

Pumping av torsk og laks, faktorer som påvirker velferd og kvalitet

Åsa Maria Espmark, Odd-Børre Humborstad og Kjell Ø. Midling





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 470 ansatte. Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø.

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: nofima@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

<i>ISBN: 978-82-7251-957-4(trykt)</i> <i>ISBN: 978-82-7251-958-1(pdf)</i>	<i>Rapportnr:</i> 6/2012	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Tittel:</i> Pumping av torsk og laks, faktorer som påvirker velferd og kvalitet	<i>Dato:</i> 23. mai 2012	
<i>Forfatter(e):</i> Åsa Maria Espmark, Odd-Børre Humborstad og Kjell Ø. Midling	<i>Antall sider og bilag:</i> 56 + 1 vedlegg	
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond	<i>Prosjektnr.:</i> 20877	
<i>Tre stikkord:</i> Pumping, velferd, kvalitet	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF #900304	
<i>Sammendrag:</i> <p>Prosjektet "Pumping av torsk og laks - faktorer som påvirker velferd og kvalitet" er delt inn i tre arbeidspakker. Arbeidspakke 1: "Pumping av levende fisk" konkluderer blant annet med at trenging er mer stressende enn pumping ut fra fysiologiske velferdsvariable dersom pumping blir utført på en korrekt måte. Imidlertid vil pumping i de samme tilfellene resultere i forkortet prerigortid og lavere muskel pH. Arbeidspakken viser også at bruk av oksygenering i ventemerdd ikke nødvendigvis gir fisken bedre forhold i ventemerdd. Et viktig funn er også at vakuumbehandlet fisk resulterer i flere kollisjoner med andre fisk og vegger/ventiler som igjen kan føre til skader og blødninger hos fisken. Det ble utført en rekke forsøk med manipulering av pumpefaktorene pumpehøyde og gjentatt pumping. Ettersom disse forsøkene ble gjennomført under kontrollerte forhold, ble det mulig å dokumentere en tydelig effekt av pumping på en rekke fysiologiske variable, mens det også ble dokumentert en effekt av akkumulert stress på laktat. Arbeidspakke 1 har også produsert en protokoll for å foreslå grenseverdier for god/dårlig velferd. Denne presenteres her som vedlegg. I Arbeidspakke 2: "Mammut – skånsom metode for flytting av levende fisk ble en forholdsvis liten mammut-pumpe bygd. Pumpen løftet vann 4 meter over havnivå og fungerte også godt på pumping av fisk. Pumpen skal optimaliseres videre og testes ut i fullskala. Arbeidspakke 3: "Hvitfisk – effekt av pumping", er tidligere sluttrapportert (Akse m.fl., 2011), og vil ikke bli videre omtalt i denne rapporten.</p>		

Forord

Prosjektet "Pumping av torsk og laks – faktorer som påvirker velferd og kvalitet" er gjennomført i perioden 1. januar 2009 til 15. mars 2012. I løpet av prosjektperioden er det mange medarbeidere som har bidratt med avgjørende arbeid for gjennomføringen av prosjektet. Hovedaktørene har vært:

Tor Evensen – Tekniker, Nofima Tromsø, har deltatt på flere prøveuttak.

Ronny Jakobsen – Tekniker, Nofima Tromsø, har deltatt på flere prøveuttak.

Torbjørn Tobiasen – Forsker, Nofima Tromsø, har deltatt på flere prøveuttak.

Chris Noble – Forsker, Nofima Tromsø, har deltatt på flere prøveuttak.

Sissel Nergaard – Tekniker, Nofima Averøy, har deltatt på vår aktivitet på Averøy.

Michel Guajardo – Stasjonsbestyrer, Nofima Averøy, koordinerte våre forsøk der.

Oddvar Karlsen – Tekniker, Nofima Averøy, tok seg av pumpen.

Målfrid Bjerke/Inger Kristiansen – Ingeniører, Nofima Ås, analyserte plasmaprøver.

Maike Oehme – Forsker, Nofima Sunndalsøra, har deltatt på Salmarforsøk.

Frode Nerland – Tekniker, Nofima Sunndalsøra, har deltatt på Salmarforsøk.

Svetolik Antic – Tekniker, Nofima Sunndalsøra, har deltatt på Salmarforsøk.

Asbjørn Valset – Tekniker, Nofima Sunndalsøra, har deltatt på prøveuttak.

Jørund Leirvoll – Tekniker, Nofima Sunndalsøra, har deltatt på prøveuttak.

Jonatan Nilson – Forsker, HI, deltok på vakuumsforsøk på Averøy.

Bjørn Totland – Ingeniør, HI, deltok på vakuumsforsøk på Averøy.

Anders Mangor-Jensen – Forsker, HI, deltok på vakuumsforsøk på HI sin forsøksstasjon Matre.

Jens-Eric Eliassen – Koordinator, Storvik Aqua, deltok i planlegging av oksygeneringsforsøk.

Jan-Erik Myren – Salgskonsulent, Storvik Aqua, deltok i planlegging og gjennomføring av delmål 2 i arbeidspakke 1.

Kristian Kindsbekken - Systemtekniker, Storvik Aqua, deltok i gjennomføring av prøveuttak hos SalMar.

Svein Arve Tronsgård – Salgsansvarlig, Storvik Aqua, deltok i gjennomføring av prøveuttak hos SalMar.

Vi takker Lerøy Aurora og SalMar for all velvilje og som lot oss komme til anleggene deres og gjennomføre forsøk. I tillegg takker vi Kaeser Norge som lånte ut utstyr til mammut-pumpe- forsøkene.

Innhold

1	Bakgrunn for prosjekt "Pumping av torsk og laks – faktorer som påvirker velferd og kvalitet"	1
1.1	Problemstillinger.....	2
1.2	Hovedmål for prosjektet	2
2	Arbeidspakke 1: Pumping av levende fisk	3
2.1	Delmål, arbeidspakke 1.....	4
2.2	Evaluering av velferd og produktkvalitet i forbindelse med (1) trenging, (2) pumping og (3) trenging og pumping.....	4
2.2.1	Forsøk ved Nofima (Sunnalsøra) februar 2010: Kontrollert manipulering av håndtering og tetthet av laks.....	4
2.2.2	Prøveuttak Lerøy Aurora, 21-23. september 2010: Måling av stress og <i>rigor mortis</i> av laks tatt direkte fra ventemerde og etter pumping	10
2.2.3	Forsøk ved Nofima (Averøy), november 2010 og mars 2011: Manipulering av pumpehøyde og gjentatt pumping.....	22
2.3	Etablere samarbeid med Storvik AS og evaluere effekt av oksygenering i forbindelse med trenging.....	30
2.3.1	Evaluere biologiske effekter og effekter på vannkvalitet av oksygenering i forbindelse med trenging ved hjelp av NetOx (SalMar, oktober 2010).....	30
2.4	Utvikle system for hurtig vurdering av skader på gjeller, finner og skinn	37
2.4.1	Farge fisk ved hjelp av "fast green"	37
2.5	Finne hvordan fisk påvirkes av undertrykk.....	38
2.5.1	Bedøvd laks eksponert for vakuum (Matre, februar 2010)	38
2.5.2	Ubedøvd laks eksponert for vakuum (Averøy, november 2011)	41
2.5.3	Work-shop Gardermoen 15. mars 2012	45
2.6	Utforme protokoll og foreslå grenseverdier for god/dårlig velferd	45
2.7	Etablere samarbeid med Thelma as med mål å utvikle nye fiskemerker som kan kvantifisere hvor mye aktivitet (akselerasjoner) fisk utsettes for under pumping ...	46
2.7.1	Hensikt.....	46
2.7.2	Aktiviteter	46
2.7.3	Konklusjon	47
3	Arbeidspakke 2: Mammut – skånsom metode for flytting av levende fisk	48
3.1	Bakgrunn Start her	48
3.2	Delmålene for arbeidspakke 2	48
3.3	Videre fremdrift.....	51
4	Oppsummering	52
4.1	Arbeidspakke 1	52
4.2	Arbeidspakke 2	54
5	Referanser	55

Vedlegg: Protokoll for å evaluere fiskevelferd og kvalitet under slakteprosessen

1 Bakgrunn for prosjekt "Pumping av torsk og laks – faktorer som påvirker velferd og kvalitet"

Vakuumpumper av mange varianter brukes i dag i nesten alle deler av norsk fiskeri- og havbruksnæring. Alt etter type kan de suge eller trykke råstoffet (eller begge deler), levende eller sløyd flere meter fra en brønnbåt, en ventemerd, et fiskefartøy eller internt i et fartøy. Pumpene er blitt svært effektive og har gjennomgått stor utvikling de siste årene. Dessverre har ikke pumpene blitt dokumentert i forhold til hvor skånsomme de er eller hvordan de påvirker den levende fiskens velferd. Det er rimelig å anta at et pumpesystem som er skånsomt mot levende fisk også er det på kjølt råstoff. Næringen (produsenter, fartøyeiere og landindustri) gir uttrykk for stor interesse og stiller med utstyr og kompetanse dette prosjektet.

Av norsk fiskeri- og havbruksnærings eksport på ca. 36,3 mrd. NOK i 2010 har fisk med anslagsvis verdier på mer enn 30 mrd. NOK gått gjennom en eller annen type pumpe før den ble eksportert. Laks blir som regel pumpet tre ganger like før den slaktes.

Normalt er blandingen av fisk/vann omlag 20/80 %. En tank på fem m³ inneholder da ca ett tonn fisk eller om lag 250 individer. Hver lasting og lossing (pumpesekvens hvor fisken "vaskes" i tanken) tar om lag 30 sekunder. Sentrale variabler når pumper evalueres er endringer i trykk, rørdimensjon og bend.

