nephron filtration rates (SNGFR) in the trout, *Salmo gairdneri*. *European Journal of Physiology*, 377(1), 101-108. doi:10.1007/BF00584381
- Brown, J. A., Oliver, J. A., Henderson, I. W., & Jackson, B. A. (1980). Angiotensin and single nephron glomerular function in the trout *Salmo gairdneri*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 239(5), R509-R514. doi:10.1152/ajpregu.1980.239.5.R509
- Bruno, D. W. (1996). <Nephrocalcinosis D W Bruno.pdf>.
- Bruno, D. W., Noguera, P. A., & Poppe, T. T. (2013). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (2nd ed. 2013 ed.). Dordrecht: Dordrecht: Springer Netherlands.
- Calabrese, S. (2017). Environmental and biological requirements of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in closed-containment aquaculture systems. In: The University of Bergen.
- Chen, C.-Y., Wooster, G. A., Getchell, R. G., Bowser, P. R., & Timmons, M. B. (2003). Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, 218(1-4), 89-102. doi:10.1016/S0044-8486(02)00499-4

- Claiborne, J. B., Edwards, S. L., & Morrison-Shetlar, A. I. (2002). Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J Exp Zool*, 293(3), 302-319. doi:10.1002/jez.10125
- Clay, J., Beveridge, M. C. M., Primavera, J. H., Lubchenco, J., Goldburg, R. J., Kautsky, N., . . . Mooney, H. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024. doi:10.1038/35016500
- Cockell, K. A., L'Abbe, M. R., & Belonje, B. (2002). The concentrations and ratio of dietary calcium and phosphorus influence development of nephrocalcinosis in female rats. *J Nutr*, 132(2), 252-256. doi:10.1093/jn/132.2.252
- Colt, J. (2006). Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 143-156. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.08.011
- Colt, J., Watten, B., & Pfeiffer, T. (2012). Carbon dioxide stripping in aquaculture. Part 1: Terminology and reporting. *Aquacultural Engineering*, 47, 27-37. doi:10.1016/j.aquaeng.2011.12.008
- Cooper, C. A., Whittamore, J. M., & Wilson, R. W. (2010). Ca<sup>2+</sup>-driven intestinal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion and CaCO<sub>3</sub> precipitation in the European flounder in vivo: influences on acid-base regulation and blood gas transport. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(4), R870-R876.
- Dalum, S., A; Poppe, T,T; Lunheim, A, S; Reed, K, A; Holm, H; Johansen, R. (2019). Nefrokalsinose - ukjent årsak til økt forekomst av nyreproblemer hos norsk oppdrettslaks. 68-72. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/332427725\\_Nefrokalsinose\\_-\\_ukjent\\_arsak\\_til\\_okt\\_forekomst\\_av\\_nyreproblemer\\_hos\\_norsk\\_oppdrettslaks#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/332427725_Nefrokalsinose_-_ukjent_arsak_til_okt_forekomst_av_nyreproblemer_hos_norsk_oppdrettslaks#fullTextFileContent)
- Damsgaard, C., McGrath, M., Wood, C. M., Richards, J. G., & Brauner, C. J. (2020). Ion-regulation, acid/base-balance, kidney function, and effects of hypoxia in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after long-term acclimation to different salinities. *Aquaculture*, 528, 735571. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735571
- Damsgaard, B., BjArklund, F., Johnsen, H. K., & Toften, H. (2011). Short- and long-term effects of fish density and specific water flow on the welfare of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 322 323, 184.
- Dantzler, W. H. (2003). Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. In (Vol. 136, pp. 453-478).
- David, H. E., Peter, M. P., & Keith, P. C. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol Rev*, 85(1), 97-177. doi:10.1152/physrev.00050.2003

- Davidson, A. J. (2014). Kidney Regeneration in Fish. *Nephron Experimental Nephrology*, 126(2), 45-49. doi:10.1159/000360660
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Brazil, B., & Summerfelt, S. (2009). Heavy metal and waste metabolite accumulation and their potential effect on rainbow trout performance in a replicated water reuse system operated at low or high system flushing rates. *Aquacultural Engineering*, 41(2), 136-145. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.04.001
- Derek, A., & Alaru, N. (2011). Development of the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis. In (Vol. 2, pp. 1450-1456).
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.03.019
- Elliot, J. S., Sharp, R. F., & Lewis, L. (1959). THE SOLUBILITY OF STRUVITE IN URINE. *Journal of Urology*, 81(3), 366-368. doi:10.1016/s0022-5347(17)66025-7
- Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., & Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 493-531. doi:10.1006/jfbi.2002.2057
- Espmark, Å. M. O., Noble, C., Kolarevic, J., Berge, G. M., Aas, G. H., Tuene, S. A., . . . Lein, I. (2019). Velferd hos rensefisk - operative velferdsindikatorer (OVI) - RENSVEL. In: Nofima AS.
- Evans, D. (1993). Osmotic and ionic regulation [in fish]. *CRC Marine Science Series*. 315, 341.
- Evans, D. H. (1998). *The Physiology of fishes* (2nd ed. ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Evans, D. H., Piermarini, M., Peter., & Choe, P., Keith. (2005). The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol Rev*, 85(1), 97-177. doi:10.1152/physrev.00050.2003
- Evenepoel, P., Daenen, K., Bammens, B., Claes, K., Meijers, B., Naesens, M., . . . Lerut, E. (2015). Microscopic nephrocalcinosis in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*, 30(5), 843-848. doi:10.1093/ndt/gfu400
- FAO. (2021). Composition of mineral mixture feeds used for intensive culture of Atlantic salmon (1 kg mineral mixture/100 kg of feed)1. Retrieved from [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/affris/docs/Atlantic\\_Salmon/table\\_7.htm](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/affris/docs/Atlantic_Salmon/table_7.htm)
- Farrell, A. P. (2011). *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment* (Vol. 2): Elsevier Science.

