

NFR prosjekt 178938

**Welfare of Farmed Fish from Harvest to Killing- Meeting the
Future Challenge**

(Farewell)

Sluttrapport



Av

Bjørn Roth, Nofima Norconserv A/S; Erik Slinde, Havforskningsinstituttet i Bergen; Atle Foss, Akvaplan Niva A/S; Endre Grimsbø, Universitetet i Bergen; Grigory Merkin, Universitetet i Bergen og Ragnar Nortvedt, Universitetet i Bergen.

Støttet av

Bremnes seashore A/S, Grieg Seafood A/S, Lerøy seafood A/S, Marine Harvest A/S, Seaside A/S, ScanAqua A/S, Mattilsynet, FHL og FHF

Statusrapport for Delmål 1 i FAREWELL prosjektet: Bedøvelse og avliving.....	3
Elektrobedøving, impedans og skade relatert til Laks	11
Symjetunnelar	15
Toleranse og stress ved levendekjøling av oppdrettslaks	19
Elektrobedøving av regnbueørret hos Lerøy Fossen	24
Pilot: Testing av bildeanalyseteknikk for å finne retning til laksefisk i v-formede renner	29
Kamera og programvare	30
Teori bak bildeanalyse (hypotese):	30
Hovedsteg i bildeanalysen	31
Resultat fra bildeanalysen	31
Konklusjon	32
APPENDIX A: EFSA Rapporten	38
APPENDIX B: Publikasjoner	38
APPENDIX C: Hovedfag	38

Statusrapport for Delmål 1 i FAREWELL prosjektet: Bedøvelse og avliving.

Av Bjørn Roth
Nofima A/S

Generelt:

Å bruke slag og strøm for bedøving/avliving av akvatiske dyr har en rekke velferdsmessige fordeler ifh til andre metoder som ettersom fisk kan bedøves relativt momentant (innen 1s). Likeledes er det de eneste metoder som har blitt tilstrekkelig vitenskapelig dokumentert. Hver metode har i utgangspunktet sine fordeler og ulemper. Slag er meget effektivt til å både bedøve og avlive fisk, men krever en del håndtering i forkant og er størrelsessavhengig, mens strøm kun egner seg for bedøvelse, men igjen krever dette ingen håndtering og relativt størrelse og arts uavhengig. For strøm har hovedproblemstillingen vært skader og dette har gitt grunnlagt til en rekke kreative løsninger både for kar og tørr bedøving som ikke er helt i samsvar med de gitte råd av EU/EFSA. I 2007 ble Universitetet i Bergen, Havforskningsinstituttet i Bergen, Akvaplan-Niva A/S og Norconserv A/S

tildelt midler fra NFR og FHF for å rette søkelys mot de enkelte bedøvelsessmetode og dets effekt på velferd og kvalitet. Dette for å avklare hvilken praksis som er best egnet for den enkelte art. En besluttet derfor i begynnelsen av prosjektet å arbeide mer systematisk med tørrbedøverene og slagmskinene, hvor 2 ting ville stå i fokus:

- 1.) Velferd: Elektrisk utstyr og slagmaskiner skulle oppgraderes på en slik måte at fisken ble bedøvet i henhold til anbefaling fra EFSA 2004/ Mattilsynet. Ved:
 - a) bedøve laksefisk innen 0.5 s ved hodestøt
 - b) Bevissløs død ved blodtapping.
 - c) Tilstrekkelig kraft for bedøvelse og avliving av fisk

Til nå har både laks og kveite blitt evaluert.

Status velferd: El-bedøvere

Den første modellene av Stansas el-bedøver (Stansas #1) ble det nytted 30 Vrms, 50 Hz rektifisert sinmousidal AC og stod montert på Grieg Stjernerlaks og Lerøy Hydrotech. Dyrene ble transportert gjennom el-bedøveren på et transportbånd og eksponert for ca 10-20 s med strøm. Sett fra et velferds perspektiv var disse modellene bedre enn sitt rykte. Riktig nok gikk fisken inn med forskjellige orienteringer, men forsøk viser klart at fisken ble effektiv bedøvet innen 2 s (Tabell 1) og det krevdes kun en liten oppjustering av voltstyrken for å gjøre apparatet sikker for 1 s.

Imidlertid viste det seg at dette apparatet ga i enkelte tilfeller forholdsvis mye skader så strømforsyningen ble etter mye om og men byttet ut med 100 Hz rektifisert pDC

Tabell 1:

Fish	Time (min) until regaining opercular ventilation	
	10 s	2 s
1	3	1
2	4	2
3	6	2
4	6	2
5	7	4
6	9	5
7	11	6
8	12	6
9	13	8
10	†	†
11	†	-

† classed as dead

Seneste modellene nytter Hz rippet DC. Sistnevnte kan sies å ha et positivt utslag for å forhindre skader, men kan sies å være en mindre sentralstimulerende enn rektifisert spenning og krever høyere spenning enn tidligere. Imidlertid er det usikkerhet hvor raskt fisken lar seg bedøve. Forsøk med 110 V rippet DC viser seg førts uegnet for å bedøve innen 0.5 s, hvor 110 V, 50 Hz AC å ga lovende resultater, hvor 5 av 5 fisk ble bedøvet innen 0.5 s med 110 V. En besluttet derfor å ta ut strøm fra variac'en i Stansas maskinen som leverer 100 Hz, firkant AC, max 300 V og koble gjennom et tidsrelee.

Tabell 2: Andel fisk bedøvet eksponert for 110-300 V, 100 Hz, firkant AC for 0.2-1 s.

	Proportion of fish stunned					
	110 V		220 V		300 V	
	<i>p</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>p</i>	<i>A</i>
0.2 s	0.0	-	0.3	-	-	-
0.5 s	0.9	0.7	1.0	1.9	1.0	2.2
1 s	1.0	0.94	1.0	1.94	1.0	2.4

Som vist i tabell 2 ble 92 % av fisken bedøvet innen 0.5 s med 110 V (n=24), mens 100 % ble bedøvet med henholdsvis 220 og 300 V (n=30). Resultatene viser klart at dette kan la seg gjøre, men sammenlignet med 1 s eksponeringstid hadde fisken utsatt for 0.5 s mer vigørøse kroniske kramper og høyere øyerullings rate ved endt epilepsi uavhengig av voltstyrken. Dette illustrerer at en opererer på genser på hva som er praktisk mulig å vurdere ved bruk av adferdsresponseser.

Når det gjelder grenseoppgang mellom 0.5 og 1 s eksponeringstid er det som tidligere beskrevet en utfordring for el-bedøving i kar. En 1 s regel kan allerede sies å være kommersielt tilstrekkelig og kommersielle tester har allerede vært gjennomført på en rekke arter, inkl. villfisk..

Andre fase på el-bedøving var å teste 300V firkant AC under kommersielle

betingelser. I Mars 2008, på Lerøy

Fossen, ble strømuttaket hentet direkte ufiltrert fra Variac'en og ørret kjørt gjennom systemet med en eksponeringstid på ca 6s.

Resultatene på el-bedøving ga oppløftende resultater, hvor all

fisk viste ingen tegn til oppvåking før slag. Imidlertid på fillet linjen var resultatet nokså nedslående.

Det ble derfor besluttet å jobbe mer med AC+DC og gjennomføre EEG målinger.



EEG målinger

I April 2008 ble det gjennomført EEG målinger på laks. I dette forsøket ble totalt 25 fisk eksponert for 110 V AC+DC for 0.5 s, hvor hjerne aktivitet ble fulgt umiddelbart etter strøm eksponeringen og gjennom hele oppvåkningsperioden.

Resultatene viset at all fisk mistet bevisstheten, men i en rekke tilfeller var

dette ikke lenger enn gjennom det epileptiske anfallet. For å sikre en god bedøvelse er det derfor nødvendig å utsette fisken for en lengre ekponeringstid. Forsøk med EEG på elektrobedøvet (110V for 5 s) og bløgget laks viste at 2 av 3 testet fisk gjenvant bevisstheten under utblødning og derfor bør avlivering skje på en måte som sikrer bevisstløshet gjennom utblødningsperioden.

Status velferd: Slagmaskiner

Det finnes i dag en rekke slagmaskiner på markedet. Felles for maskinene er at de både bedøver og avliver fisken som er velferdsmessig fordel. Ulempen er derimot en sensitivitet for størrelse som kan gi en % andel bomslag. Innledende forsøk med slag (tabell 3) med samme trykk viser fra en tilfeldig valgt utvalg at 8 % bom, hvor totalt 4 fisk måtte avlives manuelt. Fra 1 maskin hadde en ytterlig 2 fisk som viste tegn til oppvåkning, mens hos den andre var samtlige døde.

Tabell 3: Treff og avlivingsfrekvens fra 2 typer slagmaskiner

Stunning method	Proportion fully conscious					
	1 min		10 min		20 min	
	P	n	p	n	p	n
M 1	0.08	25	0.04	23	0.08	23
M 2	0.08	25	0.00	23	0.00	23

En større undersøkelse med SI-5 (Tabell4) om bord MS Tauranga viser hvilken utfordringer og fordeler slagmaskiner representerer. Etter justering av alle maskiner viste systemet å ha en god treffprosent.

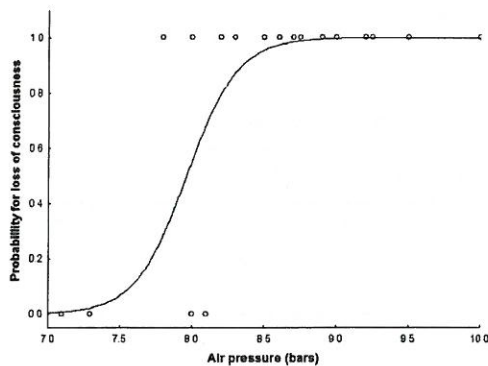
Tabell 4: Forsøk med automatiske systemer med SI-5

	Correctly	Wrongly	p-value	n
Entering stunning	605	0	1.00	605
Entering bleeding	594	11	0.98	605
Stunned	980	23	0.98	1003

Av 605 fisk undersøk kom alle inn maskinene i riktig posisjon, mens 2 % kom feil inn mot bløgging. Ved utløpet av maskinene undersøkt vi 1000 tilfeldig fisk og av disse hadde bare 2 % synlige tegn til bevissthet.

Slag og dets effekt på hjernen ble også undersøkt ved EEG. Resultatene her viser klart at slag både bedøver og avliver fisken. I likehet med tidligere studier viser bedøvelsessgraden å være avhengig av slagkraften gjengitt i bars trykk (Figur 2). Imidlertid ved en rekke tilfeller der det ble nytt trykk under 8.1 bar viste fisken ingen responser, mens EEG viste tegn til bevissthet. Dette betyr at slaget kan paralysere fisken lokalt i bakre deler i hjernen uten at den fremre delen er skadet. Imidlertid ble det påført

såpass skade at de fleste fisker mistet bevissthet innen minuttet og døde av hjerneblødning.



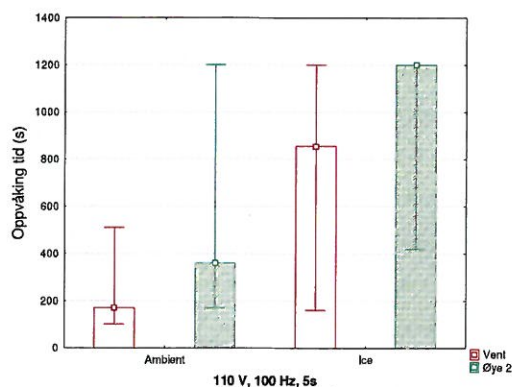
Figur 2) Sannsynlighets modell for bevisstløshet som en funksjon av slagtrykk ved bruk av EEG

Status velferd: Utblødning

Mer uklart er hvorvidt bløgging i kombinasjon med el-bedøving er tilstrekkelig for å sikre bevisløs død. Tidligere forsøkene i Farewell viser at 5 s med strøm ikke er tilstrekkelig eksponeringstid for å sikre en bevisløs død. Dette til tross for fisken ikke hadde noen basale reflekser. En må derfor enten øke den elektriske stimulerings tiden som går på bekostning av pre rigor tiden eller nytte andre alternativer som slagmaskin eller kulde. Forsøk med oksygen tolerante arter som piggvar, ål, karpe og kveite viser klart at fisk kan våkne under utblødning, da det kan ta flere timer før fisken dør. Et

alternativ er å overføre bløgget fisk til isvann. Lambooij et al. (2006) viste klart at et kuldesjokk etter el- bedøving hindrer oppvåkning, noe som vil sikre en bevisstløs død ved bløgging. Hvorvidt dette vil fungere på laksevise var da uklart.