Kvalitetsproblemer, både innen hvitfisksektoren og havbruksnæringen knyttes ofte til bruk av vakuumpumper, men bare unntaksvis har pumpene blitt testet, og da indirekte i forbindelse med andre prosjekter (for eksempel slaktemetodikk og pre-rigortid hos laks). Resultatene viser at pumpene påfører levende fisk stress og utmattelse i varierende grad og at de påvirker kvaliteten negativt. Innen hvitfisksektoren er det særlig de største snurrevadfartøyene som forbindes med dårlig kvalitet. Både Norges Råfisklag, Norges Fiskarlag og Fiskeri og Havbruksnærings Landsorganisasjon etterlyser objektive tester (dokumentasjon) av disse pumpene. Bruk av vakuumpumper kan påføre laks skader på gjeller, skinn og finner enten på grunn av trykkendringene eller på grunn av kontakt med tenner fra annen laks eller med skarpe kanter og bend inne i pumpen. I levendekjølingstanker på slakterier er det derfor vanlig å se mye blod. I tillegg til velferdsmessige utfordringer, innebærer dette selvsagt også veterinære - og smittemessige utfordringer.

Med økt fokus på velferd i oppdrettsnæringen (jfr. Slakteriforskriften, akvakulturdriftforskriften § 24) og regulering av prosesser som levendekjøling og bedøving, samt håndtering (herunder transport og pumping) vil velferdsdokumentasjon være særlig viktig. Siden det meste av dette foregår "skjult" for observatører (inne i rør og tanker), er det lite sannsynlig at markedet (kunder) vil forlange teknologien endret slik de gjorde ved bruk av CO₂. Næringen kan derfor arbeide med dette området, primært med fokus på å øke fiskens kvalitet, men også for å bedre fiskens velferd.

1.1 Problemstillinger

Følgende problemstillinger ble stilt i prosjektet:

1. Hvordan påvirker bruk av vakuumpumper velferden hos torsk og laks?
2. Hvilke faktorer i forbindelse med pumping er viktigst for fiskens kvalitet?
3. Kan enkle teknologiske og logistiske endringer bedre fiskens velferd og kvalitet?

1.2 Hovedmål for prosjektet

Prosjektet hadde følgende hovedmål:

1. Etablere god dialog med alle norske pumpeprodusenter.
2. Finne sammenheng mellom pumpeparametere (for eksempel løftehøyde, pumpelengde og hastighet) og fysiologisk respons (stress).
3. Finne sammenhenger mellom rigorstatus på sløyd råstoff (tilhører arbeidspakke 3 (Akse m.fl. 2011)), pumping og kvalitet.
4. Finne tema som egner seg for mer grunnleggende studier og søknader til Norges forskningsråd.

2 Arbeidspakke 1: Pumping av levende fisk

Problemene knyttet til pumping av slaktefisk kan i hovedsak deles i tre; 1) Trenging i forkant for å effektivisere pumping; 2) Selve pumpeenheten med fare for skader og sår; 3) Pumperøret med stressutfordringer forårsaket av hastighet, pumpe lengde, tap av kontroll for fisken og pumpe stans. Pumpingen kan føre til sår- og finneskader, bloduttredelser og i noen tilfeller blødende gjeller og sår. Stressnivået og skadene som pumpingen forårsaker kan videre medføre redusert velferd og redusert produktkvalitet (eks spalting, rødfarget filet, forkortet pre-rigortid). Fysiske skader på fisken kan ha med utformingen av utstyret å gjøre (bend, sveiser, ventiler og trykktank), men også fysikk som trykkreduksjon over tid har vært knyttet direkte til blødende gjeller. Den delen av pumpingen som forårsaker stress men ikke synlige skader kan dokumenteres ved å foreta målinger på atferdsmessige og fysiologiske stressindikatorer (Espmark 2004). Akvakulturforskriften inneholder i dag mange subjektive formuleringer som "artstypisk behov", "unødig stress", "pumping med forsvarlig tempo" og "atferdsendringer utover det normale". Selv om slike formuleringer også brukes i Dyrevernsloven er formuleringene subjektive i mangel på konkrete grenseverdier for god velferd. Denne delen av prosjektet har som mål å definere slike grenseverdier og å etablere en protokoll med retningslinjer som røktere og andre som arbeider med levende fisk kan bruke for å evaluere velferden. En utfordring er at fisk som ankommer slakterier viser stor variasjon i evne til å tåle trenging og pumping, gjerne omtalt som sterk eller svak fisk.

For å redusere variasjonen hos forsøksfisken må deler av forsøkene gjøres på kjent materiale på en eller flere av Nofimas forsøksstasjoner.

I tillegg til selve pumpesekvensen blir fisken også påvirket gjennom trenging i ventemerdene i forkant av pumping. De viktigste årsakene til redusert velferd under trenging er økt tetthet og dårlig vannkvalitet. Ettersom trengingen i seg selv er svært stressende vil utfordringene som pumping medfører bidra til at fiskens velferd forringes ytterligere og produktkvaliteten blir dårlig. I løpet av de 3-5 timene slaktingen fra en ventemerd foregår blir fisken trengt ved at nota avsnøres (tau eller kuleline) og bunnen heves. Tettheten under trenging økes og kan overstige 300 kg/m^3 før pumpingen starter. Fisken utmattes når den holdes ved slike høye tettheter over tid og de siste fiskene som pumpes vil være mer utmattet (stresset) enn tidlig i pumpingen. I prosjektet ble det tatt blodprøver for måling av fysiologiske stressparametre av slaktefisken gjennom hele trengingsprosessen; i starten, i midten og ved slutten av trenging. *Rigor mortis* ble også målt. I tillegg ble fysiologiske stressparametre målt før og etter pumping.

Det har skjedd svært lite innen utvikling av ventemerder i Norge. Fortsatt ser de ut, og fungerer, som de gjorde på 1980-tallet. Eventuell oksygenering nær innpumpingsstedet er ofte styrt av høye sommertemperatur, og ikke av oksygenmålinger. I noen tilfeller er ventemerden videoovervåket og ofte brukes tau for å splitte og trenge deler av merden i stedet for hele merden. Fortsatt brukes polert stål eller aluminium i innsuget på vakuumpumpene og det er gjort få forsøk på å teste effekter av lys eller solskjerming for å redusere fiskens reaksjon mot å bli sugd inn i en slange.

På Tasmania brukes store rektangulære ventemerder (10 x 50 meter). De tørkes fra den ene kortsiden og innsuget på mammutpumpene er laget i svart PEHD og integrert i (det svarte) notlinet 1,5 meter under havflaten. Laks blir her (air-lift) pumpet ved langt lavere tetthet enn i Norge (om lag 100 kg/m³) og det er ingen tegn til panikkartet atferd. Trengingen blir styrt av røkterne slik at det ikke skulle være spord- eller ryggfinner i overflaten ved pumpetetthet. En lignende atferdsrespons ble sett hos laks pumpet direkte fra oppdrettsmerd i "dead-haul"-prosjektet (Midling m.fl. 2008). Det er også blitt vanlig å bruke oksygenering i ventemerden. Storvik AS leverer utstyr (Netox) som oksygenerer hele ventemerden under trenging og pumping.

2.1 Delmål, arbeidspakke 1

Delmål for arbeidspakke 1 har vært:

- a) Evaluere velferd og produktkvalitet i forbindelse med (1) trenging, (2) pumping og (3) trenging og pumping.
- b) Etablere samarbeid med Storvik AS og evaluere effekt av oksygenering i forbindelse med trenging.
- c) Utvikle system for hurtig vurdering av skader på gjeller, finner og skinn
- d) Finne hvordan fisk påvirkes av undertrykk.
- e) Utforme protokoll og foreslå grenseverdier for god/dårlig velferd.
- f) Etablere samarbeid med Thelma AS med mål om å utvikle nye fiskemerker som kan kvantifisere hvor mye aktivitet (akselerasjoner) fisk utsettes for under pumping.

2.2 Evaluering av velferd og produktkvalitet i forbindelse med (1) trenging, (2) pumping og (3) trenging og pumping

For dette delmålet ble følgende aktiviteter gjennomført:

1. Forsøk ved Nofima (Sunndalsøra), februar 2010: Kontrollert manipulering av håndtering og tetthet av laks.
2. Prøveuttak ved Lerøy Aurora, 21-23. september 2010. Måling av stress og *rigor mortis* av laks tatt direkte fra ventemerd og etter pumping.
3. Forsøk ved Nofima (Averøy), november 2010 og mars 2011: Manipulering av pumpehøyde og gjentatt pumping.

2.2.1 Forsøk ved Nofima (Sunndalsøra) februar 2010: Kontrollert manipulering av håndtering og tetthet av laks

Hensikten med dette første forsøket var å gjennomføre et dose-respons forsøk og å framprovosere stress for så å måle vanlige stressmarkører (kortisol, pH muskel, glukose og laktat), samt måle *rigor mortis* forløpet. Resultatene fra dette forsøket ble sammen med litteraturdata brukt som referansedata i senere kommersielle forsøk i arbeidspakke 1. Forsøket ble gjennomført i uke 5, 2-3. februar 2010 ved Nofima sine lokaler på Sunndalsøra.