- Fiksdal, L., & Norges tekniske høgskole Institutt for, v. (1982). *Kompendium i vannkjemi*. Trondheim: Institutt for vassbygging, NTH.
- Fivelstad, S. (2013). Long-term carbon dioxide experiments with salmonids. *Aquacultural Engineering*, 53, 40-48. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.006
- Fivelstad, S., Hosfeld, C. D., Medhus, R. A., Olsen, A. B., & Kvamme, K. (2018). Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures. *Aquaculture*, 482, 83-89. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.09.012
- Fivelstad, S., Olsen, A. B., Kløften, H., Ski, H., & Stefansson, S. (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*, 178(1), 171-187. doi:10.1016/S0044-8486(99)00125-8
- Fivelstad, S., Olsen, A. B., Åsgård, T., Baeverfjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T., & Stefansson, S. (2003). Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture*, 215(1), 301-319. doi:10.1016/S0044-8486(02)00048-0
- Fivelstad, S., Waagbø, R., Zeitz, S. F., Hosfeld, A. C. D., Olsen, A. B., & Stefansson, S. (2003). A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture*, 215(1-4), 339-357. doi:10.1016/S0044-8486(02)00197-7
- Fjellheim, J., Anders. (2009a). *Vannkvalitet i et kommersielt resirkuleringsanlegg for laks*. Retrieved from [https://vannforeningen.no/wp-content/uploads/2015/06/2009\\_786967.pdf](https://vannforeningen.no/wp-content/uploads/2015/06/2009_786967.pdf)
- Fjellheim, J., Anders., & Hess, E. O. K. (2017). *Resirkulering av vann i settefiskproduksjon (2)*. Retrieved from [https://folk.ntnu.no/skoge/diplom/prosjekt19/more-info-on-projects/RAS/7127-2017%20-%20RAS%20guide\\_NO\\_low.pdf](https://folk.ntnu.no/skoge/diplom/prosjekt19/more-info-on-projects/RAS/7127-2017%20-%20RAS%20guide_NO_low.pdf)
- Forsberg, O. I. (1995). *Farming of post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar L.) in land-based flow-through tanks : studies of fish growth, metabolic rates, water quality and optimal production strategies*. Rogaland Research University of Bergen, Bergen.
- Frisk, M., Høyland, M., Zhang, L., Vindas, M. A., Øverli, Ø., & Johansen, I. B. (2020). Intensive smolt production is associated with deviating cardiac morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 529, 735615. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735615
- Furtado, P. S., Furtado, P. S., Gaona, C. A. P., Gaona, C. A. P., Poersch, L. H., Poersch, L. H., . . . Wasielesky Jr, W. (2014). Application of different doses of calcium hydroxide in the farming shrimp *Litopenaeus vannamei* with the biofloc technology (BFT). *Aquaculture international*, 22(3), 1009-1023. doi:10.1007/s10499-013-9723-9