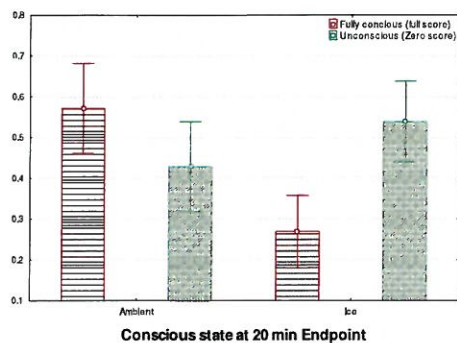
Figur



Figur 3) Tid for oppvåkning for laks bedøvet med strøm og plassert i 10 (ambient) eller -1.3 °C (Ice) sjøvann.

Høsten/Vinteren 2008 ble det gjennomført forsøk på bedøvelse og oppvåkning av laks utsatt for sjøvannstemperatur eller is-vann. Fisk ble enkeltvis bedøvet med 110V, 100 Hz AC+DC i 5 s og plassert i enten 10 eller -1 °C sjøvann. Adferden til fisken ble fulgt over de neste 20 min. Resultatene viser at et kuldesjokk forsinketiden for restituering (Figur 3). For fisk plassert i sjøvann tok det i snitt 3 min før en hadde responser, mens fisk plassert i isvann

brukte 10 min lengre. For fisk i sjøvannstemperatur hadde 58% overlevet og i full vigør, mens 42% hadde omkommet. For fisk utsatt for et kuldesjokk i tillegg viste 28 % tegn til å være ved bevissthet, 53% hadde tydeligvis omkommet, mens resterende 19% viset varierende grad av bedøvlsetillstander.



Figur 4) Bedøvelse tilstander for laks etter å ha ligget i 10 (ambient) eller -1.3 °C (Ice) sjøvann.

Det hersker liten tvil at kulde utsetter oppvåkning forbi endepunktet hvor laks naturlig mister bevisstheten ved bløtting på ca 6 min (Robb et al. 2000), men som kjent hemmer kulde også adferdsrespons, noe som bringer usikkerhet på hvor sikkert fisken dør bevisstløs. Til dette må en gjennomføre EEG målinger.

Inntil videre har resultatene på el-bedøving kombinert med slag- og bløtgemaskiner vist en tilfredsstillende kombinasjon. Dette forutsetter at slagmaskinene opererer innenfor de slagtrykk og fiskestørrelser som sikrer avliving både ved hjerneblødning og bløtting. Erfaringene tilsier, men er avhengig at operatørene og maskinene fungerer etter intensjonen.

Reference List

- Kestin, S. C., van de Vis, J. W., Robb, D. H. F., 2002. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *Vet. Rec.* 150, 302-307.
- Lambooij, B., Kloosterboer, K., Gerritzen, M. A., Andre, G., Veldman, M., van de Vis, H., 2006a. Electrical stunning followed by decapitation or chilling of African catfish (*Clarias gariepinus*): assessment of behavioural and neural parameters and product quality. *Aquacult. Res.* 37, 61-70.
- Lambooij, E., Pilarczyk, M., Bialowas, H., van den Boogaart, J. G. M., van de Vis, J. W., 2007. Electrical and percussive stunning of the common carp (*Cyprinus carpio* L.); neurological and behavioural assessment. *Aquacult. Eng.* 37, 171-179.
- Lambooij, E., Kloosterboer, R. J., Gerritzen, M. A., van de Vis, J. W.,

2004. Head-only electrical stunning and bleeding of African catfish (*Clarias gariepinus*): assessment of loss of consciousness. *Animal Welfare* 13, 71-76.
- Lambooij, E., Kloosterboer, R. J., Gerritzen, M. A., van de Vis, J. W., 2006b. Assessment of electrical stunning in fresh water of African Catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice water for loss of consciousness and sensibility. *Aquaculture* 254, 388-395.
- Lambooij, E., van de Vis, J. W., Kloosterboer, R. J., Pieterse, C., 2002a. Evaluation of head-only and head-to-tail electrical stunning of farmed eels (*Anguilla anguilla*, L.) for the development of a humane slaughter method. *Aquacult. Res.* 33, 323-331.
- Lambooij, E., van de Vis, J. W., Kloosterboer, R. J., Pieterse, C., 2002b. Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla anguilla* L.): neurological and behavioural assessment. *Aquaculture* 210, 159-169.
- Lambooij, E., van de Vis, J. W., Kuhlmann, H., Munkner, W., Oehlenschläger, J., Kloosterboer, R. J., Pieterse, C., 2002c. A feasible method for humane slaughter of eel (*Anguilla anguilla* L.): electrical stunning in fresh water prior to gutting. *Aquacult. Res.* 33, 643-652.
- Lines, J., Kestin, S., 2005. Electric stunning of trout: power reduction using a two-stage stun. *Aquacult. Eng.* 32, 483-491.
- Lines, J. A., Robb, D. H., Kestin, S. C., Crook, S. C., Benson, T., 2003. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquacult. Eng.* 28, 141-154.
- Robb, D. H. F., Kestin, S. C., 2002. Methods used to kill fish: Field observations and literature reviewed. *Animal Welfare* 11, 269-282.
- Robb, D. H. F., O'Callaghan, M., Lines, J. A., Kestin, S. C., 2002a. Electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): factors that affect stun duration. *Aquaculture* 205, 359-371.
- Robb, D. H. F., Roth, B., 2003. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. *Aquaculture* 216, 363-369.
- Robb, D. H. F., Wotton, S. B., McKinstry, J. L., Sorensen, N. K., Kestin, S. C., 2000. Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *Vet. Rec.* 147, 298-303.
- Robb, D. H. F., Wotton, S. B., van de Vis, J. W., 2002b. Preslaughter electrical stunning of eels. *Aquacult. Res.* 33, 37-42.
- Roth, B., Birkeland, s., Oyarzun, F., 2008. Commercial slaughter of Atlantic salmon; Factors affecting the quality of raw and smoked products. *Aquaculture* In review,
- Roth, B., Imsland, A., Gunnarsson, S., Foss, A., Schelvis, R., 2007a. Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunning methods. *Aquaculture* 272, 754-761.
- Roth, B., Imsland, A., Moeller, D., Slinde, E., 2003. Effect of electric field strength and current duration on

stunning and injuries in market-sized Atlantic salmon held in seawater. *N. Am. J. Aquacult.* 65, 8-13.

Roth, B., Moeller, D., Veland, J. O., Imsland, A., Slinde, E., 2002. The effect of stunning methods on rigor mortis and texture properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.* 67, 1462-1466.

Roth, B., Oeines, S., Rotabakk, B. T., Birkeland, S., 2007b. Using electricity as a tool in quality studies of Atlantic salmon. *European Journ of Food Science and Technology* in press,

Roth, B., Slinde, E., Robb, D. H. F., 2007c. Percussive stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the relation between force and stunning. *Aquacult. Eng.* 36, 192-197.

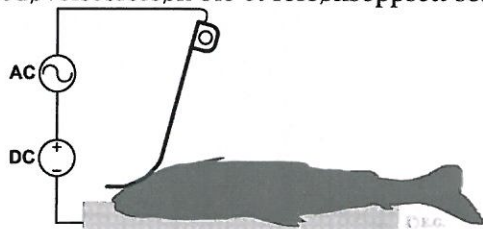
van de Vis, H., Kestin, S., Robb, D., Oehlenschlager, J., Lambooi, B., Munkner, W., Kuhlmann, H., Kloosterboer, K., Tejada, M., Huidobro, A., Ottera, H., Roth, B., Sorensen, N. K., Akse, L., Byrne, H., Nesvadba, P., 2003. Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquacult. Res.* 34, 211-220.

Elektrobedøving, impedans og skade relatert til Laks

Av Endre Grimsbø

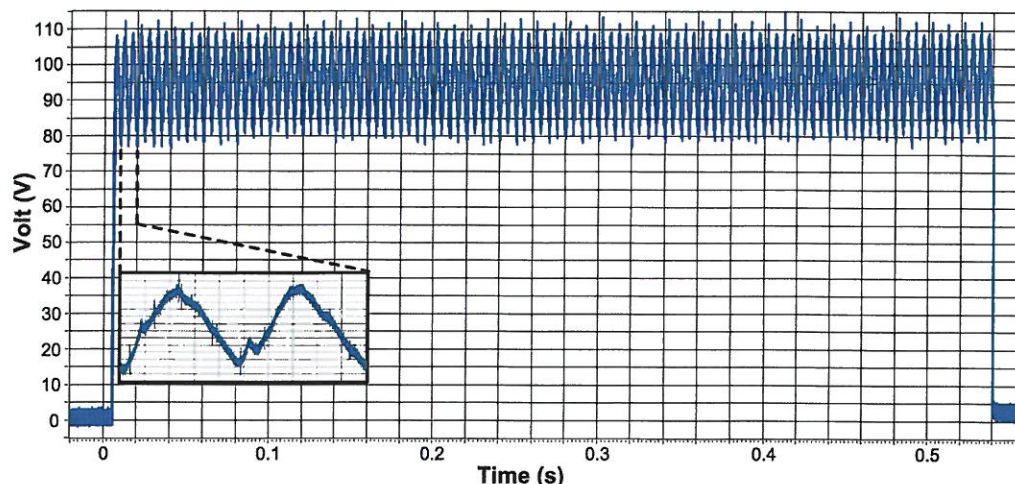
I regi av Farewell- prosjektet er det gjennomført flere forsøk relatert til elektrobedøving der man også har vurdert effekten opp mot oppvåkning og skade. Forsøkene har innbefattet både visuell vurdering av fiskens grad av bevissthet men også målinger av elektrisk aktivitet i hjernen, såkalt hjernebølgemåling eller EEG. Å gjennomføre målinger av fiskens elektriske hjerneaktivitet har i disse forsøkene vist seg å være viktig siden ren visuell bedømmelse av fiskens bevissthet i noen tilfeller har vist seg å være utilstrekkelig.

Når det gjelder skader har tidligere vært utført ulike eksperimenter både med elektrobedøving både i vann og såkalt tørr bedøving som viser at frekvens er én viktig parameter i forhold å begrense skadeomfang ved elektrobedøving av laks. For videre å avklare hvilke frekvenser som er optimale til bruk i forbindelse med elektrobedøvelse av laks. I de fleste elektrobedøvelsesforsøk ble et forsøksoppsett som vist i figur 1 benyttet.



Figur 1. Forsøks oppsett ved elektrobedøving

Slik figur 1 indikerer ble det ved de fleste forsøkene benyttet en spenningskilde som gav et signal bestående av både veksel og likestrøm, et såkalt koblet AC og DC signal. Eksempel på dette koblede signalet er vist i figur 2.