2.2.1.1 Metode

Behandling

To uker før forsøksstart ble mellom 25-30 Atlantisk laks smolt (1040 ± 241 gram) plassert i ett av 11 stk. 1 m^2 kar med saltvann og røktet under standard betingelser. I utgangspunktet var alle kar fylt med 750 liter vann. Etter to uker ble karene delt inn i følgende kategorier:

Gruppe 1: Kar 1-3 (25 kg/m^3 : kontroll)

Vannvolum: $0,75 \text{ m}^3$ (= 750 liter); Fisk: 20 kg; Tetthet: $26,67 \text{ kg/m}^3$

Prøvetaking av fisk skjedde uten nedsenking av vann

Gruppe 2: Kar 4-6 (200 kg/m^3)

Prøvetaking av fisk skjedde 5 minutter etter nedtapping av 650 liter vann. Da var det igjen 100 liter som med 20 kg fisk ga en tetthet på 200 kg/m^3

Gruppe 3: Kar 7-9 (400 kg/m^3)

Prøvetaking av fisk skjedde 5 minutter etter nedtapping av 700 liter vann. Da var det igjen 50 liter som med 20 kg fisk ga en tetthet på 400 kg/m^3

Gruppe 4: Kar 10 (Sedering, 25 kg/m^3)

Vannvolum: $0,75 \text{ m}^3$ (= 750 liter); Fisk: 20 kg; Tetthet: $26,67 \text{ kg/m}^3$

Fiskene ble eksponert ovenfor Eugenol (20 ppm). Prøvetaking av fisk skjedde umiddelbart etter at sedering inntraff (reduisert reaksjon på ytre stimuli, begynnende tap av likevekt), uten nedsenking av vann. Vanngjennomstrømmingen i karet ble slått av i det Eugenol ble tilsatt.

Gruppe 5: Kar 11 (håndtering, 25 kg/m^3)

Vannvolum: $0,75 \text{ m}^3$ (= 750 liter); Fisk: 20 kg; Tetthet: $26,67 \text{ kg/m}^3$

Håndtering ble simulert ved at en person rørte kraftig i karet i 5 minutter. Prøvetaking umiddelbart etter 5 minutter håndtering, uten nedsenking av vann

Senking av vannivå skjedde med samme hastighet i alle kar og jevnt under hele senkingen (Figur 1).

Prøvetaking

Fra hvert kar ble det tatt ut 15 fisk (Figur 2a). For å minimere stress fra håving, ble fiskene håvet så skånsomt som mulig og så mange fisk som mulig ble håvet per gang for å forhindre at håven ble stukket ned i karet for mange ganger. Rett etter håving ble fiskene avlivet med slag mot hodet. Deretter ble det tatt blodprøve (Figur 2b), målt pH i muskel og målt vekt og lengde (Figur 3). Etter dette ble fisken sløyd og lagt på is for måling av *rigor mortis* (Figur 4).

Blodprøvene ble sentrifugert og plasma ble fordelt på to eppendorfrør; ett som gikk til analyse av laktat/glukose og ett som gikk til analyse av kortisol.

Rigor mortis ble målt ved hjelp av "tail-drop" 4-5 ganger i løpet av 36 timer etter avliving. Ved hver måling ble fisken lagt på et bord med halvparten av bakkroppen utenfor bordplaten og mot en gradert vinkelmåler. For hver måling ble stivheten avlest; 180° er full rigor (Figur 4).



a)



b)

Figur 1 *Kontrollert manipulering av håndtering og tetthet av laks. a) Nedsenking av vann for å oppnå økt tetthet, b) stresset fisk etter nedsenking av vann.*



a)



b)

Figur 2 *a) Uttak av 15 fisk fra hvert kar for blodprøve og måling av pH i muskel, vekt og lengde og rigor mortis, b) blodprøvetaking.*



a)



b)

Figur 3 a) Måling av vekt og lengde, b) måling av pH i muskel.



a)



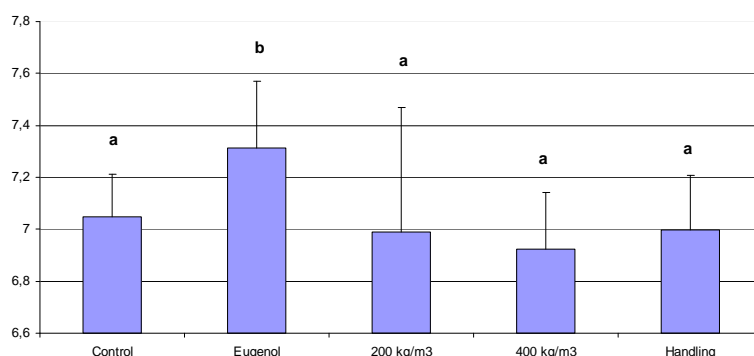
b)

Figur 4 a) Sløyd fisk lagt på is før måling av rigor mortis, b) måling av rigor mortis med "tail-prop" metoden.

2.2.1.2 Resultater og diskusjon

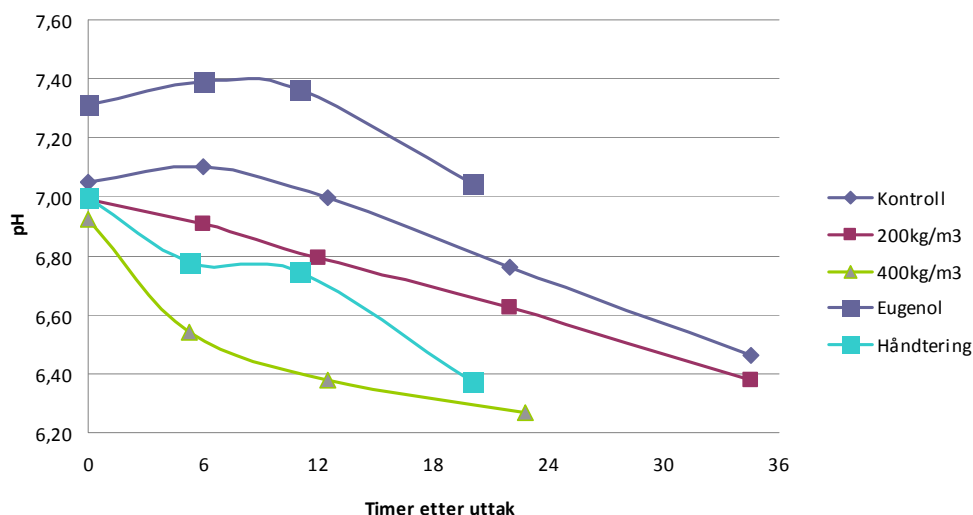
Nedsenking av vannivået simulerte økt tetthet på en vellykket måte. Ved senking av nivået med 700 liter (400 kg/m^3) oppsto en situasjon som liknet mye på fisk under deler av intens trenging, der mye av fisken står over vann, luftsnapping observeres og fisken viser panikkartet atferd.

pH muskel



Figur 5 pH muskel ved start, rett etter avliving ($F = 4,86$; $p = 0,001$).

Fisk som var sedert med eugenol hadde høyere pH rett etter avliving sammenliknet med de andre gruppene, inkludert kontrollene (Figur 5). pH-forløpet over tid (Figur 6) viser et dose-respons forløp, der den eugenolbehandlede fisken hadde høyest pH i muskel etterfulgt av kontroll, 200 kg/m³, håndtering og 400 kg/m³. En komparativ analyse viser at ved andre gangs pH måling (ca. time 6) er alle gruppene forskjellig fra hverandre med unntak av 200 kg/m² som er lik håndteringsgruppa ($F = 43,3$; $p < 0,0001$). Ved tredje pH-måling (ca. time 12) er alle gruppene forskjellig fra hverandre med unntak av 200 kg/m² som er lik håndtering ($F = 49,2$; $p < 0,0001$). Ved fjerde pH-måling (ca. time 20) er alle gruppene forskjellig fra hverandre med unntak av 400 kg/m² som er lik håndtering ($F = 46,8$; $p < 0,0001$).



Figur 6 Endring i pH i muskel fra avliving til 36 timer etter avliving.

Fysiologisk stress

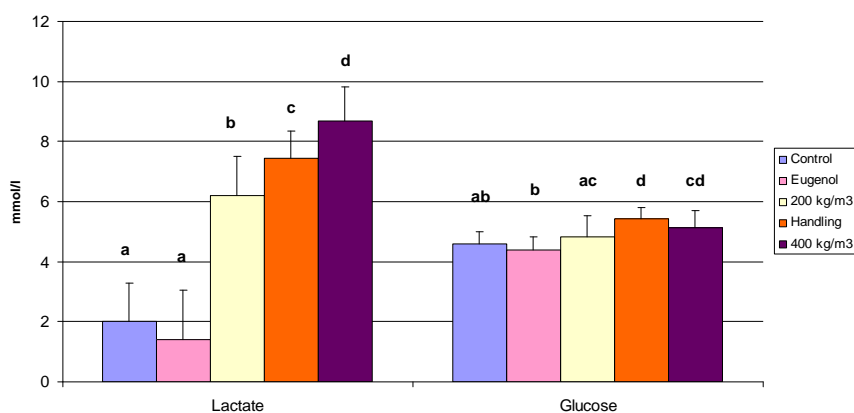
For å måle stress, forårsaket hovedsakelig av aerob og anaerob muskelaktivitet, brukes glukose (aerob), laktat (anaerob), og pH-verdier i muskel og blod. Ofte ser man at fisk som har blitt utmattet, ved for eksempel trenging, har høye laktatnivåer, mens mer langvarig stress og økt muskelaktivitet fører til høyere glukoseverdier. Laktat, glukose og pH er alle eksempler på sekundære stressresponser. Kortisol, derimot, er den primære stressrespons.