- Furtado, P. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2011). Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321(1), 130-135. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.034
- Galvez, F., Franklin, N. M., Tuttle, R. B., & Wood, C. M. (2007). Interactions of waterborne and dietary cadmium on the expression of calcium transporters in the gills of rainbow trout: Influence of dietary calcium supplementation. *Aquat Toxicol*, 84(2), 208-214. doi:10.1016/j.aquatox.2007.04.013
- Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *J Exp Biol*, 212(11), 1647-1661. doi:10.1242/jeb.029181
- Gjessing, M. (2020). Nefrokalsinose og hemoragisk smoltsyndrom - årsakssammenheng og muligheter for forebygging. *Norsk Veterinær Tidsskrift*, 5-2020. Retrieved from [https://nvt.vetnett.no/journal/2020/5/m-571/Nefrokalsinose\\_og\\_hemoragisk\\_smoltsyndrom\\_-\\_%C3%A5rsakssammenheng\\_og\\_muligheter\\_for\\_f%C3%B8rebygging](https://nvt.vetnett.no/journal/2020/5/m-571/Nefrokalsinose_og_hemoragisk_smoltsyndrom_-_%C3%A5rsakssammenheng_og_muligheter_for_f%C3%B8rebygging)
- Gjessing, M. W., S, Cecilie. Dale, B, Ole. (2018). *Fiskehelsesrapporten 2018*. (6a-2019 ). Retrieved from file:///C:/Users/kenli310180/Downloads/Vet-fiskehelse-2018-enkelt sider%20(9).pdf
- Good, C., Davidson, J., Terjesen, B. F., Takle, H. R., Kolarevic, J., Bæverfjord, G., & Summerfelt, S. T. (2018). The effects of long-term 20 mg/L carbon dioxide exposure on the health and performance of Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts in water recirculation aquaculture systems. In.
- Graff, I. E., Waagbø, R., Fivelstad, S., Vermeer, C., Lie, Ø., & 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 Diseases*, 25(10), 599-614. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00403.x
- Gravdal, j., Roger; Lyngøy, Arthur. (2017). "a Fish Feed and Method for Smoltification and Prevention of Desmoltification in Salmonidae, and for Prophylaxis and Treatment of Haemorrhagic Smolt Syndrome in Salmonidae" in Patent Application Approval Process *Chemicals & Chemistry*, 3468. Retrieved from [https://bibsys-almaprimo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/fulldisplay?docid=TN\\_cdi\\_gale\\_infotracademiconefile\\_A500431038&context=PC&vid=UBTO&lang=no\\_NO&search\\_scope=default\\_scope&adaptor=primo\\_central\\_multiple\\_fe&tab=default\\_tab&query=any,contains,Smoltification%20Smolt%20Feed&offset=0](https://bibsys-almaprimo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/fulldisplay?docid=TN_cdi_gale_infotracademiconefile_A500431038&context=PC&vid=UBTO&lang=no_NO&search_scope=default_scope&adaptor=primo_central_multiple_fe&tab=default_tab&query=any,contains,Smoltification%20Smolt%20Feed&offset=0)



- Greenwood, M. P., Flik, G., Wagner, G. F., & Balment, R. J. (2009). The Corpuscles of Stannius, Calcium-Sensing Receptor, and Stanniocalcin: Responses to Calcimimetics and Physiological Challenges. *Endocrinology*, *150*(7), 3002-3010. doi:10.1210/en.2008-1758
- Grefsrud, S., Ellen; Karlsen, Ørjan; Kvamme, O, Bjørn; Glover, Kevin; Husa, Vivian; Hansen K, Pia; Grøsvik, E, Bjørn; Samuelsen, Ole; Sandlud Nina; Stien, H, Lars; Svåsand, Terje. (2021). *Risikorapport Norsk fiskeoppdrett 2021- Riskikovurdering*. (8). Retrieved from <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2021-8>
- Grosell, M. (2011). Intestinal anion exchange in marine teleosts is involved in osmoregulation and contributes to the oceanic inorganic carbon cycle: Intestinal anion exchange in marine fish. *Acta physiologica (Oxford)*, *202*(3), 421-434. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02241.x
- Gullestad, P. (2011). *Effektiv og bærekraftig arealbruk i havbruksnæringen : areal til begjær*.
- Hagspiel, V., Hannevik, J., Lavrutich, M., Naustdal, M., & Struksnæs, H. (2018). Real options under technological uncertainty: A case study of investment in a post-smolt facility in Norway. *Marine policy*, *88*, 158-166. doi:10.1016/j.marpol.2017.11.020
- Han, H., Ahn, J., Mutter, W. P., & Nasser, S. (2019). *Nutritional and medical management of kidney stones*.
- Handeland, S. O., Imsland, A. K., & Stefansson, S. O. (2008). The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture*, *283*(1), 36-42. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.042
- Handeland, S. O., Wilkinson, E., Sveinsbø, B., McCormick, S. D., & Stefansson, S. O. (2004). Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture*, *233*(1-4), 513-529. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.08.028
- Hanssen, R. G. J. M., Lafeber, F. P. J. G., Flik, G., & Wendelaar Bonga, S. E. (1989). Ionic and total calcium levels in the blood of the European eel (*Anguilla anguilla*) : effects of stanniectomy and hypocalcin replacement therapy. *J Exp Biol*, *141*, 177-186.
- Hartviksen, M., Bakke, A. M., Vecino, J. G., Ringø, E., & Krogdahl, Å. (2014). Evaluation of the effect of commercially available plant and animal protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): digestive and metabolic investigations. *Fish Physiol Biochem*, *40*(5), 1621-1637. doi:10.1007/s10695-014-9953-4
- Heath, A. G. (1995). *Water pollution and fish physiology* (2nd ed. ed.). Boca Raton, Fla: Lewis Publishers.