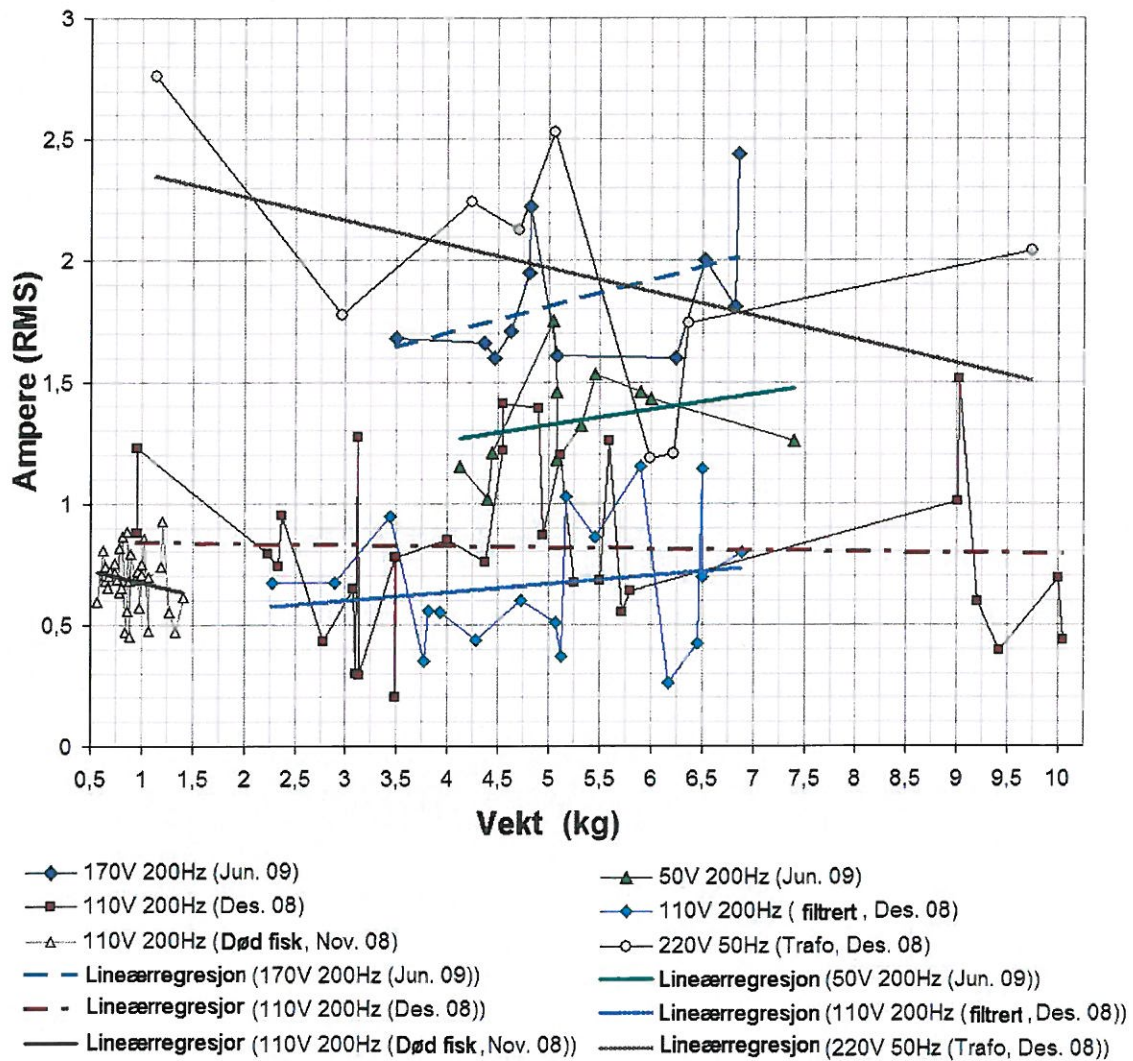


Figur 2. Eksempel på det koblede AC og DC signalet, med $\approx 0,5$ sekunders varighet.

Denne spenningskilden som gir det koblede AC og DC signalet er av typen Stansas og er produsert av en av industripartnerne i Farewell-prosjektet. Det har vist seg at denne

Stansas spenningskilden har en gunstig innvirkning på skadeomfanget ved elektrobedøving av laks. Det var derfor av interesse for prosjektet å gjøre grundigere studier av virkningen og sammensetningen av signalet denne spenningskilden gav. Flere forsøk har blitt gjennomført med ulike voltstyrke måt som RMS verdi kombinert med ulike grunnfrekvenser og filtrering/dempning av signalets AC del.

Da amperegjennomgang og fiskestørrelse, i denne sammenheng vekt, var antatt å ha en sammenheng, ble det gjennomført amperemålinger i forbindelse med de fleste forsøkene. Amperemålingene gjennomført i de ulike forsøkene er vist på figur 3.



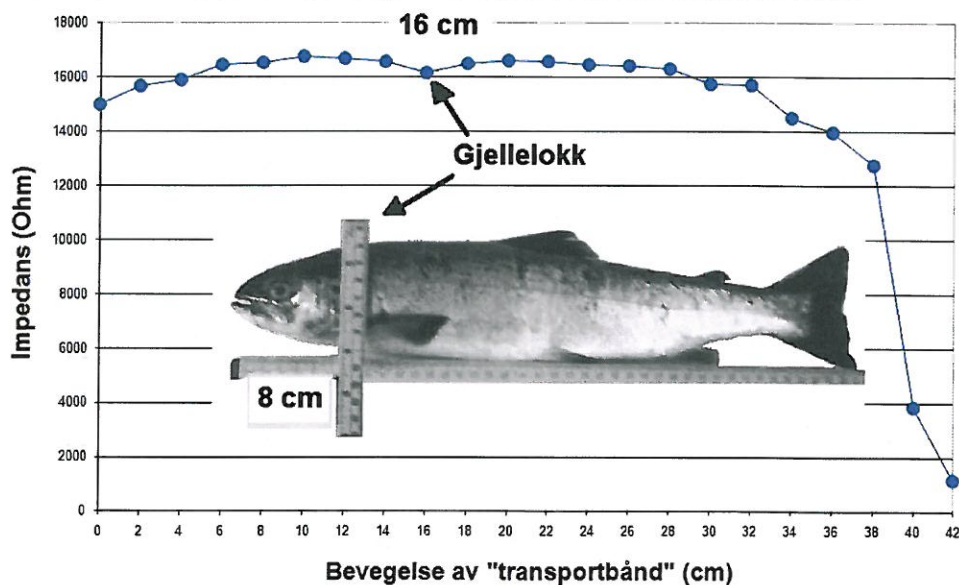
Figur 3. Målinger av amperegjennomgang i fisk ved ulike voltstyrker (RMS) og frekvenser

Det var på forhånd forventet at masse av fisk, altså fiskevekt, skulle ha en innvirkning på ampere gjennomgangen og dermed kunne påvirke effekten av elektrobedøvingen. Siden økende masse mellom elektrodene gir økende avstand ville det være naturlig å anta at en stor laks ville representere en større elektrisk motsand enn en liten og følgelig gi forskjeller i amperegjennomgang. Forsøk gjennomført på fjørfe har vist at dette med amperegjennomgang har en effekt på bedøvelsen av dyret. Dersom fiskens størrelse

hadde en effekt amperegjennomgang ville man kanskje måtte ha tilpasset det elektriske signalet brukt ved elektrobedøvelse til fiskens størrelse.

Det avgjørende for strømgjennomgang og spenningsfall over hjernen er den totale elektriske motstanden, eller impedansen, som laksen representerer. Impedans er vekselstrømsmotstand og blir oppgitt i Ohm, på samme måte som resistans som likestrømsmotstanden. Impedansen består av to deler den vanlige resistansen og så reaktansen, som kan være både induktiv eller kapasitiv. For å kartlegge den impedansen laksen representerer ved elektrobedøvelse er det blitt gjennomført forsøk med impedansmålinger, både ved bruke av impedansanalysator og beregnet impedans ut fra målinger med oscilloskop.

Et av impedansforsøkene hadde som hensikt å få klarlagt impedans variasjoner i fiskens lenderetting. Forsøksoppsettet var tilnærmet det samme som vist i figur 1, bortsett fra at spenningskilden var byttet ut med en impedansanalysator. I stedet for et transportbånd, tilsvarende det som blir brukt i industrien, ble fisken lagt på en stålplate som ble flyttet 2 cm for hver måling. Første måling ble gjort når fiskens nese kom i berøring med elektroden, det vil si metallskoene eller fingeren om man vil se figur 1. En interessant men ikke tilsiktet observasjon i forbindelse med dette impedansforsøkt var den effekten utformingen av metallskoene/fingeren har på tiden laksens hode blir utsatt for elektrisk strøm. Slik figur 4 viser blir laksens hode, på grunn av skoens utforming, utsatt for elektrisk strøm forholdsvis mye lenger tidsrom enn det man skulle forvente.



Figur 4. Impedans ved 200Hz og 0,5V når laksen blir dradd på en plate(transportbånd) gjennom elektrobedøveren. Når transportbåndet har flyttet seg 16 cm vil metallskoene/elektroden i elektrobedøveren ha flyttet seg bare 8 cm inn på laksen.

I forhold til figur 1 er det også viktig å merke seg at på grunn av avstanden mellom "transportbånd" og metallsko er målingen avsluttet når skoene ikke lenger har kontakt med fisken, sporen er derfor ikke målt. Det er også viktig å merke seg at biologiskmateriale har et ikke-lineært forhold mellom resistans, volt og ampere. Med andre ord gjelder ikke Ohms lov uten videre for biologiskmateriale, siden resistansen (Ohm) vil variere i forhold til påtrykt elektrisk spenning (volt). I tillegg til impedansmålinger av fisken i

lengderetning er det også utført en forsøksserie med impedansmålinger over laksens hode for å optimalisere frekvenser brukt til elektrobedøving.

Praktiske erfaringer med Stansas elektrobedøver ute i industrien har vist at det ved dårlig rengjøring har en tendens til å danne seg et biobelegg på elektrobedøveren isolerende plastkomponenter. For uten å gi en lekkasjestrøm, antas dette biobelegget å ha kapasitive egenskaper som demper AC delen av signalet på en negativ måte. Økning av skadeomfang og da også blitt påvist i forbindelse med forsøkene der filtrering/demping av elektrosignalet fra Stansas maskinen er blitt brukt.

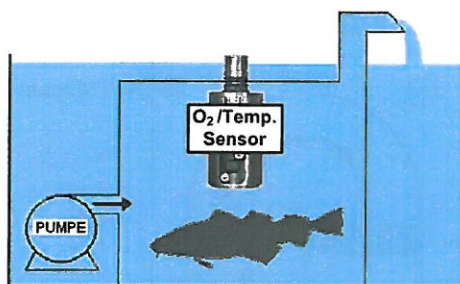
Som konklusjon på de utførte forsøkene så viser forsøkene med amperemålinger at det trolig ikke er nødvendig å ha noe tilpassning av elektrobedøving i forhold til fiskestørrelse. Slik impedansforsøket viser er det viktig at fisken er rett vendt før den går inn i elektrobedøveren. Ved rettvending vil det i større grad bli fiskens hode som utsattes for elektrisk strøm og i mindre grad fileten, sammenlignet med ikke rett vendt fisk. For å unngå spenningsfall og tap av signalkvalitet er dette med renhold av elektrobedøveren slik at der ikke oppstår biofilm på isolerende deler, koblinger og elektroder er av største viktighet.

Selv om visuell bedømmelse av bevissthet vil gi en relativ god indikasjon på bevissthetsgrad viser forsøkene at målinger av elektrisk hjerneaktivitet (EEG) er nødvendig for å fastslå dette. Siden det pr. dags dato ikke finnes tilstrekkelig kompetanse på måling av hjerneaktivitet på fisk i Norge er dette noe det bør jobbes med for å få etablert.

Symjetunnelar

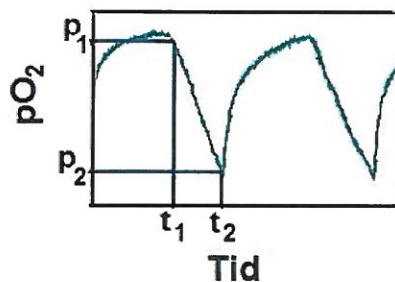
Av Endre Grimsbø

Symjetunnelar er eit tenleg reiskap for å måle oksygenopptak hos fisk. Det finst ulike prinsipp for verkemåten til ulike konstruksjonar av symjetunnelar, men i Farevell-prosjektet er det typen "sopp straums" tunnel som er den føretrekte til oksygenopptaksmålingar. På Engelsk vert denne typen symjetunnel kalla "stop flow swim tunnel". Den prinsipielle verkemåten til ein stopp straums symjetunnel er vist på figur 1.



Figur 1. Prinsipp for verkemåten til ein stopp straums symjetunnel. Fisken er plassert i eit indrekammer som vert tilført vatten frå eit ytrekammer via ei pumpe, også kalla skyljestrømspumpe. Oksygen og temperatur vert målt ved hjelp av ein optode med innebygd termistor.

Ved å starte og stoppe pumpa, vist på figur 1, vil ein og starte og stoppe tilførselen av oksygen til det indrekammeret. Når pumpa ikkje går vil fisken forbruke oksygenet i vatnet som er i det indrekammeret. Ved å måle oksygeninnhald i vatnet i indrekammer over tid er det mogeleg å berekne fisken sitt oksygenopptak. Figur 2 viser korleis oksygenivået endrar seg over tid under eit slikt forsøk der skyljestrømspumpe vert starta og stoppa og oksygeninnhald i vatnet vert målt.