Kortisol:

Resultatene fra kortisolanalysene viser få klare retninger, og viser også at kortisol i dette tilfelle, som i mange andre tilfeller er et vanskelig mål for dokumentasjon av stress fordi prøvetakingene er utfordrende. Høye verdier hos kontrollfisken tyder på at også denne er stresset på grunn av den håndtering de får under prøvetaking. Kortisol er en primær stressrespons og vil utløses umiddelbart etter påvirkning. Fisken som var bedøvd med eugenol var den eneste gruppa som hadde signifikant lavere kortisolverdier enn noen av de andre gruppene ($F = 11,9$; $p < 0,0001$). Det er tidligere vist at eugenol har en positiv effekt på stress under kommersielle prosesser som fisken gjennomgår (Iversen et al., 2009). Det er også åpnet for bruk av Aquis i kommersiell produksjon av laks.

Laktat og glukose:

Verdiene av laktat og glukose (Fig. 7) viser et bedre bilde av stressituasjonen i karene.



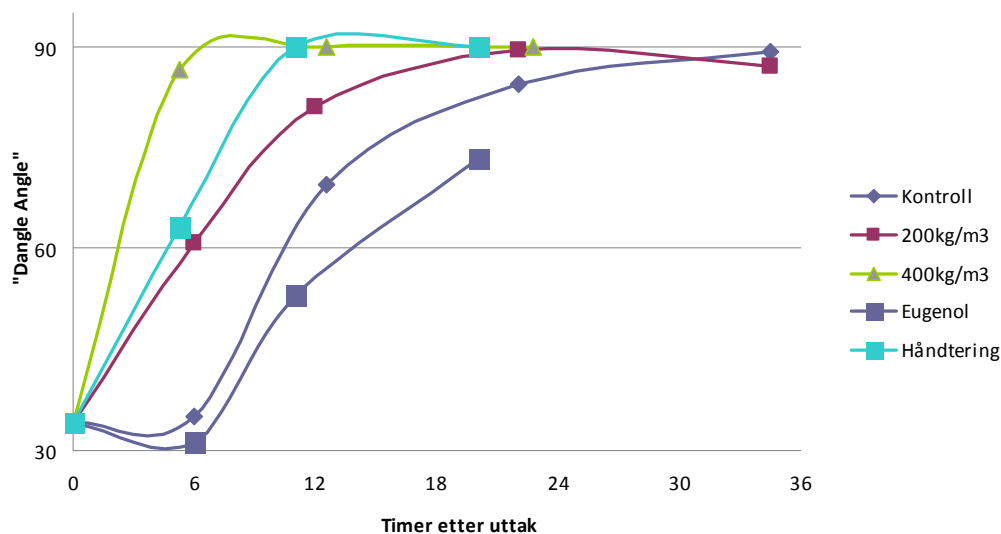
Figur 7 Forskjeller i plasmainnhold av laktat (mmol/l) og glukose (mmol/l) i grupper utsatt for ulik behandling.

Laktatnivåene var forskjellig mellom gruppene ($F = 180,8$; $p < 0,0001$) å fulgte et dose-respons forløp, der gruppa som fikk en behandling med 400kg/m^3 syntes være mest stresset, mens eugenolgruppa syntes å være den minst stressede. Glukosenivåene var også forskjellig mellom gruppene ($F = 13,4$; $p < 0,0001$), der 400kg/m^3 og håndtering var de mest stressende behandlingene, og kontroll- og eugenolgruppene var minst stressede. Laktatmålingene viste imidlertid de klareste resultatene. Dette kan komme av at laktat er forbundet med anaerob stress som et resultat av utmattet fisk, og som kan betegne fisken som ble utsatt for 400kg/m^3 og håndtering. Laktatverdiene i dette forsøket (Figur 9) er noe

høyere enn sammenlignbare resultater fra referer litteratur, mens verdiene for glukose ligger noe lavere eller på lik linje med andre refererte resultater (eks. Iversen et al. 1998, Skjervold et al. 1999, Espmark 2004, Mejdell 2009). Dette tyder igjen på at fisken spesielt i gruppene 400kg/m³ og håndtering var anaerob utmattet.

Rigor mortis:

Også rigor-forløpet fulgte et dose-respons forløp, der fisk trent i 400 kg/m³ var i maksimal rigor 6 timer etter avlaving, mens den eugenolbehandlede fisken ikke opplevde maksimal rigor i løpet av de 20 timene disse ble målt (Fig. 8).



Figur 8 Utvikling av rigor mortis (vinkelgrader) hos fisk utsatt for ulike behandlinger. Rigorforløpet ble målt med "tail-drop."

2.2.1.3 Konklusjon

I dette stressforsøket ga behandling med trengning til 400 kg/m³ mest stress blant gruppene av laksesmolt, etterfulgt av håndtering (omrøring i karet i 5 minutter), 200 kg/m³ og kontrollgruppene. Eugenol fungerte godt og sederte fisken slik at stressresponsen ikke ble utløst. Det var et tydelig dose-respons forløp mellom behandling og stress for målevariablene pH i muskel, laktat og rigorforløp.

2.2.2 Prøveuttak Lerøy Aurora, 21-23. september 2010: Måling av stress og rigor mortis av laks tatt direkte fra ventemerde og etter pumping

For å undersøke betydningen av trengning og pumping, fikk vi anledning å benytte Lerøy Aurora sitt slakteri på Skjervøy. Hovedmålet med forsøket var å undersøke velferd og kvalitet hos slakteferdig fisk som var trent eller trent og pumpet. Et annet mål var å finne ut hvordan fisken påvirkes av undertrykk som oppstår inne i pumpen.

2.2.2.1 Metode

Bakgrunnsinformasjon om fisken

Vi gjennomførte forsøkene ved Lerøy i løpet av 21, 22 og 23. september 2010. Fisken ble pumpet fra to ulike ventemerder. I tillegg til dette fikk vi muligheten til å ta ut fisk direkte fra en nyankommet brønnbåt (22. september), hvor fisken ble slaktet dagen etter. Tabell 1 viser bakgrunnsdata for de to dagene.

Størrelse på ventemerdene var 25 x 25 x 6 meter (3750 m³). Ventemerdene ligger med ulik distanse fra slakteriet. Dette ga en maksimal rør lengde på pumpevakuumssiden på 60 meter, avhengig av hvilken merd det ble pumpet fra. På pumpesiden var rørlengden 70 meter. Hele rørsystemet samt pumpen besto av 4 vinkler og 3 ventiler.

Tabell 1 *Bakgrunnsdata for fisk slaktet fra to ventemerder henholdsvis den 21. og 23. september 2010.*

	21. september	23. september
Antall fisk i merd	23509	24100
Fiskens vekt totalt og per fisk	143,5 tonn (gjennomsnittsvikt = 6,1 kg)	147 tonn (gjennomsnittsvikt = 6,1 kg)
Tetthet	38,3 kg/m ³	39,2 kg/m ³
Ankomstdato	17. september kl. 21.30	22. september kl. 12.10
Tid mellom ankomst og slakt	3 døgn	1 døgn
Transportdistanse fra oppdrettsanlegg	1 time	1 time
Trengvarighet	2 timer	2 timer
Oksygenering	Nei	Nei
Sultetid	72 d °C	90 d °C

Prøvetaking

I løpet av de tre dagene forsøket pågikk fikk vi ut totalt 100 fisk fordelt på følgende måte:

1. Fra ventemerd ved trengestart (antall fisk = 10)
2. Fra ventemerd under trenging (antall fisk = 30)
3. Fra ventemerd ved trengingslutt (antall fisk = 10)
4. Fra etter trenging og pumping, fisk tatt ut etter slagmaskin (antall fisk = 30)
5. Fra brønnbåt, fisk tatt ut fra ventemerd rett etter avlossing (antall fisk = 10)
6. Fra ventemerd, samme fisk som punkt 5; 24 timer restituert (antall fisk = 10)

All fisk ble avlivet med slag til hodet. De som ble tatt ut etter pumping ble avlivet med slagmaskin (SI-5) inne i slakteriet, resten ble avlivet manuelt (Figur 9). Etter avling ble følgende prøvetakingsprosedyre fulgt:

1. Blodprøve ble tatt på ventral side av haleregionen (venøst blod) og analysert for pH, glukose, laktat, pO₂, pCO₂, HCO₃ (bikarbonat), TCO₂ (karbondioksid + karbonsyre +

bikarbonat), natrium, kalium, hematokritt og hemoglobin (Figur 10). Blodprøvene ble analysert ved hjelp av i-STAT 300 Portable Clinical Analyzer (I-STAT Abbott, Princeton, NY, USA) og CG8+ kassetter; laktat ble analysert med LaktatPro (Arkay Inc, Kyoto Japan).

2. pH ble målt i muskel rett etter avliving.
3. Fiskene ble sløyd, individmerket og lagt på is for måling av *rigor mortis*.
4. *Rigor mortis* ble målt 5 ganger i løpet av ca. 40 timer etter avliving. *Rigor mortis* ble målt ved "tail drop" (beskrevet under avsnitt 2.2.1.1.; side 6). Ved hver måling av *rigor mortis* ble i tillegg pH målt i muskel.

Metning (%) av oksygen og temperatur (°C) ble målt i ventemerdene 21. og 23. september.



Figur 9 Manuell avliving av fisk ved siden av ventemerde.