- Heisler, N. (1984). 6 Acid-Base Regulation in Fishes\*\*Dedicated to my friend Ernst Meißner on the occasion of his seventy-fifth birthday. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 10, pp. 315-401): Academic Press.
- Hemre, G.-I., & Hamre, K. (2020). Antioksidanter i fôret påvirker fiskens velferd og helse. Retrieved from <https://www.intrafish.no/kommentarer/antioksidanter-i-f-ret-pavirker-fiskens-velferd-og-helse/2-1-832159>
- Henriksen, K., Sandberg, M. G., Olafsen, T., Bull-Berg, H., Johansen, U., & Stokka, A. (2012). Verdiskaping og sysselsetting i norsk sjømatnæring 2010 - en ringvirkningsanalyse. In: SINTEF Fiskeri og havbruk.
- Hevrøy, E. M., Waagbø, R., Torstensen, B. E., Takle, H., Stubhaug, I., Jørgensen, S. M., . . . Hansen, T. (2011). Ghrelin is involved in voluntary anorexia in Atlantic salmon raised at elevated sea temperatures. *Gen Comp Endocrinol*, 175(1), 118-134. doi:10.1016/j.ygcen.2011.10.007
- Hicks, B. D., Hilton, J. W., & Ferguson, H. W. (1984). Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow- trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 7(5), 379-389. doi:10.1111/j.1365-2761.1984.tb01202.x
- Hodson, P. V., & Hilton, J. W. (1983). The Nutritional Requirements and Toxicity to Fish of Dietary and Waterborne Selenium. *Ecological bulletins*(35), 335-340.
- Holan, A. B., & Kolarevic, J. (2015). Postsmoltproduksjon i resirkulert sjøvann på land. In.
- Hosfeld, C. D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T. M., Waagbø, R., Olsen, A. B., . . . Fivelstad, S. (2008). Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 280(1-4), 146-153. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.05.009
- Hyde, D. A., & Perry, S. F. (1989). Differential Approaches to Blood Acid-Base Regulation during Exposure to Prolonged Hypercapnia in Two Freshwater Teleosts: The Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and the American Eel (*Anguilla rostrata*). *Physiological zoology*, 62(6), 1164-1186. doi:10.1086/physzool.62.6.30156207
- Jensen, B., Britt., Tørud, B., Gåsnes, S., Grønbech, S., & Gismervik, K. (2019). *Velferd i settefiskproduksjonen småfiskvel*. (14). Retrieved from file:///C:/Users/kenli310180/Downloads/2019-14%20Velferd%20i%20settefiskproduksjonen.pdf
- Kato, A., Muro, T., Kimura, Y., Li, S., Islam, Z., Ogoshi, M., . . . Kato, A. (2011). Differential expression of Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 in the distal nephrons of euryhaline and seawater pufferfishes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300(2), R284-R297. doi:10.1152/ajpregu.00725.2009

- Keenleyside, M. H. A., & Yamamoto, F. T. (1962). Territorial Behaviour of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.). *Behaviour*, 19(1-2), 139-168. doi:10.1163/156853961X00231
- Khan, J. R., Johansen, D., & Skov, P. V. (2018). The effects of acute and long-term exposure to CO<sub>2</sub> on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater. *Aquaculture*, 491, 20-27. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.03.010
- Khan, S. R., Glenton, P. A., & Khan, S. R. (2008). Calcium oxalate crystal deposition in kidneys of hypercalciuric mice with disrupted type IIa sodium-phosphate cotransporter. *American journal of physiology. Renal physiology*, 294(5), F1109-F1115. doi:10.1152/ajprenal.00620.2007
- Kikuchi, T., Matsuzaki, H., Sato, S., Kajita, Y., Chiba, H., Tsuchiya, H., . . . Goto, S. (1998). Diminished Kidney Function and Nephrocalcinosis in Rats Fed a Magnesium-Deficient Diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 44(4), 515-523. doi:10.3177/jnsv.44.515
- Klinck, J., & Wood, C. M. (2013). Gastro-intestinal transport of calcium and cadmium in fresh water and seawater acclimated trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.*, 157(2), 236-250. doi:10.1016/j.cbpc.2012.11.006
- Klosterhoff, M., Pedrosa, V., Sampaio, L. A., Ramos, L., Tesser, M. B., & Romano, L. A. (2015). Nephrocalcinosis and kidney stones in *Rachycentron canadum*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 35(4), 138-147.
- Kristensen, T., Åtland, Å., Rosten, T., Urke, H. A., & Rosseland, B. O. (2009). Important influent-water quality parameters at freshwater production sites in two salmon producing countries. *Aquacultural Engineering*, 41(2), 53-59. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.06.009
- Kryvi, H., & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*. Bergen: Fagbokforl.
- Kumar, P., Gandhi, P. S., & Majumder, M. (2018). Optimal morphometric factors responsible for enhanced gas exchange in fish gills.
- Kyst.no. (2018). Nye anbefalinger på nivå av vitaminer i fôr til laks. Retrieved from <https://www.kyst.no/article/nye-anbefalinger-paa-nivaa-av-vitaminer-i-fr-til-laks/>
- Lafeber, F. P. J. G., Hanssen, R. G. J. M., Choy, Y. M., Flik, G., Herrmann-Erlee, M. P. M., Pang, P. K. T., & Wendelaar Bonga, S. E. (1988). Identification of hypocalcin (teleocalcin) isolated from trout *Stannius corpuscles*. *Gen Comp Endocrinol*, 69(1), 19-30. doi:10.1016/0016-6480(88)90048-2
- Lau, K. (1989). Phosphate excess and progressive renal failure: The precipitation-calcification hypothesis. *Kidney Int*, 36(5), 918-937. doi:10.1038/ki.1989.281
- Lekang, O.-I. (2007). *Aquaculture Engineering*: United Kingdom: Wiley-Blackwell.