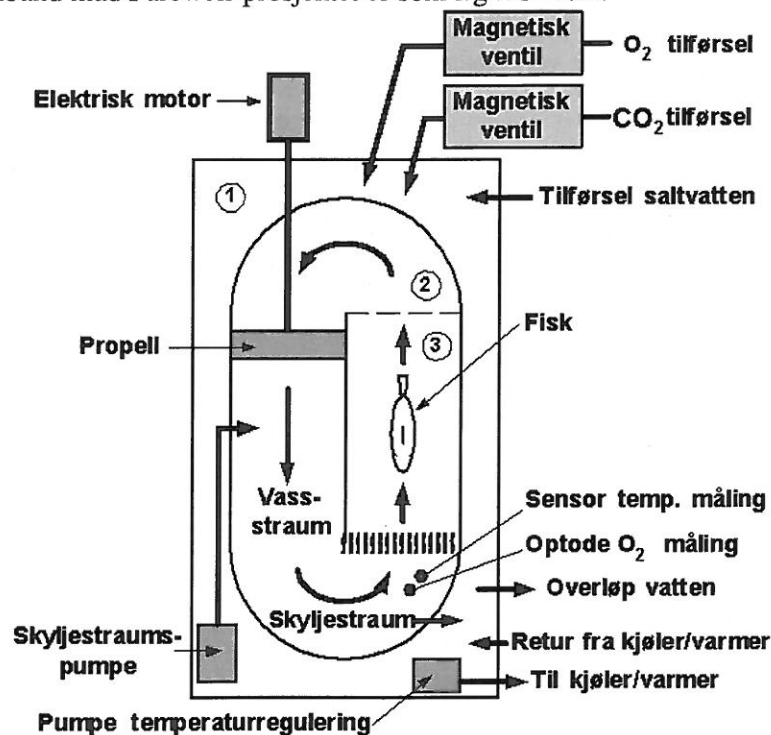
Figur 2. Døme på oksygenopptaksmåling i ein symjetunnel. Med nemninga pO_2 meiner ein partielltrykk av oksygen i vatnet. Nemningane p_1 og p_2 er høvesvis oksygenivå ved start og stopp av skyljestrømspumpe.

For å berekne oksygenopptak vert formel 1 nytta, danne gjev fisken sitt oksygenforbruk i forhold til vekt.

$$V_{O_2} = \frac{(P_1 - P_2) \alpha_{O_2} (V_{kammer} - V_{fisk})}{(t_2 - t_1) \text{ Kroppsvekt}}$$

Formel 1. Berekning av oksygenforbruk til fisk i symjetunnel. P_1 og P_2 er partielltrykk av oksygen i vatnet ved start og stopp av forsøk. α_{O_2} er løysingskoeffisienten for oksygen i vatten. V_{kammer} og V_{fisk} gjev volumet av vatten i indre kammer. Nemningane t_1 og t_2 gjev tida forsøket har vart og kroppsvekt er fisken si kroppsvekt i kilogram.

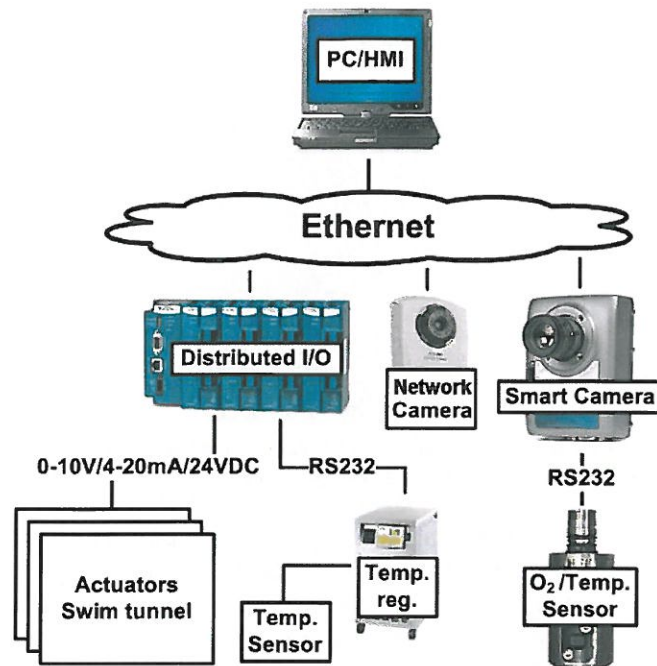
I tillegg til sjølve oksygenmålinga og styring av skyljestråumpumpe er det viktig at vatnet i tunnelen har ein jamn temperatur. Det er difor vanleg at symjetunnelar er utstyrte med ei eller anne form for kjøling. For å kunne måle oksygenopptak ved symjing er tunnelen konstruert slik at der blir eit rundlaup vert generert ein straum av vatten som fisken vert ståande å symje i. Sjølve prinsippet for instrumenteringa av symjetunellane brukt i samband med Farewell-prosjektet er som figur 3 viser.



Figur 3. Aktuatorar og instrumentering av ein symjetunnel. Ytrekammer er merka ein, indrekammer er merka to. Den delen av indre kammer der fisken sym er merka tre, er avgrensa av ein plastkonstruksjon i forkant og av ei rist i bakkant. Det er den elektriske motoren med propell som genererer vassstraumen som fisken sym i.

Ved å variere motoren og dermed propellen sitt turtal er det mogeleg å gjere målingar av oksygenforbruk ved ulike symjehastigheiter. Det er også mogeleg å gjere forsøk der ein endrar innhaldet i vatnet, det være seg gass, salinitet eller anna kjemisk innhald.

For å styre sjølve symjetunnelen er det ein fordel at operatøren ikkje sit i same rom, sidan fisken då lett vert utoa og endrar oksygenopptak. Løysinga som er valt for å kunne fjernstyre symjetunnelen sine ulike motorar, pumper og ventiler (aktuatorar) vert kommunikasjon over vanleg Ethernet nettverk nytta. Sjølve kommunikasjonsprotokollen som er nytta for å styring er DataSocket, men og Modbus-protokoll ville ha vore mogeleg å nytte i denne samanheng. Det er laga LabVIEW-baserte program for å kunne styre symjetunnelen og som då også blir systemet sitt grensesnitt mot brukar. Heile kommunikasjons konseptet er vis t i figur 4. Aktuatorane vert styrt direkte frå PC-en ved hjelp av DataSocket kommunikasjon. Det er og lage ei eigen webside som ein kan nå internt i nettverket for å kunne ha oversikt over forsøket. Ved å kombinere dei innebygde web-serverande på nettverks-kameraet og smart-kameraet vert det mogeleg å observere både fisken sin symjeaktivitet samt aktuelle oksygen og temperaturverdi.



Figur 4. Styringa av symjetunnelen er basert på nettverks kommunikasjon med bruk av DataSocket som kommunikasjonsprotokoll.

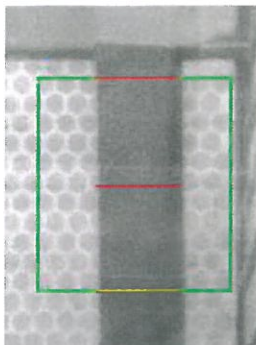
Ved bruk av tradisjonell instrumentering utan mogelegheit for bildebehandling vil det være svært tidkrevjande å køyre forsøk med symjetunnelar på grunn av at ein då må manuelt fylje med på fisken sin symjeaktivitet. Det var difor eit mål med instrumenteringa av symjetunnelen å automatisere tunnelen slik at det ikkje lenger er naudsynt å manuelt evaluere fiskens symjeaktivitet. Som figur 4 viser er eit industrielt smart kamera ein del av instrumenteringskonseptet for symjetunnelen. Denne typen kamera er utstyrt med eigen prosessorkraft slik at det kan køyre egne program utvikla i LabVIEW. Dette kameraet si oppgåve er å avgjere om fisken har ønska symjeåtferd dersom ikkje må styreprogrammet som køyrer på PC-en få melding om dette slik at forsøket vert avbrote.

Det er ikkje utan vidare enkelt å lage ein god algoritme for å avgjere om fisken i en symjetunnel har tilfredstillande symjeaktivitet. Sidan vatnet strøymar gjennom kammeret der fisken sym vil fisken ende opp i kammerets bakkant dersom symjeaktiviteten opphøyre. Ved å definere bakre del av kammeret der fisken sym som eit ulovleg område for fisken, sjå figur 5, er det mogeleg lage ein relativt enkel algoritme som avgjer symjeaktiviteten.



Figur 5. Dersom fisken er i området tett opptil rista som avgrensar kammeret kan ein gå ut frå at det ikkje tilstrekkeleg symjeaktivitet..

Algoritmen for å detektere at fisken ikkje er i det ulovlege området vert gjort ved å feste ein svart tape på lys bakgrunn nær opptil rista som avgrensar kammeret, sjå figur 6.



Figur 6. Svart tape festa på den lyse bakgrunnen i bakkant på kammeret der fisken sym. Den grønne linja indikerer området som vert analysert av algoritmen. Dei raude linjene er den breidda algoritmen har målt tapen til å være.

Siden tapen har ei lik breidde kan ein ved å måle breidda på tapen fleire stader i heile det ulovlege området er det mogeleg å slå fast om fisken dekker over deler av den. Dersom fisken dekker deler av tapen kan ein gå ut frå at fisken ikkje har ein tilfredstillande symjeaktivitet. Dersom fisken er i det ulovlege området er kameraet programmert slik at ein nettverksvariabel, basert på DataSocket, vert endra og gjev signal til styreprogrammet på PC-en at symjeaktiviteten ikkje lenger er tilfredstillande. Ved bruk av det nye konseptet for styring av symjetunnelar vil det no være mogeleg å køyre forsøk på oksygen opptak hos fisk på ein meir effektiv måte enn tidlegare.

I tillegg til symjetunnel for oksygenopptaksmåling er det også utvikla ein eigen symjetunnel for måling av impedans av symjande fisk. I denne vert det no gjort vidare arbeid med tanke på å kunne måle impedansendringar knytt opp mot veskebalanse, volumendringar og stress hos fisk.

Toleranse og stress ved levendekjøling av oppdrettslaks

AV ATLE FOSS

Mål

Et av delmålene i prosjektet er å kunne identifisere fiskens toleranseområde for endringer i temperatur, d.v.s. først og fremst temperaturfall. I kommersielt havbruk benyttes levendekjøling av all fisk ved både transport og slakt for å 1) redusere metabolismen, samt roe dyret ned for lengre transport, noe som 2) lettgjør håndtering og 3) gir bedre holdbarhet. Fellesnevneren for begge metoder er at fisk forflyttes fra sjøtemperatur og rett inn i kjølt vann enten i kar, brønnbåt eller levendekjølings tanker. Temperaturfallet varierer i henhold til sesong, men ved levendekjøling er det vanlig å benytte temperaturer som varierer fra -0,5 til 6 grader celsius. Imidlertid er effekten av temperaturfallet på fiskens velferd dårlig studert, og det finnes i dag ingen studie som klart identifiserer temperaturtoleransen for laksefisk.

Hovedmål med denne del-Task er derfor å avdekke konsekvenser av levendekjøling av fisk for å sikre forsvarlig velferd i forbindelse med slakt. Fokus har blitt satt på fiskens fysiologiske tilpasningsevne og forsøk har blitt utført med hensyn på å fremskaffe vitenskapelig dokumentasjon som kan danne grunnlag for fremtidig lovgivning og anbefalinger om beste praksis på temaet levendekjøling av fisk.