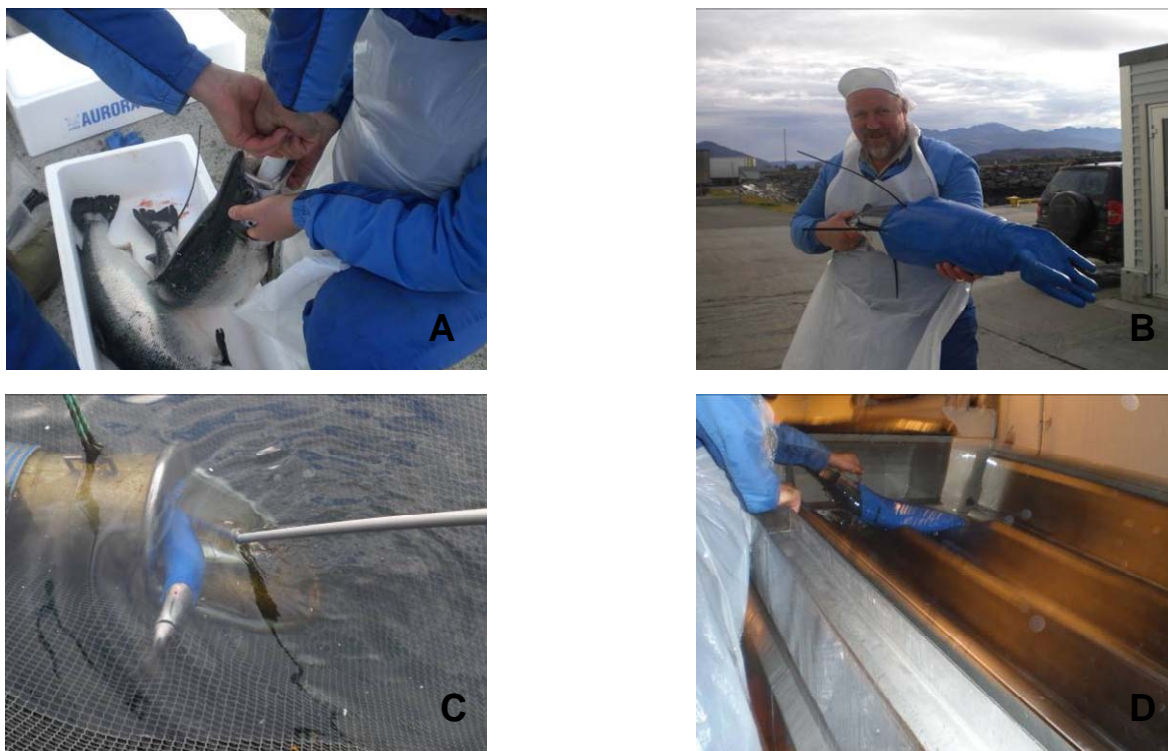


Figur 10 Blodprøvetaking.

Trykk og akselerasjon

For å undersøke hvilke under- (vakuum) og overtrykk laks blir utsatt for gjennom en pumpe-sekvens, ble det montert trykkmålere inne i død laks. For å kunne si noe om støt eller slag ble det samtidig montert inn et akselerometer. Trykkmåleren var av type RBR-1050 (<http://www.rbr-global.com/products/sm-single-channel-loggers/dr-1050-depth>), satt til å måle trykk i desibar en gang per sekund. Akselerometeret var av typen CEFAS G5 (<http://www.cefastechnology.co.uk/>), satt til å måle akselerasjon i x, y, og z planet. Måleområdet på akselerometeret var fra leverandør satt til ± 2 G. Akselerasjonen er en vektor med både en styrke (G) og retning (xyz). Resultantakselerasjonen, regnet ut som kvadratroten av $(x^2 + y^2 + z^2)$ er netto akselerasjon uttrykt som en enkel vektor.

Fisk med trykk- og akselerometer ble plassert foran innsuget til pumpen og holdt fast inntil en ny pumpe-sekvens ble initiert og fisken ble sugd inn i pumpe-systemet.



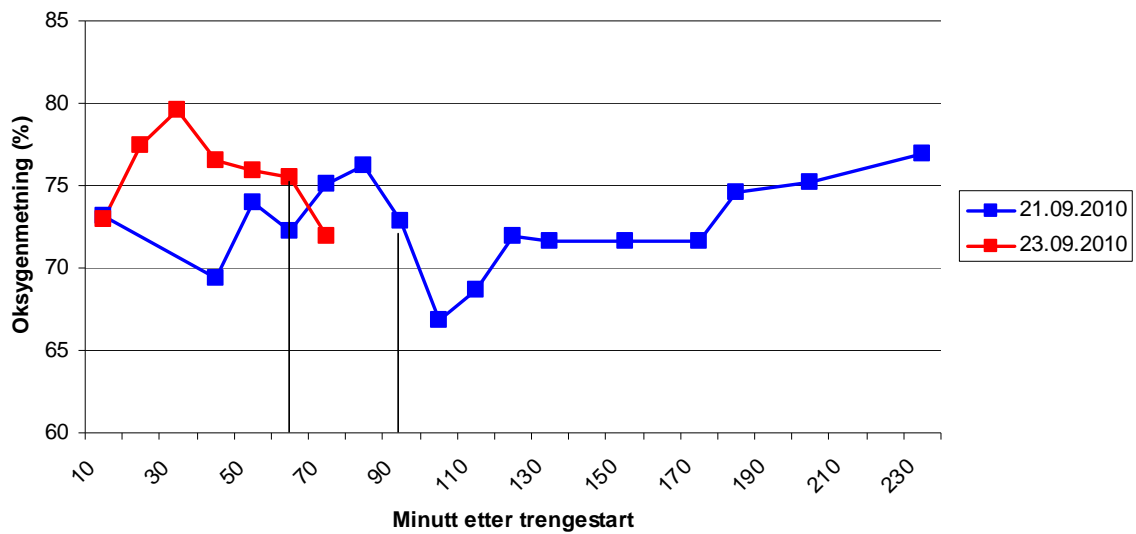
Figur 11 Forsøk med trykk og akselerasjon. A) Montering av trykkmåler og akselerometer i død fisk; B) Utstyr ferdig montert og merket; C) Fisk føres inn i pumpeinnsuget; D) Fisk hentes ut etter pumping.

2.2.2.2 Resultater og diskusjon

Vannkvalitet

Gjennomsnittstemperaturen i ventemerdene var $8,95 \pm 0,09$ °C den 21. og 23. september. (Figur 12 viser oksygenmetningen i de to aktuelle ventemerdene over tid.) Gjennomsnittlig oksygenmetning lå på $72,7 \pm 2,83$ % den 21. september og $75,7 \pm 2,6$ % den 23. september.

De laveste nivåene av oksygen ble målt rett etter starten på et nytt avkast (Figur 12), og dette kom sannsynlig av at tettheten i merden var størst på dette tidspunktet.

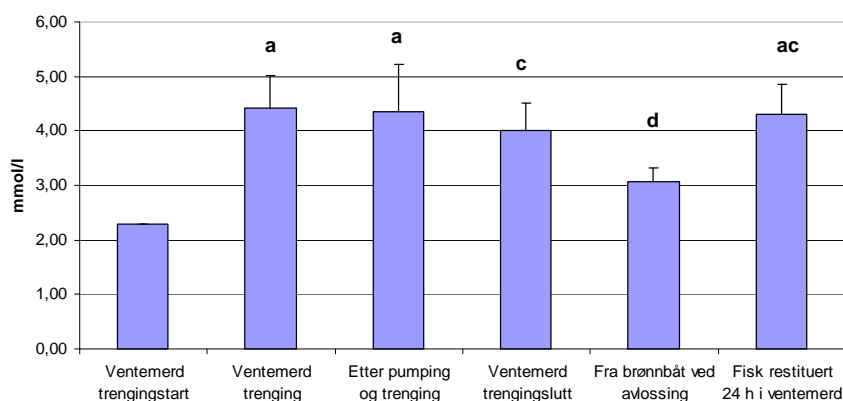


Figur 12 Utviklingen i oksygenmetning i ventemerd løpet av trenging. Start på måling er rett etter trengingsstart. Vertikale streker indikerer start på nytt avkast.

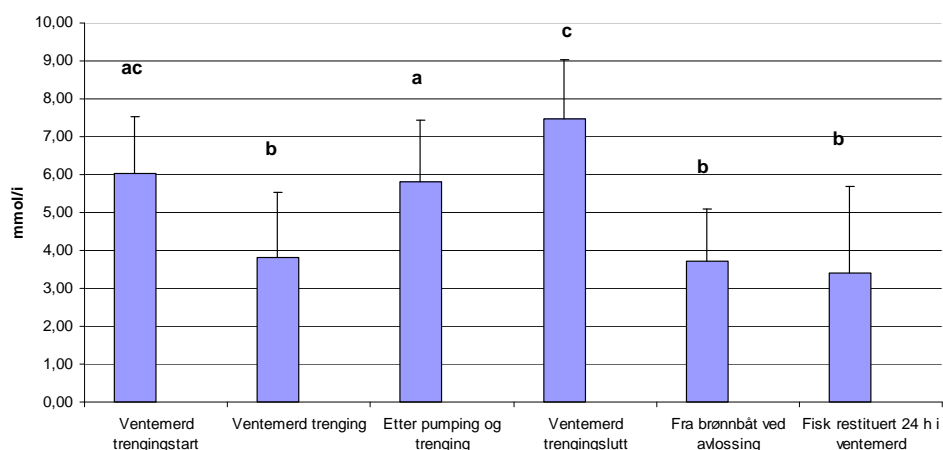
Fysiologisk stress

Glukose, laktat, pH i blod og muskel

Ingen av de målte glukoseprøvene viser noen ekstremverdier (Figur 13), men det synes som om fisk tatt ut etter pumping, og som både er trengt og pumpet, ikke har høyere glukoseverdier enn fisk som kun er trengt. Videre er det interessant å se at ut fra glukoseverdiene kan det virke som om fisk har anstrengt seg mer i ventemerd etter 24 timers restitusjon enn i brønnbåt.