- Lewisch, E., Kucera, M., Tappert, R., Tessadri, R., Tappert, M., & Kanz, F. (2013). Occurrence of nephrolithiasis in a population of longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, and analysis of a nephrolith. *Journal of Fish Diseases*, 36(2), 163-167. doi:10.1111/jfd.12013
- Liao, B.-K., Deng, A.-N., Chen, S.-C., Chou, M.-Y., & Hwang, P.-P. (2007). Expression and water calcium dependence of calcium transporter isoforms in zebrafish gill mitochondrion-rich cells. *BMC Genomics*, 8(1), 354-354. doi:10.1186/1471-2164-8-354
- Lu, M., Wagner, G. F., & Renfro, J. L. (1994). Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 267(5), 1356-1362. doi:10.1152/ajpregu.1994.267.5.R1356
- Lyngøy, A., & Retamal, C., Mansilla. (2019). *A fish feed and method for smoltification and prevention of desmoltification in salmonidae, and for prophylaxis and treatment of haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in salmonidae*. Norway: Bulletin Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/15/8e/90/b5b56e81fd374d/EP3516965A1.pdf>
- Macintyre, C. M., Ellis, T., North, B. P., & Turnbull, J. F. (2008). *The Influences of Water Quality on the Welfare of Farmed Rainbow Trout: A Review*.
- Manzon, L. A. (2002). The Role of Prolactin in Fish Osmoregulation: A Review. In (Vol. 125, pp. 291-310).
- Martinez, A.-S., Cutler, C. P., Wilson, G. D., Phillips, C., Hazon, N., Cramb, G., & Martinez, A.-S. (2005). Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression. *Biology of the cell*, 97(8), 615-627.
- Martins, C. I., Galhardo, L., Noble, C., Damsgard, B., Spedicato, M. T., Zupa, W., . . . Kristiansen, T. (2012). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol Biochem*, 38(1), 17-41. doi:10.1007/s10695-011-9518-8
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., Verdegem, M. C. J., Heinsbroek, L. T. N., Schneider, O., Blancheton, J. P., . . . Verreth, J. A. J. (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43(3), 83-93. doi:10.1016/j.aquaeng.2010.09.002
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., & Verreth, J. A. J. (2011). The effect of recirculating aquaculture systems on the concentrations of heavy metals in culture water and tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Food chemistry*, 126(3), 1001-1005. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.108

- Mattilsynet. (2014). *Vannkvalitet og vannbehandling i settefiskanlegg*. Retrieved from [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/akvakultur/drift\\_av\\_akvakulturanlegg/sluttrapport\\_vannkvalitet\\_og\\_vannbehandling\\_i\\_settefiskanlegg\\_2014.17293/binary/Sluttrapport:%20Vannkvalitet%20og%20vannbehandling%20i%20settefiskanlegg%202014](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/akvakultur/drift_av_akvakulturanlegg/sluttrapport_vannkvalitet_og_vannbehandling_i_settefiskanlegg_2014.17293/binary/Sluttrapport:%20Vannkvalitet%20og%20vannbehandling%20i%20settefiskanlegg%202014)
- Mattilsynet. (2015). *Kriterier for listeføring av fiske-og skjellsykdommer*. Retrieved from [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/fiske\\_og\\_skjellsykdommer/kriterier\\_for\\_listeforing\\_av\\_fiske\\_og\\_skjellsykdommer.17590](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/kriterier_for_listeforing_av_fiske_og_skjellsykdommer.17590)
- Maxime, V., Pennec, J. P., & Peyraud, C. (1991). Effects of direct transfer from freshwater to seawater on respiratory and circulatory variables and acid-base status in rainbow trout. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 161(6), 557-568. doi:10.1007/BF00260745
- McCormick, S. D. (2012). Smolt Physiology and Endocrinology. In (Vol. 32, pp. 199-251): Elsevier Science & Technology.
- McCormick, S. D., Saunders, R. L., & MacIntyre, A. D. (1989). The effect of salinity and ration level on growth rate and conversion efficiency of Atlantic salmon ( *Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 82(1), 173-180. doi:10.1016/0044-8486(89)90406-7
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2007). Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: A possible developmental basis for smolting. *Aquaculture*, 273(2-3), 337-344. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.10.015
- Moran, D. (2010). Carbon dioxide degassing in fresh and saline water. I: Degassing performance of a cascade column. *Aquacultural Engineering*, 43(1), 29-36. doi:10.1016/j.aquaeng.2010.05.001
- Mota, V. C., Martins, C. I. M., Eding, E. H., Canário, A. V. M., & Verreth, J. A. J. (2014). Steroids accumulate in the rearing water of commercial recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 62, 9-16. doi:10.1016/j.aquaeng.2014.07.004
- Nielsen, V., Kristoffer. (2021). *Bilde gross utfellinger nyre hos smolt*. Veterinærinstituttet.
- Nilsen, A., Nielsen, K. V., & Bergheim, A. (2020). A closer look at closed cages: Growth and mortality rates during production of post-smolt Atlantic salmon in marine closed confinement systems. *Aquacultural Engineering*, 91, 102124. doi:10.1016/j.aquaeng.2020.102124
- Nilsen, A., Nielsen, K. V., Næss, A., & Bergheim, A. (2017). The impact of production intensity on water quality in oxygen enriched, floating enclosures for post-smolt salmon culture. *Aquacultural Engineering*, 78, 221-227. doi:10.1016/j.aquaeng.2017.06.001