Bakgrunn

Fra januar 2010 trådte forskriftene om bedøvelse og avliving av oppdrettsfisk gitt av det norske Fiskeri- og kystdepartementet i 2006 i kraft. I den forbindelse vil bruk av CO₂ eller annen gass være prinsipielt forbudt til bedøvelse og avliving av fisk, men fortsatt lovlig brukt til sedering (beroligelse). For levendekjøling eksisterer det kun vage formuleringer for reguleringer om mulige hastigheter for temperaturfall. Ettersom en stor del av oppdrettsnæringen bruker levendekjøling av fisk, med eller uten moderate mengder av CO₂ før bedøvelse og avliving, blir metoden regnet som en forbehandling og er derved akseptert. Dette skyldes mangelfull dokumentasjon som igjen gjør at norske myndigheter ikke kan regulere levendekjøling ut fra dyrevernsmessige hensyn. Samtidig har et ekspertpanel i European Food Safety Association (EFSA) gjennomført en risikoanalyse på velferden hos Atlantisk laks under slakt (EFSA 2009). I likhet med norske forskrifter klarer heller ikke EFSA å kvantifisere betydningen av hverken temperaturfall eller CO₂, men anslår at en stor del av fisken utsettes for dårlig vannkvalitet under denne prosessen. På en skala fra 0-3 i smertegrad får dårlig vannkvalitet en "hazard score" lik 1. Ved å kombinere denne scoren med mengde/antall fisk og tiden fisken utsett for dårlig vannkvalitet, får levendekjøling en relativt høyt total score i hvilken som helst slaktelinje. Isolert sett burde levendekjøling bli fjernet fra en slik beregning. Imidlertid er styrken med EFSA rapporten at velferden hos fisk under slakt kan kvantifiseres gjennom hele slaktelinjen. Selv om det ikke fremgår her, er det rimelig å tro at kjøling i seg selv vil hemme og begrense fiskens evne til å oppfatte og respondere ovenfor belastninger som måtte forekomme. I dette ligger det en rekke beregninger på hvor lenge fisken på benken, følelse for elektrisk strøm, bomslag, oppvåking under utblødning og levende sløyting

(EFSA 2009). Nyere forsøk på African catfish viser at fisk som oftest våkner etter elektrobedøving, men kombineres dette med et kuldesjokk er resultatet en bevisstløs død (Lambooij et al. 2006). Likeledes gjelder dette for laks, hvor elektrisk bedøvet laks kjølt fra 9 til 0 °C fikk forlenget bedøvelsetiden og døde ved kortere eksponeringstider enn fisk holdt ved 9 °C (Roth pers. obs.).

Temperatur er den parameteren som kontrollerer og begrenser alle fysiologiske og adferdsmessige mekanismer hos ektoterme organismer og beskrives som den abiotiske hovedfaktor for fisk (Brett, 1971). Fisk er i all hovedsak i stand til å tilpasse seg til gradvise endringer i temperatur innenfor et gitt spredningsområde, vanligvis forårsaket av naturlige sesong- og tidevannsavhengige svingninger. Raske økninger eller senkninger kan imidlertid forårsake fysiologiske og adferdsmessige forstyrrelser og ha en vesentlig effekt på fiskens velferd (Tanck et al. 2000; Rørvik et al. 2001; Donaldson et al. 2008; Roth et al. 2009). Det er imidlertid studier som har indikert at de fysiske-mekaniske belastningene som ofte forekommer i tid nær en kjøleprosess, d.v.s. faktorer som flytting, trengning og pumping, kan ha en betydelig negativ effekt på fisken (Skjervold et al. 2001), og disse faktorene bør i større grad tas med ved evaluering av levendekjøling i en velferdssammenheng.

Eksperimentelt arbeid

1. Temperatur og fysisk håndtering

Laks (ca. 1 kg, totalt 120 stk.) som var akklimatisert over lang tid til 4, 8 og 16 grader ble utsatt for forskjellige temperaturoverføringer under kontrollerte betingelser. Fisken ble overført direkte ved bruk av håv til 500 l tanker som holdt temperaturer på 16, 8, 4 eller 0°C. Alle kombinasjoner av temperaturendringer horisontalt (kontrolloverføringer) og vertikalt nedover ble utført, f.eks. 16-16, 16-8, 16-4, 16-0 o.s.v., totalt 9 replikerte overføringer. I tillegg ble det tatt ut 0-prøver fra hovedkarene (tre temperaturer). Blodfysiologiske parametre (gasser, ione-innhold og pH, glukose og laktat) ble målt i fisken etter 1 og 6 timers eksponering.

2. Isolert effekt av temperatur

Laks (ca. 1 kg, totalt 30 stk.) som var akklimatisert over lang tid til 16 grader i 500 l tanker ble utsatt for 4 forskjellige temperaturfall uten fysisk håndtering eller andre ytre forstyrrelser under kontrollerte betingelser. Temperaturfallene som ble undersøkt var 16-4 grader i løpet av 1 og 5 timer, samt fall fra 16-0 grader i løpet av samme tidsrom. Blodprøver ble tatt av fisken 1 time etter at slutt-temperatur (4 eller 0 grader) var oppnådd. I tillegg til parametrene som er listet over ble det også analysert blod for innhold av stresshormonet kortisol.

Resultater

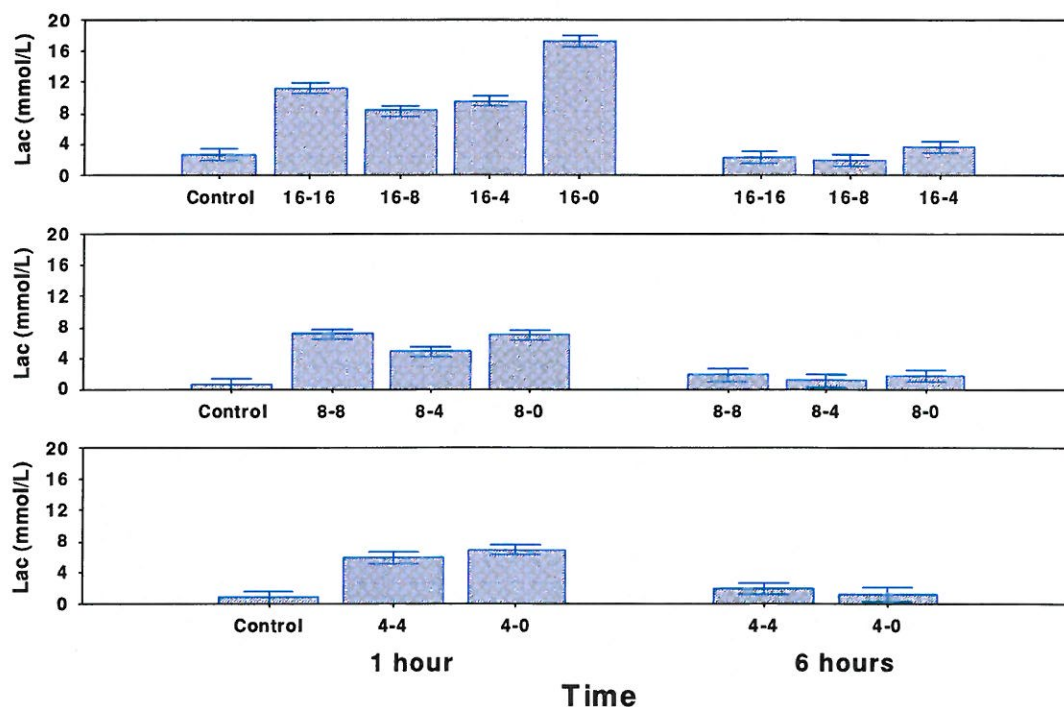
Eksp. 1.

Direkte overføringer gav:

- Umiddelbar økning (1 t) i laktat, men kraftig reduksjon igjen etter 6 t.

- Økt pO₂ og senket pCO₂ i blodet som igjen fører til økning i blod pH.
- Økning i glukosenivå frem mot 6 t "post stress".
- Noe endret ione-balanse etter 6 timer.

Laktat er den parameteren som har skilt seg ut som den beste indikatoren på fysiologisk forstyrrelse/stress i dette forsøket. Det ble funnet en tydelig nivåøkning i alle grupper og ved alle temperaturer 1 time etter overføring, sammenliknet med kontrollgruppen (Fig. 1). Samtidig gav også overføring til samme temperatur (d.v.s. kontrolloverføringer 16-16, 8-8 og 4-4) en solid økning i laktatnivået. Etter 6 timer sank laktatnivået betraktelig i alle grupper, også der hvor fisken var blitt overført til null grader, med unntak av 16-0 gruppen, hvor all fisken døde/ble terminert før 6 timer var gått av velferdshensyn.

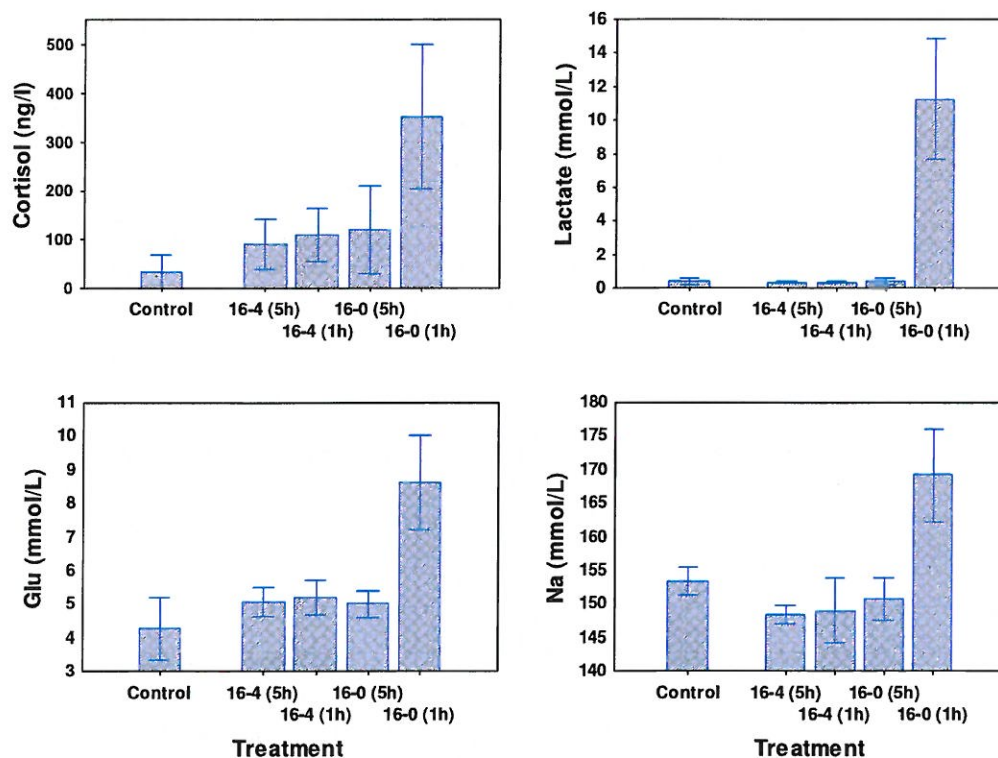


Figur 1. Laktat nivåer i plasma hos laks 1 og 6 timer etter fysisk overføring til identisk eller lavere temperatur. Kontroll (null) prøver ble tatt før overføring.

I tillegg til **laktat**, som var den parameteren som gav den mest interessante informasjonen og som er presentert i figur 1, omtales de resterende parametre kun kort. **Glukose** er en parameter som ofte "gjenspeiler" kortisolnivåer, og en økning i glukosenivå kan indikere en stressrespons. Det ble funnet en generell, men meget moderat økning i glukosenivåer 6 timer etter overføring. Ioneverdier (**Na** og **K**) gav ikke noen spesiell nyttig informasjon m.h.p. stress. For Na fant vi en økning i alle grupper sammenliknet med kontrollgruppen, noe som kan tyde på at økningen skyldes selve overføringen, og ikke er et resultat av endret temperatur.

Eksp. 2.

Senkning av temperaturer fra 16°C til 4°C og fra 16°C til 0°C over en periode på 1 eller 5 timer, uten å fysisk forstyrre fisken, resulterte ikke i noen signifikante økninger i noen av de undersøkte parametre en time etter overføring, med unntak av gruppen som ble overført fra 16°C til 0°C på en time. I sistnevnte gruppe fant vi en signifikant økning i blod natrium, glukose, laktat og kortisolnivå, samtidig med et økt partialtrykk av CO₂ (og medfølgende nedgang i pH), sammenliknet med alle andre grupper (Fig. 2).



Figur 2. Endringer i blod stress-parametre hos laks akklimatisert til 16 °C ved raske temperaturfall (1 og 5 timer). Blodprøver ble tatt 1 time etter temperaturfall.

Diskusjon

Resultatene fra eksperiment 1 indikerer at den fysiologiske responsen på overføring til lavere temperaturer ser ut til å være til dels uavhengig av temperatur, d.v.s. de rent fysiske overføringene, evt. endret tankmiljø, gir kraftigst utslag på laktatnivåer. Liknende resultater har blitt funnet i flere andre studier; Skjervold et al. (2001) viste en dobling i laktatnivå etter levendekjøling når fisken ble trenget vs utrenget i forkant (16.8 til 1 °C). Skjervold et al. (1999) fant en dobling i laktatnivå i høy vs. lav tetthet før levendekjøling, men ingen effekt av selve levendekjølingen (fra 12.8 til <4 °C). Hyvärinen et al. (2004)

fant en økning i laktat etter kuldesjokk (10 min 0,2 °C) hos ørret, men nesten tredobbelt så høyt nivå etter 60 min svømming. Svømming + kuldesjokk ga lite ekstra utslag.