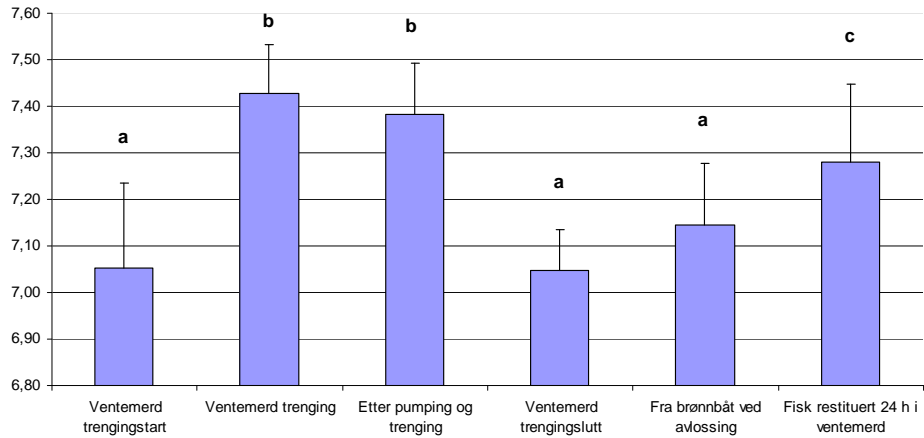
Figur 13 Verdier av glukose i helblod (X-akse). Y-aksen viser behandlingene. For gruppen ventemerid trengingsstart ble kun en prøve registrert, denne er dermed ikke behandlet statistisk. Eventuelle forskjeller mellom gruppene er testet med Kruskal-Wallis variansanalyse. Ulike bokstaverne over søylene viser signifikante forskjeller, mens like bokstaver betyr ingen signifikant forskjell.



Figur 14 Verdier av laktat i helblod. Øvrig forklaring som i figur 13.

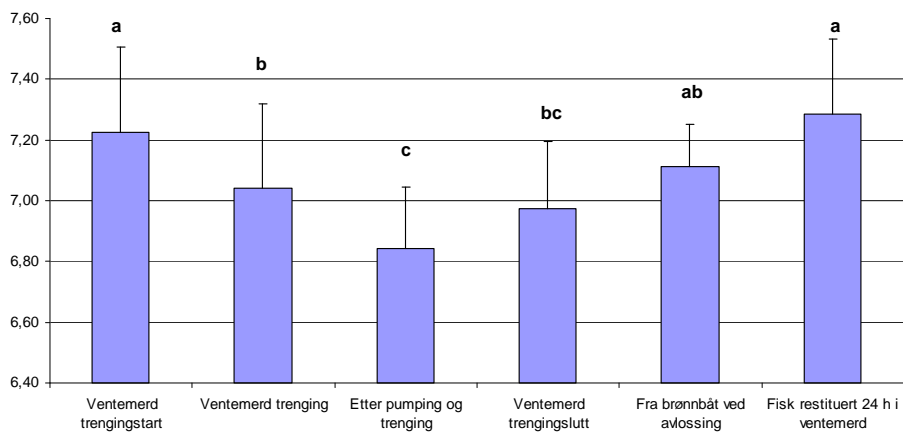
Nivåene av laktat (melkesyre) i helblod viser ingen ekstremverdier, men både ved start og slutt av trenging har fiskene høyere nivåer av laktat enn de øvrige gruppene (Figur 14), noe som betyr at fisken er mer utmattet i disse stadiene enn andre steder i prosessen. Også etter pumping var nivåene forhøyet. Selve trengingen virker relativt lite stressende på fisken. Også brønnbåtavlossingen forårsaker lite stress.

Lave pH-verdier i blodet (Figur 15) kan også ha sammenheng med fiskens respirasjon. Fisk som har høy pustefrekvens som følge av stress, vil produsere mye CO₂ (se senere i arbeidsnotatet), og dermed vil pH i blodet reduseres.

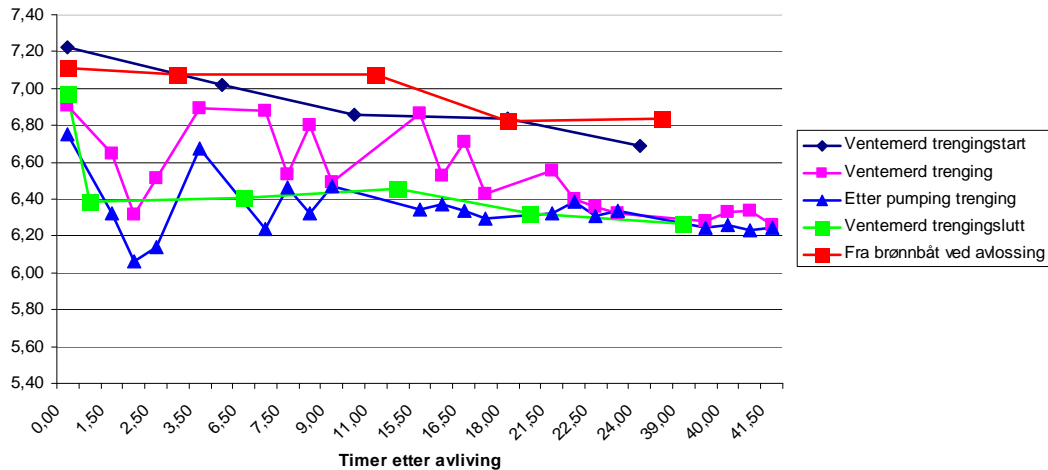


Figur 15 pH i helblod hos fiskegrupper utsatt for ulike behandlinger. Øvrig forklaring som i figur 13.

De laveste pH-verdiene i blod ble funnet hos fisk som var tatt ut ved trengingstart og – slutt, samt hos fisk som var tatt ut direkte etter lossing fra brønnbåt (Figur 15).



Figur 16 pH i muskel rett etter avliving. Øvrig forklaring som i figur 13.



Figur 17 Utviklingen av pH i muskel i løpet av ca 40 timer etter avlaving.

pH-nivåene i muskel utvikler seg noe forskjellig i de ulike gruppene i løpet av de neste 40 timene etter avlaving (Figur 16 og 17). Ved treningslutt og etter pumping er fiskemuskelen utmattet og sur. pH holder seg surere for disse to gruppene sammenliknet med de andre, selv om verdiene jevner seg ut noe over tid. Selve treningen og brønnbåtavlossingen forårsaker ikke forsuring av muskelen.

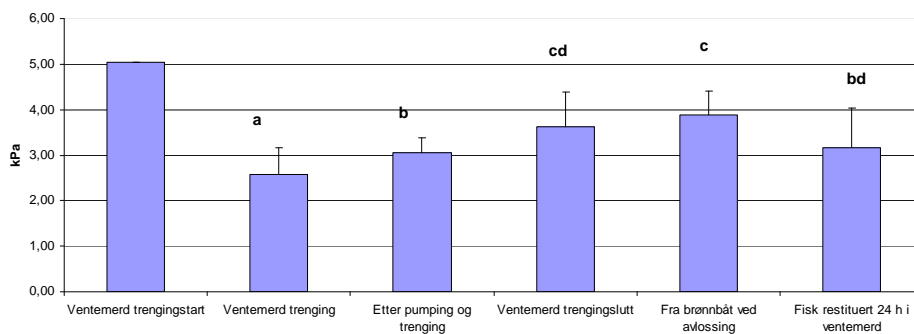
2.2.2.3 Konklusjon: Glukose, laktat, pH i blod og muskel

Ut fra disse resultatene ser det ut til at treningen ved Lerøy Aurora ikke forårsaker dramatisk stress på fisken. Det er noe mer stress under treningstart og – slutt, samt noe mer etter pumping.

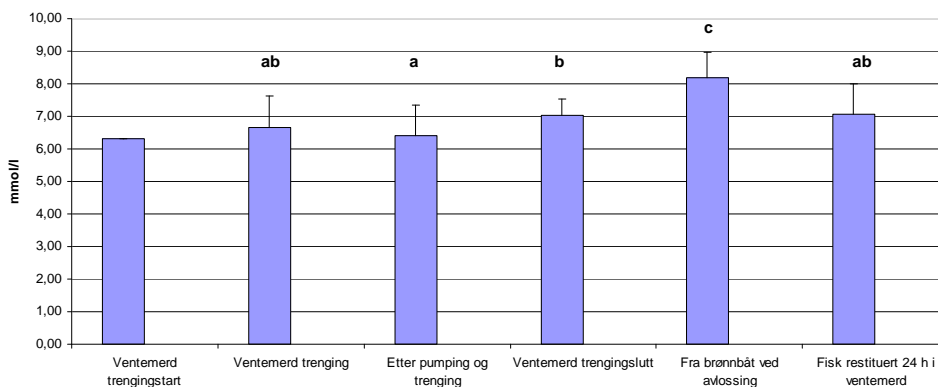
2.2.2.4 Blodgasser, K, Na, Hb og Hct

Blodgasser blir ofte påvirket når fisk blir utsatt for oksidativt stress slik at syre-base-balansen blir endret, noe våre resultater også viser (Figur 18-21). Det var ikke forventet store endringer i blodgassnivåene ettersom fisken i våre undersøkelser kun er utsatt for håndteringsstress. (Det vil da heller ikke bli lagt vekt på å omtale de variablene der det ikke er noen endringer, og ikke alle figurer er vist). De blodvariablene som ble målt var: pO_2 , pCO_2 , HCO_3 , TCO_2 , K, Na, Hb og Hct.