- Nilsson, G. (2016). The physiology of fishes, fourth edition, edited by D.H. Evans, J.B. Claiborne and S. Currie. *Marine biology research*, 12, 454-454.
- Noble, A. C., & Summerfelt, S. T. (1996). Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual review of fish diseases*, 6, 65-92. doi:10.1016/S0959-8030(96)90006-X
- Noble, C., Kankainen, M., Setälä, J., Berrill, I. K., Ruohonen, K., Damsgård, B., & Toften, H. (2012). The bio-economic costs and benefits of improving productivity and fish welfare in aquaculture: utilizing CO<sub>2</sub> stripping technology in Norwegian Atlantic salmon smolt production. *Aquaculture Economics & Management*, 16(4), 414-428. doi:10.1080/13657305.2012.729251
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M., Kolarević, J., & Gismervik, K. (2018). *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks : hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*(Rev. utg. ed.).
- Nordrum, S., Åsgård, T., Shearer, K. D., & Arnessen, P. (1997). Availability of phosphorus in fish bone meal and inorganic salts to Atlantic salmon ( *Salmo solar*) as determined by retention. *Aquaculture*, 157(1), 51-61. doi:10.1016/S0044-8486(97)00145-2
- Olsen, B., Olsen. (2021). *Histopatologisk bilde*. Veterinærinstituttet.
- Ostrander, G. K. (2000). *The Laboratory fish*. San Diego, Calif: Academic Press.
- Pelis, R. M., Edwards, S. L., Kunigelis, S. C., Claiborne, J. B., & Renfro, J. L. (2005). Stimulation of renal sulfate secretion by metabolic acidosis requires Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange induction and carbonic anhydrase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(1), F208-F216. doi:10.1152/ajprenal.00468.2004
- Perry, S. F., & Gilmour, K. M. (2006). Acid-base balance and CO<sub>2</sub> excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respir Physiol Neurobiol*, 154(1-2), 199-215. doi:10.1016/j.resp.2006.04.010
- player, S. (2016). Evolution of the Vertebrate Kidney. Fish Nephrons - typically have a glomerulus - Bowman's capsule with a ciliated neck region that connects to the rest. Retrieved from <https://slideplayer.com/slide/5120428/>
- Poppe, T., Bergh, Ø., & Keeping, D. (1999). *Fiskehelse og fisksykdommer*. Oslo: Universitetsforl.
- Prabhu, P. A. J., Erik-Jan, L., Gro-Ingunn, H., Kristin, H., Marit, E., Pål, A. O., . . . Rune, W. (2019). Recommendations for dietary level of micro-minerals and vitamin D3 to Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt when fed low fish meal diets. *PeerJ (San Francisco, CA)*, 7, e6996. doi:10.7717/peerj.6996

- Prabhu, P. A. J., Holen, E., Espe, M., Silva, M. S., Holme, M.-H., Hamre, K., . . . Waagbø, R. (2020). Dietary selenium required to achieve body homeostasis and attenuate pro-inflammatory responses in Atlantic salmon post-smolt exceeds the present EU legal limit. *Aquaculture*, 526, 735413. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735413
- Queiroz, J. F. d., Nicoletta, G., Wood, C. W., & Boyd, C. E. (2004). Lime application methods, water and bottom soil acidity in fresh water fish ponds. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61(5), 469-475. doi:10.1590/S0103-90162004000500001
- Regjeringen. (2021). Nye regler for landbasert oppdrett. Retrieved from <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/nye-regler-for-landbasert-oppdrett/id2502424/>
- Renforth, P., & Henderson, G. (2017). Assessing ocean alkalinity for carbon sequestration. *Reviews of geophysics* (1985), 55(3), 636-674. doi:10.1002/2016RG000533
- Renfro, J. L. (1999). Recent developments in teleost renal transport. *Journal of Experimental Zoology*, 283(7), 653-661. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19990601)283:7<653::AID-JEZ4>3.0.CO
- Resende, A. D., Lobo-da-Cunha, A., Malhão, F., Franquinho, F., Monteiro, R. A. F., & Rocha, E. (2010). Histological and Stereological Characterization of Brown Trout ( *Salmo trutta f. fario* ) Trunk Kidney. *Microsc Microanal*, 16(6), 677-687. doi:10.1017/S1431927610093918
- Riche, M., & Brown, P. B. (1996). Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 142(3), 269-282. doi:10.1016/0044-8486(95)01218-4
- Ritskes-Hoitinga, J., Lemmens, A. G., & Beynen, A. C. (1989). Nutrition and kidney calcification in rats. *Lab Anim*, 23(4), 313-318. doi:10.1258/002367789780745944
- Roberts, R. J. (2012). *Fish Pathology: Fourth Edition*.
- Rochette, L., & Vergely, C. (2017). Hans Selye and the stress response: 80 years after his “letter” to the Editor of Nature. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 66(4), 181-183. doi:10.1016/j.ancard.2017.04.017
- Saether, B.-S., Siikavuopio, S. I., & Jobling, M. (2016). Environmental conditions required for intensive farming of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* (L.)).(Charr II). *Hydrobiologia*, 783(1), 347. doi:10.1007/s10750-015-2572-y
- Sand, O., Haug, E., Sjaastad, Ø. V., & Toverud, K. C. (2001). *Menneskets fysiologi* (1. utg, 1. oppl. ed.). Oslo: Gyldendal akademisk.
- Sanni, S., & Forsberg, O. I. (1996). Modelling pH and carbon dioxide in single-pass sea-water aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 15(2), 91-110. doi:10.1016/0144-8609(95)00003-8