I eksp. 2 ble fisken ikke håndtert eller fysisk forstyrret på noen måte, og et temperaturfall fra 16°C til 4°C i løpet av 1 og 5 timer, så vel som et fall fra 16°C til 0°C i løpet av 5 timer, resulterte ikke i økte laktat-nivåer. En ikke-signifikant økning i plasma kortisol ble funnet 1 time etter overføring i alle grupper, mens en signifikant økning i både laktat og kortisol ble funnet i gruppen med det mest dramatiske temperatur-fallet (16°C til 0°C på 1 time).

Hurtig nedkjøling ser, ut fra de resultatene som er funnet i dette studiet, dermed ikke ut til å representere en vesentlig stressor for laks av denne størrelsen. På den annen side finnes det en grense ettersom fisk direkte overført fra 16 til 0 °C døde etter relativt kort tid.

Konklusjon

Resultatene fra dette studiet indikerer at laks er i stand til å tåle store, og tildels raske, temperaturfall uten vesentlig effekt på stress-parametre målt i blod og plasma. Disse funnene kan ha betydelig verdi for lakseindustrien ettersom lovgivende restriksjoner pr. i dag setter betydelig strengere krav til nedkjølingsrutiner før slakting enn det resultatene fra dette studiet tilsier er nødvendig.

Referanser

- Brett, J. R. 1971. Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American Zoology* 11, 99–113.
- Donaldson, M.R, Cooke, S.J., Patterson, D.A., Macdonald, J. S. 2008. Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology* 73, 1491–1530.
- EFSA, 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed Atlantic salmon. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA J.* 2012, 1–77.
- Hyvärinen, P., Heinimaa, S., Rita, H. 2004. Effects of abrupt cold shock on stress responses and recovery in brown trout exhausted by swimming. *Journal of Fish Biology* 64, 1015-1026.
- Lambooij, E., Kloosterboer, R.J., Gerritzen, M.A., van de Vis, J.W. 2006. Assessment of electrical stunning in fresh water of African catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice water for loss of consciousness and sensibility, *Aquaculture* 254, 388–395.
- Rørvik, K.A., Skjervold, P.O., Fjæra, S.O., Mørkøre, T., Steien, S.H. 2001. Body temperature and seawater adaptation in farmed Atlantic salmon and rainbow trout during prolonged chilling, *Journal of Fish Biology* 59, 330–337.
- Roth, B., Imsland, A.K., Foss, A. 2009. Live chilling of turbot and subsequent effect on behaviour, muscle stiffness, muscle quality, blood gases and chemistry. *Animal Welfare* 18, 33-41.
- Skjervold, P.O., Fjæra, S.O., Østby, P.B. 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture* 175, 93–101.
- Skjervold, P.O., Fjæra, S.O., Østby, P.B., Einen, O. 2001. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192, 265-280.
- Tanck, M.W.T., Booms, G.H.R., Eding, E.H., Wendelaar Bonga, S.E. Komen, J. 2000. Cold shocks: a stressor for common carp. *Journal of Fish Biology* 57, 881–894.

Elektrobedøving av regnbueørret hos Lerøy Fossen

Ragnar Nortvedt, Endre Grimsbø, Erik Dahl-Paulsen, Lars Stien, Camilla Gjerstad, Yunita Maimunah, Grigory Merkin, Atle Foss og Bjørn Roth

Sammendrag

Regnbueørret som ble elektrobedøvet med en spenning på 100 v og 50 Hz fikk ingen skader og viste ingen tegn til bevissthet etter bedøvelsen som kun varte 1 sekund over hodet eller estimert til 0,5 sekunder over hjernen. Dette er interessant fordi det tilfredsstiller Mattilsynets krav om bedøvelse innen 0,5 sekunder fra fisken utsettes for bedøvelsesprosedyren til den er bevisstløs. Ifølge EU's faglige ekspertpanel (EFSA 2004) skal fisk så vel som pattedyr og fjærkre være bedøvet innen 1 sekund. Begge disse krav er altså tilfredsstilt ved herværende prosedyre, hvor alle fisk enkeltvis ble sendt med hodet først gjennom bedøveren.

Retningsorientering av fisken gjennom bedøveren er viktig. Gitt altså at fisken her ble sendt med hodet først gjennom det elektriske feltet hadde de øvrige styrte variable mindre sammenlignbar effekt på fiskens velferd under bedøvelse enn om vi skulle sendt den gjennom med halen først. Likvel ble det observert noen forskjeller avhengig av testbetingelsene.

Material og metode

Regnbueørret ble fordelt i inndelte ventemerder (temp. 13,1 °C) ved Lerøy Fossen på Osterøy den 19.06.2008 i hht. tre størrelseskategorier (<3 Kg, 3-5 Kg og > 5 Kg). Blodprøver ble tatt for å estimere normalnivå før forsøksstart.

Selve forsøket (n = 8 – 13 fisk i hver testgruppe) ble gjennomført 26.06.2008. Både personell ved fabrikken og utenfra deltok under gjennomføringen. I hht. til det systematiske forsøksdesignet (tabell 1) ble de ulike vektclassene (2.3, 3.8 og 5.3 Kg) eventuelt beroliget før pumping med ingen, 5 eller 10 ppm AQUI-S, og enten tørket med håndklede eller sprayet med saltvann eller ikke behandlet etter pumping og umiddelbart før elektrobedøving. Sistnevnte behandling ble gjort for å teste effekt på ledningsevne under bedøving. Selve bedøvingen skjedde under ulik spenning på 50, 75 eller 100 volt, ulik frekvens på 50, 100 eller 400 Hz og med ulik båndhastighet på 1, 5 eller 20 cm/sekund. De parallelle kontrollgruppene (Test 5N, 10N, 15N og 20N) representerte midlere betingelser, med unntak av økt båndhastighet (20 cm/sekund) gjennom elektrobedøveren, men med behandling av 8 elektroder i kontrollgruppene mot 1 elektrode i de øvrige gruppene. Gjennom kombinasjon av båndhastighet, antall elektroder og antagelsen om at fiskehodet gjennomsnittlig var 5 cm langt og at hjerneområdet gjennomsnittlig var 2,5 cm langt, ble fiskens hjerne utsatt for strømbehandling i gjennomsnittlig 0.5, 1.0 eller 2.5 sekunder (tabell 2).

Elektroden var utformet som en bøyle som passerte langs kroppen etterhvert som fisken passerte på båndet. All fisk ble retningsorientert med hodet først gjennom bedøveren. Øyerulling, ventilasjonsbevegelser og eventuelt død ble registrert som responser etter bedøving. Laktat ble målt i blodet og fisken ble videre maskinelt filetert ifølge fabrikkens

vanlige prosedyrer. Fileter fra hver gruppe ble lagret seks døgn på is på kjøll. Vektendring, hardhet, pH i muskel og endring i rødfarge (vha. kamera) ble registrert etter lagring.

Tabell 1. Forsøksdesign ved Lerøy Fossen 26.06.2008.

TEST NR	Fisk (n)	Vekt (kg)	Trenging i merd (timer)	AQUI-S (ppm)	Våt/tørt skinn	Spenning 50 / 100 volt	Frekvens 50/100 Hz	Båndhastighet elektro (m/sek.)
Test 1	8	2.30	20.000	5	Tørket	50	50	0,05
Test 2	8	2.30	20.000	5	Spray saltv.	100	50	0,01
Test 3	8	2.30	25.000	10	Tørket	100	400	0,05
Test 4	8	2.30	10.000	10	Spray saltv.	50	400	0,01
Test 5N	13	3.80	90.000	0	normal	75	100	0,20
Test 6	8	2.30	195.000	5	Tørket	100	400	0,01
Test 7	8	2.30	210.000	5	Spray saltv.	50	400	0,05
Test 8	8	2.30	190.000	10	Tørket	50	50	0,01
Test 9	8	2.30	210.000	10	Spray saltv.	100	50	0,05
Test 10N	13	3.80	150.000	0	normal	75	100	0,20
Test 11	9	5.30	75.000	5	Tørket	50	400	0,01
Test 12	9	5.30	90.000	5	Spray saltv.	100	400	0,05
Test 13	9	5.30	40.000	10	Tørket	100	50	0,01
Test 14	9	5.30	60.000	10	Spray saltv.	50	50	0,05
Test 15N	13	3.80	75.000	0	normal	75	100	0,20
Test 16	9	5.30	145.000	5	Tørket	100	50	0,05
Test 17	9	5.30	160.000	5	Spray saltv.	50	50	0,01
Test 18	9	5.30	130.000	10	Tørket	50	400	0,05
Test 19	9	5.30	145.000	10	Spray saltv.	100	400	0,01
Test 20N	13	3.80	130.000	0	normal	75	100	0,20

Resultater og diskusjon

Tabell 2. Varighet av elektrobedøvelse og responser registrert som Indikasjon på bedøvelsens suksess.

GRUPPE	El.bedøvelse	Responser etter bedøvelse		
	over hjernen	26.06.2008	26.06.2008	26.06.2008
	Sekunder	Øyerull	Ventilasjon	Død
1	0,5	0,00	0,00	0,00
2	2,5	0,25	0,00	0,00
3	0,5	0,50	0,33	0,17
4	2,5	0,13	0,25	0,00
5	1	0,00	0,00	0,00
6	2,5			
7	0,5	1,67	1,56	0,22
8	2,5	0,00	0,00	0,00
9	0,5	0,00	0,00	0,00
10	1	0,00	0,00	0,00
11	2,5	0,88	0,50	0,13
12	0,5	1,38	0,88	0,00
13	2,5	0,00	0,00	0,00
14	0,5	0,63	0,00	0,00
15	1	0,00	0,00	0,00
21	0,5	0,00	0,00	0,00
17	2,5	0,00	0,00	0,00
18	0,5	0,78	0,78	0,11
19	2,5	0,00	0,00	0,00
20	1	0,00	0,00	0,00
Gj.snitt kontroll:		0	0	0

Gruppe 6 og 16 måtte utelates fra registreringene pga. feil i prosedyrer, men gruppe 16 ble erstattet av en ny gruppe 21. Generelt ble det observert svært god effekt av bedøvelsesmetoden ved de fleste betingelser, da både øyerulling og ventilasjon viste generell mangel på bevissthet hos fisken, samtidig som dødeligheten var svært lav (0,0 i alle kontrollgrupper under normalbetingelser). Lavest tap av bevissthet og høyest dødelighet ble observert i gruppe 7. Dette var liten fisk med kort beroligelse i AQUI-S, lang trengetid, sprayet med saltvann og bedøvet med 50v/400Hz i 0,5 sekunder over hjernen. Det så ut til at behandling med 100 v og 50 Hz fungerte aller best. Det var ingen systematiske endringer i kvalitetsparametrene i hht. til design.

Tabell 3.