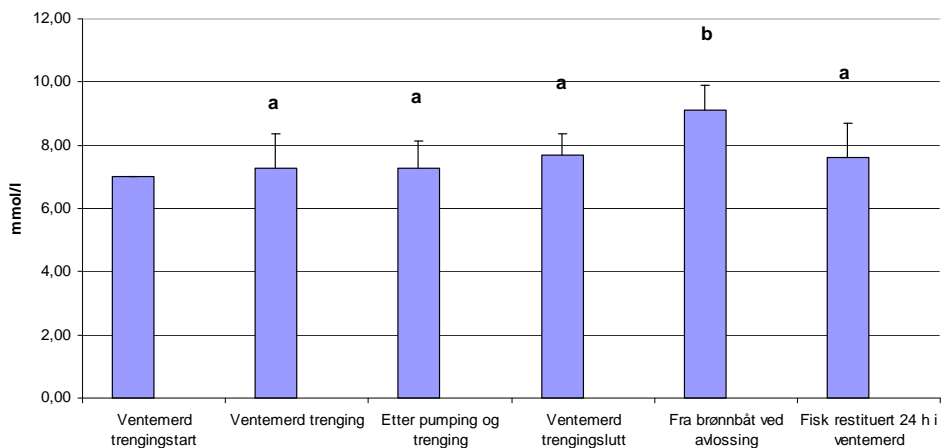
De høyeste nivåene av pCO_2 (Figur 18) ble funnet i fisk tatt ut fra ventemerd ved treningslutt og i fisk tatt ut direkte fra brønnbåt ved avlossing. Dette stemmer godt overens med lave verdier av pH vi fant i blod (Figur 15). Pumping ga ikke spesielt høyere verdier av pCO_2 . Også for HCO_3 (Figur 19) og TCO_2 (Figur 20) hadde fisken som ble tatt ut ved avlossing de høyeste verdiene. Dette kan tyde på at de enten har blitt oksygenert litt for mye eller stresset i under transporten i brønnbåten, noe som i begge tilfeller kan gi økt nivå av karbondioksid i blodet. Det er for oss ukjent hvorvidt fisken ble oksygenert under transporten. Natrium (Figur 21) var høyest for fisken ved treningslutt, noe som indikerer at utmattelse forstyrrer ione-balansen.



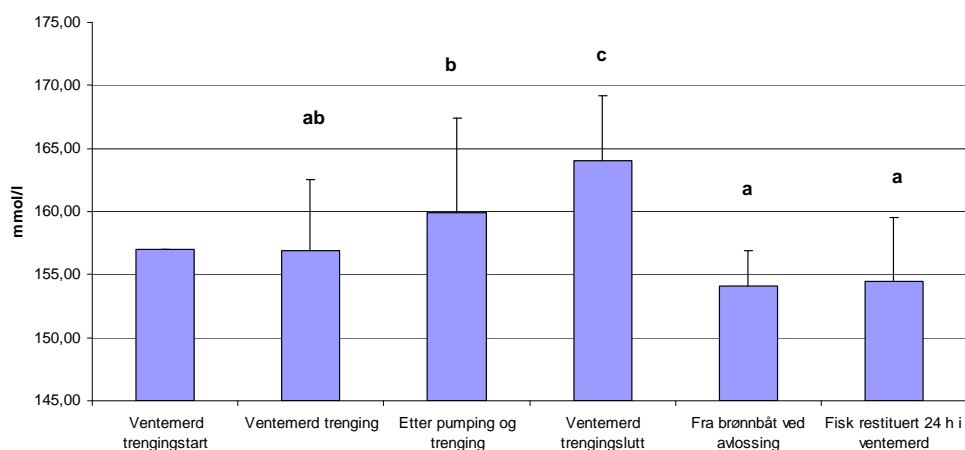
Figur 18 $p\text{CO}_2$ (venøs, kPa). For ventemerid trengingsstart ble kun en prøve registrert, denne er dermed ikke behandlet statistisk. Forskjellene er testet med ANOVA. Ulike bokstaver betyr statistiske forskjeller.



Figur 19 HCO_3^- (bikarbonat) i blod. For ventemerid trengingsstart ble kun en prøve registrert, denne er dermed ikke behandlet statistisk. Forskjellene er testet med ANOVA. Ulike bokstaver betyr statistiske forskjeller.



Figur 20 TCO₂ (total karbon = karbondioksid, karbonsyre, bikarbonat) i blod. For ventemerid trengingsstart ble kun en prøve registrert, denne er dermed ikke behandlet statistisk. Forskjellene er testet med ANOVA. Ulike bokstaver betyr statistiske forskjeller.

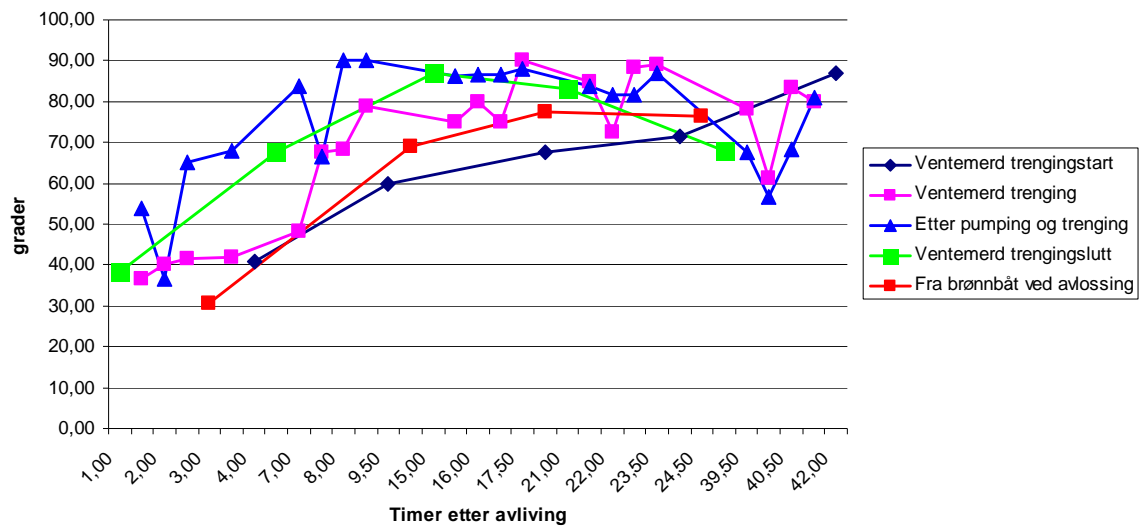


Figur 21 Natrium i blod. For ventemerid trengingsstart ble kun en prøve registrert, denne er dermed ikke behandlet statistisk. Forskjellene er testet med ANOVA. Ulike bokstaver betyr statistiske forskjeller.

2.2.2.5 Konklusjon blodgasser

Det ble ikke registrert noen ekstremverdier i målte nivåer av blodgasser. Brønnbåttransporten har sannsynligvis forårsaket noe økt respiratorisk aktivitet med resulterende økning i TCO₂ og HCO₃, mens utmattelse ved trengingslutt i tillegg til avlossing kan ha vært noe stressende ut fra økte verdier av pCO₂ og natrium.

2.2.2.6 Utvikling av rigor mortis

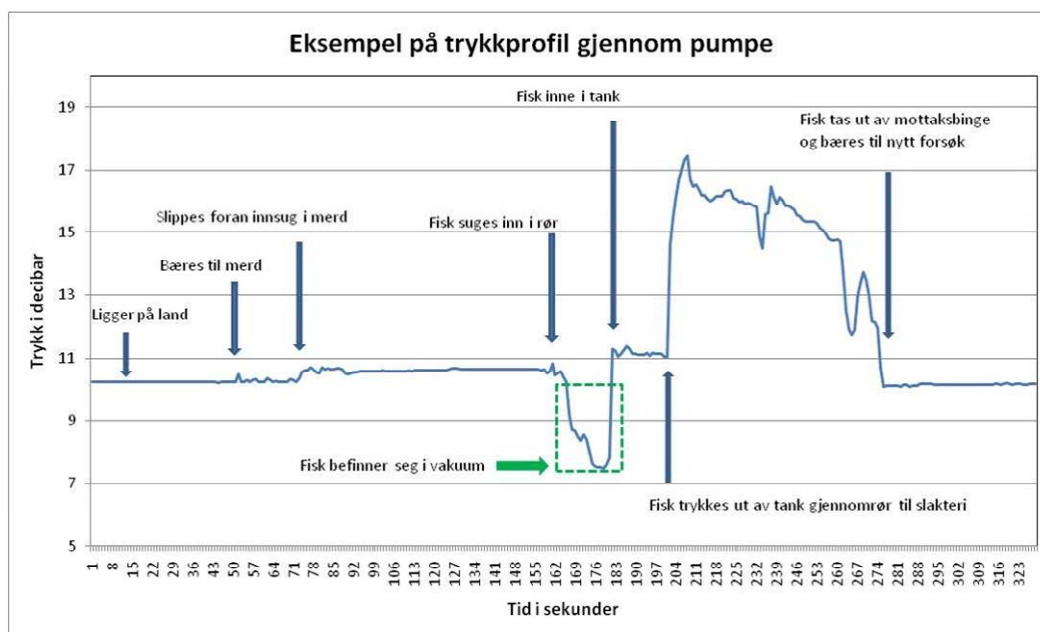


Figur 22 Utvikling av rigor mortis i løpet av 42 timer post mortem.