- Sayer, J. A., & Simmons, N. L. (2002). Urinary stone formation: Dent's disease moves understanding forward. *Exp Nephrol*, 10(3), 176-181. doi:10.1159/000058344
- Schoenmakers, T., Verboost, P., & Flik, G. (1993). Transcellular intestinal calcium transport in freshwater and seawater fish and its dependence on sodium/calcium exchange. *Journal of Experimental Biology*, 176, 195.
- Schulsinger, D. A. (2015). *Kidney Stone Disease : Say NO to Stones!*(1st ed. 2015. ed.).
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K., Mathieu, C., . . . Vaughan, L. (2012). Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 85-105. doi:10.1007/s10695-011-9517-9
- Shahsavarani, A., McNeill, B., Galvez, F., Wood, C. M., Goss, G. G., Hwang, P.-P., & Perry, S. F. (2006). Characterization of a branchial epithelial calcium channel (ECaC) in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 209(10), 1928-1943. doi:10.1242/jeb.02190
- Shahsavarani, A., & Perry, S. F. (2006). Hormonal and environmental regulation of epithelial calcium channel in gill of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(5), 1490-1498. doi:10.1152/ajpregu.00026.2006
- Shores, T., & Horvath, B. (2001). Stress, Neural Basis of. In (Vol. 22, pp. 15194-15198).
- Smart, G. R., Eddy, F. B., & Bath, R. N. (1979). Ionic content of muscle and urine in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson kept in water of high CO<sub>2</sub> content. *Journal of Fish Diseases*, 2(2), 105-110. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1979.tb00148.x>
- So, Y. P., & Fenwick, J. C. (1977). Relationship between net calcium influx across a perfused isolated eel gill and the development of post-stanniectomy hypercalcemia. *J Exp Zool*, 200(2), 259-264. doi:10.1002/jez.1402000207
- Stefansson, S. O., McCormick, S. D., Ebbesson, L. O. E., & Björnsson, B. T. (2008). *Smoltification*.
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., & Hardy, R. W. (2000). Primary responses of rainbow trout to dietary phosphorus concentrations. *Aquaculture nutrition*, 6(4), 235-245. doi:10.1046/j.1365-2095.2000.00142.x
- Summerfelt, S., Zuhlke, A., Kolarevic, J., Reiten, B., Selset, R., Gutierrez, X., & Terjesen, B. (2015). Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors. *Aquac. Eng.*, 65, 46-54. doi:10.1016/j.aquaeng.2014.11.002



- Summerfelt, S. T., Zühlke, A., Kolarevic, J., Reiten, B. K. M., Selset, R., Gutierrez, X., & Terjesen, B. F. (2015). Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors. *Aquacultural Engineering*, 65, 46-54. doi:10.1016/j.aquaeng.2014.11.002
- Sundell, K., BjÖRnsson, B. T., Itoh, H., & Kawauchi, H. (1992). Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol B*, 162(6), 489-495.
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Stefansson, S. O., Handeland, S. O., & Ytteborg, E. (2018). High fish density delays wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Sci Rep*, 8(1), 16907-16913. doi:10.1038/s41598-018-35002-5
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1), 146-158. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.08.015
- Teranishi, K., & Kaneko, T. (2010). Spatial, Cellular, and Intracellular Localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the Sterically Disposed Renal Tubules of Japanese Eel. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(8), 707-719. doi:10.1369/jhc.2010.955492
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y.-J., & Pussemier, L. (2012). Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food chemistry*, 130(4), 767-784. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.102
- Thomsen, M., Hanne. (2019). *Forekomst av nefrokalsinose hos atlantisk laks (Salmo salar) og Regnbueørret (Oncorhynchus mykiss); en klinisk studie*. Retrieved from <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2635067>
- Thorarensen, H., & Farrell, A. P. (2011). The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture*, 312(1), 1-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.043
- Thorpe, J., Mangel, M., Metcalfe, N., & Huntingford, F. (1998). Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evolutionary Ecology*, 12(5), 581-599. doi:10.1023/A:1022351814644
- Tran Thi Nang, T., & Lebailly, P. (2017). On Sustainable Aquaculture.
- Turnbull, J., Bell, A., Adams, C., Bron, J., & Huntingford, F. (2005). Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture*, 243(1), 121-132. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.09.022
- van de Vis, H., Kolarevic, J., Stien, L. H., Kristiansen, T. S., Gerritzen, M., van de Braak, K., . . . Noble, C. (2020). Welfare of Farmed Fish in Different Production Systems and Operations. In (pp. 323-361). Cham: Cham: Springer International Publishing.