GRUPPE	Registreringer start lagring			
	26.06.2008 Vekt av filet, kg	26.06.2008 hardhet	26.06.2008 pH	26.06.2008 Blod Laktat
1	0,668	19	6,48	11
2	0,569	15	6,62	
3	0,599	16	6,35	12,6
4	0,653	17	6,61	10,6
5	1,108	19	6,47	8,8
6				12,3
7	0,678	20	6,70	14,5
8	0,690	23	6,69	9,9
9	0,603	21	6,68	15,8
10	1,300	21	6,61	7,6
11	1,871	18	6,53	14,4
12	1,829	17	6,60	13,7
13	1,674	19	6,47	11,5
14	1,821	18	6,56	10,5
15	0,792	20	6,62	10,4
21	1,478	24	6,69	6,6
17	1,735	20	6,53	15,3
18	1,740	21	6,70	14,2
19	1,795	20	6,61	14,5
20	1,383	24	6,68	7,9
Gj.snitt kontrollgrupper		21	6,59	8,7

Endring etter 6 døgns lagring på is

GRUPPE	% VEKTENDRING	% MYKNING	endring i pH- enheter	% endring Rødfarge
1	2,4	58,1	-0,10	2,8
2	2,1	63,8	-0,21	2,4
3	2,6	52,1	-0,04	1,0
4	3,3	45,9	-0,20	-2,7
5	3,1	59,7	-0,10	0,2
6				
7	1,2	63,9	-0,14	3,0
8	0,9	69,1	-0,16	0,7
9	-0,1	64,7	-0,07	1,6
10	3,0	64,4	-0,23	2,3
11	3,8	58,1	-0,30	0,3
12	3,5	54,2	-0,33	0,9
13	3,9	61,2	-0,22	1,6
14	3,7	55,7	-0,22	-1,2
15	0,7	64,3	-0,11	1,4
21	2,8	71,2	-0,24	2,4
17	3,1	47,8	-0,20	4,4
18	2,8	58,7	-0,33	6,5
19	3,2	61,9	-0,26	0,7
20	2,5	65,0	-0,25	3,6
22	2,3	73,4	-0,34	2,4
Gj.snitt kontroll:	2,3	63,4	-0,17	1,9

Pilot: Testing av bildeanalyseteknikk for å finne retning til laksefisk i v-formede renner

Lars Helge Stien^{1,2} og Ragnar Nortvedt¹

¹Anvendt & Industriell Biologi, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen

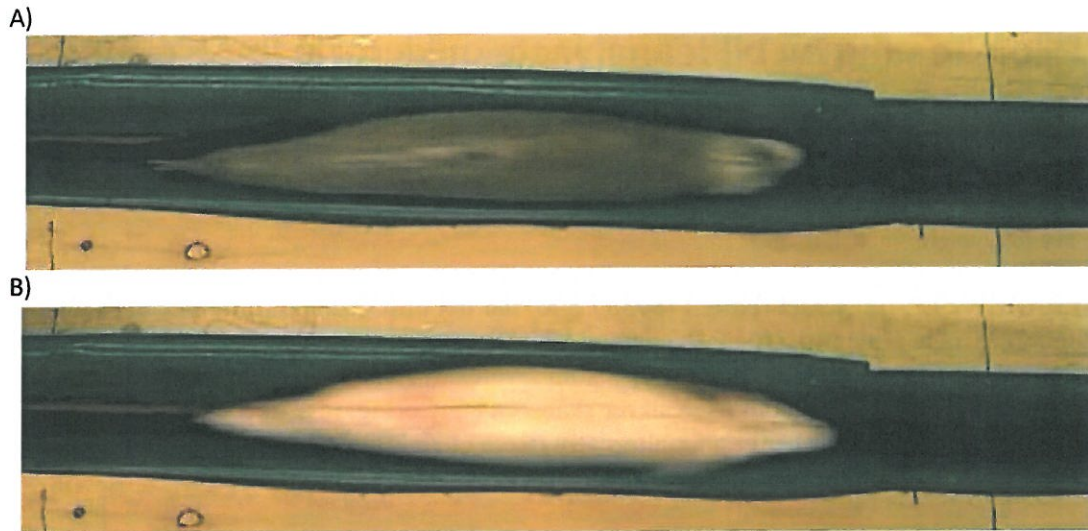
²Havforskningsinstituttet, Bergen

I FAREWELL-prosjektet (NFR 178938 / S40) har det blitt diskutert om bildeanalyse er en mulig måte å identifisere hvilke veg en laks eller ørret er orientert i en v-formet renne. Bakgrunnen for dette er at oppdrettsfisk som leveres til slakteriene, bør avlives på en rask og etisk forsvarlig måte som både sikrer skånsom håndtering, rask død og god kvalitet. Elektrisk bedøvning er her et godt alternativ (Roth et al. 200X). Men ved dagens rutiner kommer fisken inn mot elektrodene med enten hodet eller halen først (figur 1).



Figur 1. Tilfeldig orientering av laks gjennom elektrobedøvingsenhet.

Den tilfeldige orienteringen fører til at ca. 50 % av fiskene kommer inn under elektrodene med halen først, hvilket medfører en uheldig stimulering av muskelen og sannsynligvis ubehag for fisken før effekten av strømpulsen endelig når hjernen og fisken bedøves. Dette må forbedres ved å rettvende fisken før bedøving. Februar 2008 ble det derfor utført en pilot testkjøring. En regnbueørret (ca 4 kg) ble filmet rett ovenfra av et IP-kamera idet fisken ble forflyttet gjennom rennen med en hastighet på ca 1 m/sekund (figur 2). Av praktiske årsaker er fisken vendt mot høyre i begge filmene (figur 2).



Figur 2: A) Regnbueørret i renne, buk ned. B) Regnbueørret i renne, buk opp.

Filmene ble tatt i et relativt svakt opplyst laboratorium. Et uønsket resultat av dette var at det ble en sterk skyggeeffekt i bunnen av v-rennen. Pikslene er her nesten helt svarte i stedet for grønne (figur 2). Fisken kunne derfor ikke identifiseres basert på fargeverdi alene (se spesielt figur 2A). Dette kompliserte bildeanalysen noe.

Kamera og programvare

Kamerat (AXIS 207W) var et trådløst IP-kamera som potensielt kunne gi 30 bilderammer per sekund med en oppløsning på 640x480 piksler. Den største fordelen med denne typen kamera er at de har en innebygget webserver. Kameraet fungerte altså på egen hånd, uten støtte fra annen maskin- og programvare og video og bilder kunne hentes direkte fra webgrensesnittet til webserveren i kameraet. I dette forsøket benyttet vi programvaren AXIS Camera Station som ble solgt sammen med kameraet til å hente videoer fra kameraet. Erfaringene fra dette eksperimentet var at denne programvaren var tungvint å bruke og ikke godt egnet til det aktuelle formålet. Programvaren var tydelig rettet mot overvåking i butikklokaler og lignende. Kameraets bildekvalitet var tilstrekkelig ved en hastighet på 1 m/s. Ved raskere hastigheter ble imidlertid eksponeringstiden for lang og fisken svært uklart i bildet.

Teori bak bildeanalyse (hypotese):

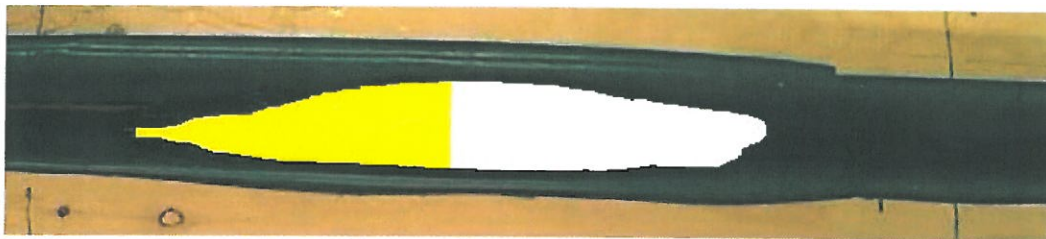
Laksefisk er bredere i fremre enn bakre del (generell observasjon). Sett rett ovenfra eller rett nedenfra vil altså fremre halvdel være større enn bakre halvdel.

Hovedsteg i bildeanalysen

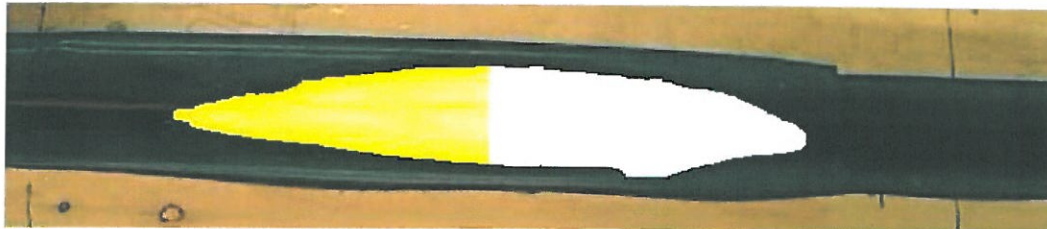
```
For hver bilderamme i filmen {  
  Test om det finnes et stort objekt i filmen som ikke er renne og hvor hele  
  objektet er i bildet. Hvis ja {  
    Sjekk om venstre halvdel > høyre halvdel. Hvis ja {  
      Fisken er orientert mot venstre  
    } ellers {  
      Fisken er orientert mot høyre  
    }  
  }  
}
```

Resultat fra bildeanalysen

A)



B)



Figur 3: A) Resultat for regnbueørret i renne, buk ned (fra figur 2A) B) Resultat for regnbueørret i renne, buk opp (fra figur 2B).

I det første bildet (figur 3A) er arealet til venstre halvdel (gult område) 6442 piksler mens arealet til høyre halvdel er 8275 piksler. I bilde nummer 2 (figur 3B) er arealet til venstre halvdel 7671 piksler og arealet til høyre halvdel 9394 piksler. Den automatiske bildeanalysen kommer altså ut med riktig svar i begge tilfeller: fisken er orientert mot høyre.

Konklusjon

Bildeanalysen anga riktig orientering i begge tilfeller under en transporthastighet av fisken på 1 m/sekund gjennom den v-formede rennen. Et større og mer omfattende forsøk er imidlertid nødvendig for å bekrefte at metoden er pålitelig under mer realistiske produksjonsbetingelser og under ulike transporthastigheter. Det kan bli aktuelt å teste ulike bakgrunnsfarger på transportbåndet. En viktig erfaring med hensyn på fremtidige forsøk er at det må plasseres en lampe direkte over rennen slik at en unngår svart skygge i bunnen av v-en. Det bør også diskuteres om det skal lages egen programvare til kameraet/undersøke om det finnes alternativ programvare/benytte annen kamerateknologi. Herværende teknologi har som potensial å knyttes opp mot en mekanisk innretning som eventuelt rettvender fisk som er orientert med halen først.

Anaerob forbrenning gjennom el-stimulering og effekten av proteaser hos laksmuskel

Av Bjørn Roth

For fisk er det en rekke uklarheter på hvordan fiskekjøttet brytes ned og hvilken faktorer som påvirker dette. Det er lenge visst at stress derav anaerob forbrenning kan ha en effekt, men det hersker usikkerhet i hvor stor grad dette egentlig har. Fisk har bindevev (collagen) i enden av hvert muskesegment (Myotom) som kalles myocommata. Ved siden av dette er de enkelte muskelfibre bundet sammen med et nettverk av bindevevstråder. Selve muskelen er bygget opp av 2 proteiner actin og myosin som fysisk tiltrekkes ved tilstedeværelsen av kalsium som samlet sett gir en muskelsammentrekning. Selv om muskelcellen er universell i hele dyreriket, er det store strukturelle forskjeller mellom fisk og f.eks pattedyr. Hos pattedyr er muskulaturen bygget slik at muskelfibre er tett bygget sammen i store segmenter hvor selve muskelen er festet i enden mot skjellettet. Her ligger bindevev i hovedsak på utsiden og holder strukturen samlet og festet. Dette betyr at mørning av kjøtt er i all hovedsak avhengig av nedbrytning av selve muskelproteiner, mens fiskekjøtt i tillegg er også følsom for nedbrytning av bindevev.

Denaturering og nedbrytning av strukturelle proteiner under lagring forgår ved at enzymer i cellen lysosomer frigjøres og aktiveres. Under mørning er det i hovedsak 3 grupper av enzymer som har betydning. Dette er calpain, cathepsin og collagenase. Cathepsin og calpainer er ansvarlig for nedbrytning av muskelprotein, mens collagenase for bindevev. Generelt er calpain og cathepsiner pH sensitive, hvor den ulike enzym har et pH optimum for aktivitet, men enkelte enzymer som collagenase og en variant av calpain aktiveres med f.eks Ca^{2+} . Dette gjør at mørning av kjøtt kan stimuleres gjennom anaerob forbrenning via stress eller el-stimulering hvor et raskt pH fall vil aktivere ulike enzymer, hvor calpainer og cathepsiner har en sentral rolle. Dette er den generelle oppfatningen også for fisk.

Problemet er imidlertid at fisk har 1) Et veldig stor buffer kapasitet i muskelen og derfor et lavt pH fall til sammenligning med kjøtt, 2) Fisk har store mengder calpastatin som hemmer calpainer, 3) Collagenase er sentral i mørningsprosessen og dette er ikke pH sensitivt.

Målet var derfor å studere de ulike enzymer som cathepsiner, collagenase og calpainer og deres betydning på mørning hos fisk. Dette gjennom el-stimulering.

Material og metode

I April 2009, på Grieg Stjernelaks, Helgøy, ble totalt 50 Atlantisk laks tatt fra ventemerden og avlivet umiddelbart med et slag mot hodet. Fisken ble innen minutter sløyet og kontroll filleten ble skåret av, mens andre filleten ble elektrisk stimulert for 6,

12, 24, 48 og 180 s (n=10) med strøm. Muskel prøver ble tatt og fryst på tørris for fremtidige analyser av protease før pH og vekt ble notert og hver fillet ble pakket inn i aluminiums folie og lagt på kasser med is. Etter 8 og 16 dagers lagring ble filletene tatt ut for måling av pH, vekttap, vannbindingsevne, farge og protease aktivitet. I dette vil kun protease presenteres.

Fra hver fisk stimulert med 180s med strøm ble 2 stk, 3 grams muskelbit tatt fra fremre loin etter 0,8 og 16 dagers lagring og lagret på -80 grader Celsius. Etter 6 mnd på frys ble hver prøve homogenisert i fryst tilstand ved bruk av fast prep, før enzymaktiviteten ble målt ved fluorisens. I tillegg ble kaloriene målt gjennom en DSC (differensial scanning calorimetri) for å finne ut hvilken muskelproteiner som har blitt denaturert.

Resultat og Diskusjon

Som vist i tabell 1, ga 180 s med el-stimulering en gjennomsnittelig pH fall på 0.53 enheter ($p < 0.0005$, t-test). Dette er noe høyere en tidligere studier viser at tilsvarende stimuleringer gir et pH fall på 0.36 enheter (fra 7.11 til 6.75), , men med tanke at pH har en log skala mot H^+ vil forskjellen være med delta $pH = e^{(\log pH_{\text{control}} - \log pH_{\text{el-stim}})}$ være mellom de ulike studier være på 0.011 i en reell pH skala.

Tabell 1: Muskel pH mellom control og el-stimulerte filleter eksponert for 180 s med strøm.

	Muscle pH				n
	mean	SE	-95 %	95 %	
Control	7.34	0.04	7.25	7.43	8
El-stim	6.81	0.02	6.75	6.86	8

Collagenase

I figur 1 kan en tydelig observere at Collagenase er et aktivt enzym med en jevn nedgang i aktivitet ettersom enzymene forbrukes over tid. Imidlertid er det til tross for synkende aktivitet er det forholdsvis stor aktivitet allerede etter 16 dages lagring. Dette vil i all enkelhet forklare hvorfor gaping oppstår allerede innen dager med lagring, hvor problemet vil forsterkes gjennom lagringsperioden med fallende grad. Imidlertid er det ingen signifikant forskjell mellom C og E fileter etter henholdsvis 0, 8 og 16 dagers lagring ($P > 0.33$, paired t-test)

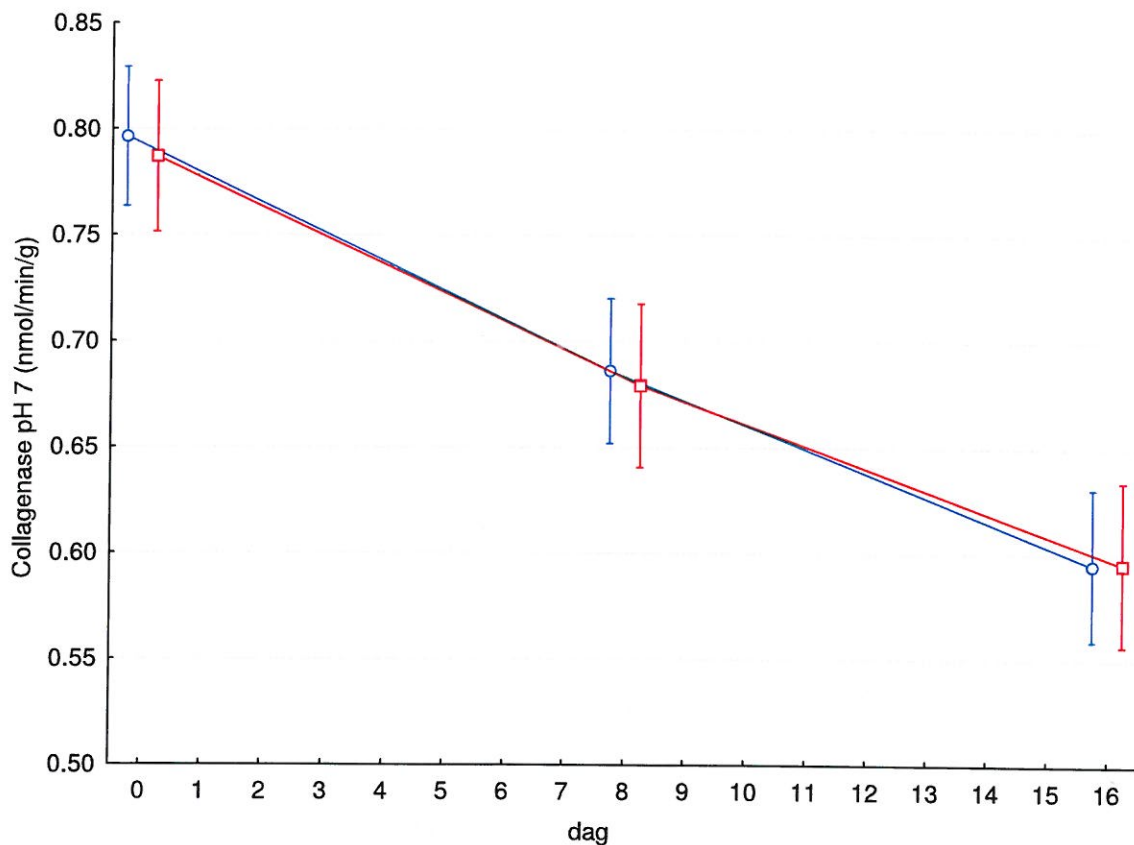
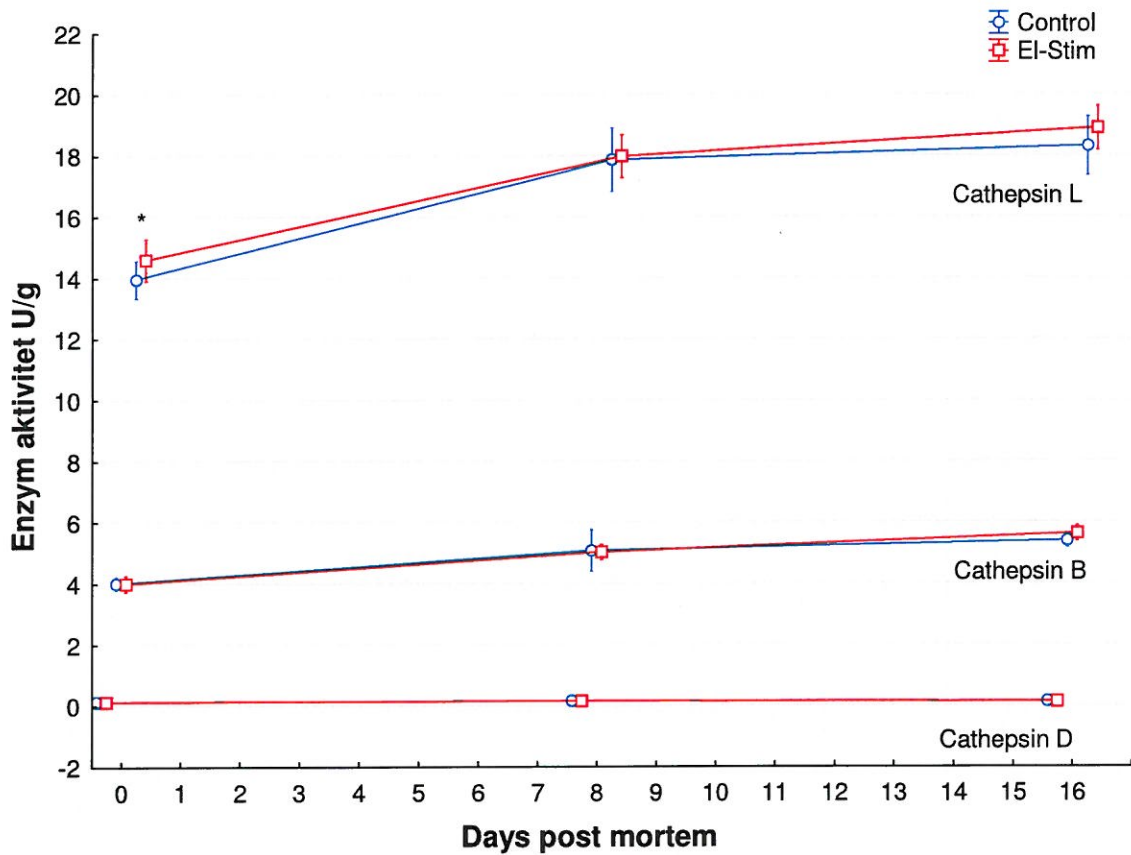


Fig 1. Colleganase aktivitet i laksemuskel.

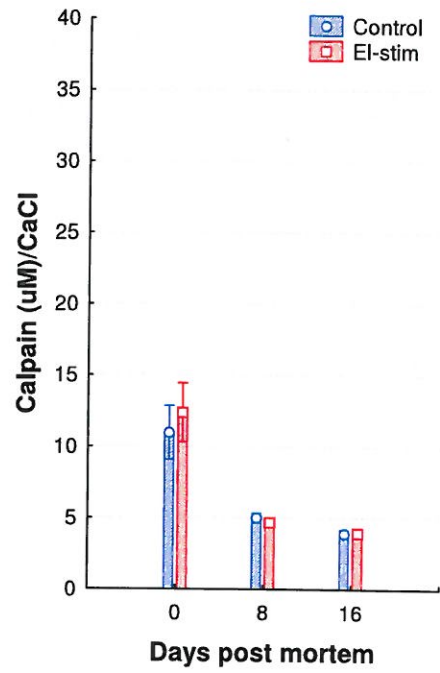
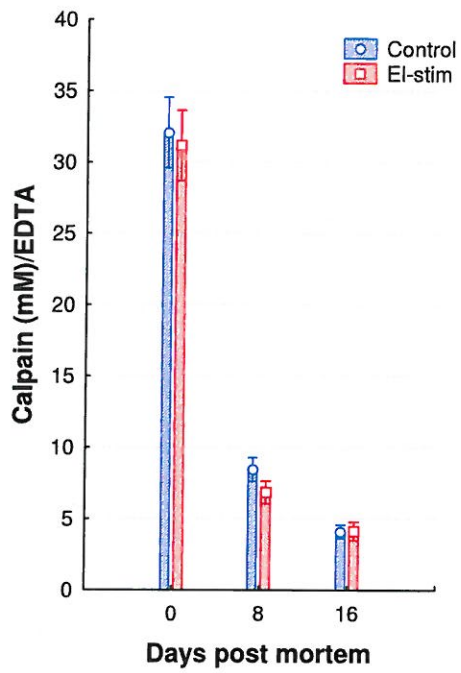
Cathepsiner:

I samsvar med tidligere studier på fisk er Cathepsin B og L de mest sentrale enzymer i nedbrytning av muskelproteiner. Ikke overraskende øker enzymaktiviteten gjennom hele lagringsperioden etter hvert som cathepsiner frigjøres og kan fornyes gjennom lagringsforløpet (Fig 2). Forsøker viser at el-stimulering hadde en signifikant høyere enzym aktivitet minutter etter døden ($P < 0.05$, paired t-test). Dette kan i utgangspunktet være betraktet som neglisjerbar effekt, men resultatene kan etter 8 dager være misvisende ettersom en måler summen av enzymer og dets effekt. Dette betyr at cat L aktivitet kan i utgangspunktet være høyere hele perioden frem til 8 dagers post mortem. Måler en alle enzymene fra henholdsvis C og E fileter gjennom lagringsperioden viser resultatene at aktiviteten for Cat B, L og B+L er signifikant forskjellig gjennom hele lagringsperioden ($P < 0.05$ for cat B og $P < 0.005$ for Cat L+B)



Calpainer

Som vist i Figur 3 er de pH sensitive calpainer som er sentrale med nesten 2000 ganger høyere aktivitet enn kalsium sensitive calpainer. Begge enzymer forbrukes fort det neste 8 dager noe som tyder en høy aktivitet allerede fra dag 0. Det var ingen signifikante forskjeller mellom el-stim og kontroll prøvene, men tatt i betraktning at det er kun 4 prøver i par som er OK tenderer resultatene at el-stim aktiverer de kalsium sensitive calpainer ved dag 0 og de pH sensitive har langt raskere forbruk de første 8 dager.



APPENDIX A: EFSA Rapporten

APPENDIX B: Publikasjoner

APPENDIX C: Hovedfag