- Vatsos, I. N., & Angelidis, P. (2017). Water quality and fish diseases. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(1), 40. doi:10.12681/jhvms.14875
- Verhulst, A., Asselman, M., Persy, V. P., Schepers, M. S. J., Helbert, M. F., Verkoelen, C. F., & De Broe, M. E. (2003). Crystal retention capacity of cells in the human nephron: Involvement of CD44 and its ligands hyaluronic acid and osteopontin in the transition of a crystal binding- into a nonadherent epithelium. *J Am Soc Nephrol*, 14(1), 107-115. doi:10.1097/01.ASN.0000038686.17715.42
- Verkoelen, C. F., van Der Boom, B. G., & Romijn, J. C. (2000). Identification of hyaluronan as a crystal-binding molecule at the surface of migrating and proliferating MDCK cells. *Kidney Int*, 58(3), 1045-1054. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00262.x
- Vervaet, B. A., Verhulst, A., D'Haese, P. C., & De Broe, M. E. (2009). Nephrocalcinosis: new insights into mechanisms and consequences. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp115>
- Villaverde, S., García-Encina, P. A., & Fdz-Polanco, F. (1997). Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water research (Oxford)*, 31(5), 1180-1186. doi:10.1016/S0043-1354(96)00376-4
- Waagbø, R., Espe, M., Hamre, K., & Lie, Ø. (2001). *Fiskeernæring*. Bergen: Kystnæringen forl. & bokklubb.
- Wagner, G. F., Haddad, M., Fargher, R. C., Milliken, C., & Copp, D. H. (1998). Calcium Is an Equipotent Stimulator of Stanniocalcin Secretion in Freshwater and Seawater Salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 109(2), 186-191. doi:10.1006/gcen.1997.7010
- Watanabe, N., Kato, M., Suzuki, N., Inoue, C., Fedorova, S., Hashimoto, H., . . . Wakamatsu, Y. (2009). Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Development, Growth & Differentiation*, 51(2), 135-143. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01090.x
- Wendelaar, B. (2011). Hormonal Controls: Hormonal Responses to Stress. In (Vol. 2, pp. 1515-1515).
- Whittamore, J. M. (2020). The teleost fish intestine is a major oxalate-secreting epithelium. *J Exp Biol*, 223(12), jeb216895. doi:10.1242/jeb.216895
- Wilson, R. W., & Grosell, M. (2003). Intestinal bicarbonate secretion in marine teleost fish—source of bicarbonate, pH sensitivity, and consequences for whole animal acid–base and calcium homeostasis. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1618(2), 163-174. doi:10.1016/j.bbamem.2003.09.014
- Wilson, R. W., Wilson, J. M., & Grosell, M. (2002). Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish—why and how? *BBA - Biomembranes*, 1566(1), 182-193. doi:10.1016/S0005-2736(02)00600-4

- Wooster, G. A., Getchell, R. G., Bowser, P. R., Timmons, M. B., Chen, C.-Y., Wooster, G. A., . . . Timmons, M. B. (2001). Nephrocalcinosis in Nile Tilapia from a Recirculation Aquaculture System: A Case Report. In (pp. 368-372). Bethesda, Md.
- Yao, Z., Schauer, K. L., Ruhr, I. M., Mager, E. M., Heuer, R. M., & Grosell, M. (2021). A marine teleost, *Opsanus beta*, compensates acidosis in hypersaline water by H<sup>+</sup> excretion or reduced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> excretion rather than HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. *Journal of Comparative Physiology B*, *191*(1), 85-98. doi:10.1007/s00360-020-01320-2
- Yasui, T., Fujita, K., Asai, K., & Kohri, K. (2002). Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol*, *9*(2), 100-108. doi:10.1046/j.1442-2042.2002.00429.x
- Ytrestøyl, T., Aas, T. S., & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, *448*, 365-374. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.06.023
- Yukihiro, K., Tsutomu, N., Akira, K., Hiroyuki, D., Abinash, C. M., Min-Hwang, C., . . . Shigehisa, H. (2008). Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *294*(4), 1402-1412. doi:10.1152/ajpregu.00759.2007