Fisken som ble tatt ut etter pumping, og som var både pumpet og trengt var 80 °C stiv etter ca. 7 timer, men 100 % (90°) stivhet var oppnådd etter litt over 8 timer (Figur 22). Denne tidlige inntredelse av *rigor mortis* stemmer overens med lave pH-verdier i muskel (Figur 16) og relativt høye laktatnivåer (Figur 14). Fisk tatt ut ved trengingslutt var i full rigor etter ca. 15 timer. Fisk tatt ut ved trengingsstart brukte lengst tid på å gå i rigor, og fisken som ble tatt ut rett etter lossing ble aldri stivere enn i underkant av 80 °C.

2.2.2.7 Trykk og akselerasjon

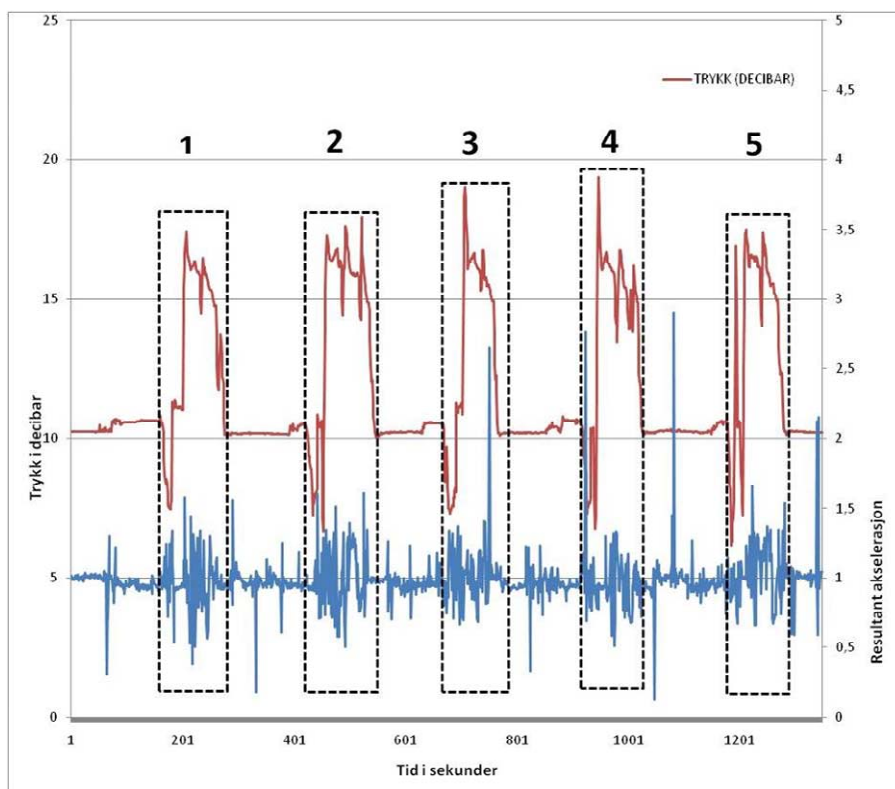
Eksempel på en trykkprofil fra ventemerid til slakteri er vist i figur 23. Deler av tiden før og etter er tatt med for å vise atmosfæretrykket og som forklaring til figur 24. Når fisk slippes foran innsug øker trykket i henhold til dyp (ca. en halv meter under vann), etter en tid suges fisk inn i rørsystemet og opplever vakuum, før trykket på nytt øker inne i tank (fisk ligger på bunn inne i tank under en vannsøyle på ca. 1,5 meter), når trykket så økes igjen blir fisk presset gjennom rørsystemet.



Figur 23 Detaljer fra en pumpesekvens med forklaring på hvor i pumpesystemet fisken befinner seg.

Pumpesekvensene var lett definerbare og så ut til å være relativt like mellom hver test (Figur 24). Hver pumpesekvens fra innsug til ankomst i slakteri varte i underkant av 3 minutter, hvorav sug (tid i vakuum) inn til tank tok ca. 20 sekunder, oppholdstid i tank ca. 20 sekunder og trykksiden fra tank og inn til slakteri ca. 120 sekunder. Maks vakuum per sekvens varierte mellom 0,3 og 0,4 bar undertrykk (hhv 0,7 og 0,6 bar absolutt trykk). Variasjonen skyldes trolig målefeil siden trykkmålerne kun måler engang i sekundet og således ikke alltid treffer på laveste punkt. Samme forklaring gjelder for trykksiden der makstrykk lå på mellom 1,7 og 1,9 bar. Både påvirkningstid og grad av vakuum (dose), er innenfor de undersøkte områdene tidligere funnet å ha liten eller ingen påvirkning på makroskopiske skader hos laks.

Akselerometer data gav usikker informasjon med vanskelig fortolkning (Figur 24). For det første var måleområdet i xyz på +- 2G for lite til å fange opp påvirkningene ved at merkene gikk i metning. Fortolkning kompliseres videre av at fisk (og akselerasjonsmerker) ikke var (og heller ikke kan) fiksert i de ulike x,y,x planene, men fritt bevegde seg rundt sine akser i pumpesystemet uten en referanse. Resultantakselerasjon kan likevel være et relativt mål på hvor skånsom behandling fisken får dersom man sammenligner med andre pumper eller med ulike pumpeinnstillinger. Utslag fra tyngdeakselerasjon (1G) vil være de tilfellene der fisken ikke ligger i ro eller har konstant fart. Men tolkningen eller betydningen av hva absoluttverdiene representerer i faktiske slag eller vibrasjoner er ikke enkel. Fra figur 24 ser vi at det er samsvar med økt resultat både på sug og trykk siden og at verdiene ser noenlunde like ut mellom hver pumpesekvens. Maksverdier kan tenkes å være indikasjoner på større slag/støt (retardasjon ved bråstopp), men ytterligere undersøkelser er påkrevd for å bekrefte dette. I sum bør metodene for mekanisk påvirkning undersøkes næyere.



Figur 24 Trykk og akselerasjonsprofiler for 5 pumpesekvenser fra ventemerd til slakteri. Boksene indikerer selve pumpesekvensen, mens områdene utenfor er når fisk ble transportert fra slakteri og tilbake til ventemerd (se figur 23 for forklaring).

2.2.2.8 Konklusjon

Trenging og pumping ved Lerøy Aurora forårsaket inntredelse av *rigor mortis* etter 7-8 timer samt lave pH verdier i muskel og relativt forhøyede nivåer av laktat. Stressnivået målt fra blod er allikevel ikke unormalt høye. For noen av stressvariablene kan det se ut til at fisken var mer stresset i starten og slutten av trengingen enn under andre deler av prosessen. Selv om trenging og pumping sett i sammenheng forårsaker noe stress hos fisken er de nivåene som denne rapporten rapporterer ikke høyere enn forventet hos fisk under liknende håndtering.

Ved Lerøy Aurora avlives fisken med slagmaskiner. Disse maskinene fungerer godt i og med at tempoet er anpasset mengde fisk som kommer inn og opphoping ikke forekommer. Atferdskaret får fisken til å orientere seg riktig i forhold til slagmaskinene, og for at disse skal fungere optimalt må fisken være så rolig som mulig. Dette skaper god fiskevelferd i og med at fisken må behandles skånsomt for ikke å bli utkjørt før de kommer inn i slakteriet; det siste er viktig for at orienteringen i atferdskarene og i slagmaskinene skal være riktig.

2.2.3 Forsøk ved Nofima (Averøy), november 2010 og mars 2011: Manipulering av pumpehøyde og gjentatt pumping

På Nofima sin forskningsstasjon på Averøy er det mulig å manipulere med pumpeparametre under standardiserte forhold. Etter samtaler med ulike pumpeleverandører ble det bestemt å

gjennomføre to forsøk der det ble manipulert med pumpehøyde og gjentatt pumping. Det ble ikke anbefalt å manipulere med hastighet da dette er regnet som standard og avhengig av motor og rørdiameter. Pumpens utforming og logistikk gjorde videre at bend og ventiler ble vanskelig å ta med som variable. Det er enighet i at vakuum er en viktig faktor, vakuum blir imidlertid omhandlet i et eget delmål.

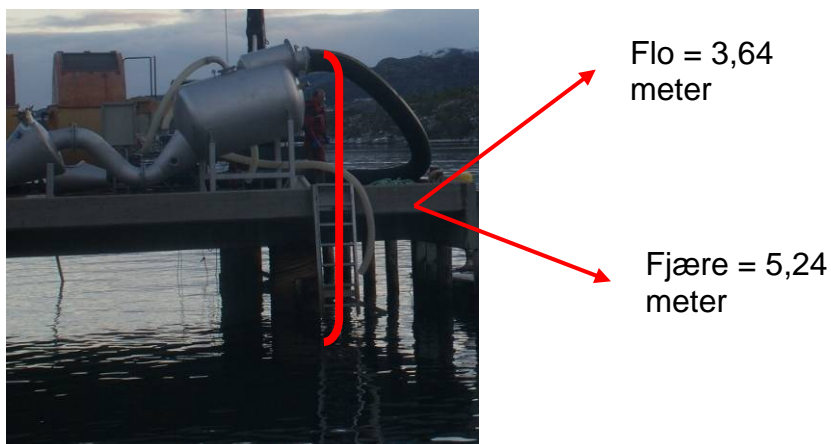
Pumpa som ble brukt i disse forsøkene var av typen Stranda Prolog vakuumpumpe (Figur 25), 2000 liter tank, pumpekapasitet på 500 L³/t, rørdimensjon på 12" både på vakuum og trykksiden.



Figur 25 *Pumpa brukt til Averøyforsøkene var av typen Stranda Prolog.*

2.2.3.1 Metode pumpehøyde

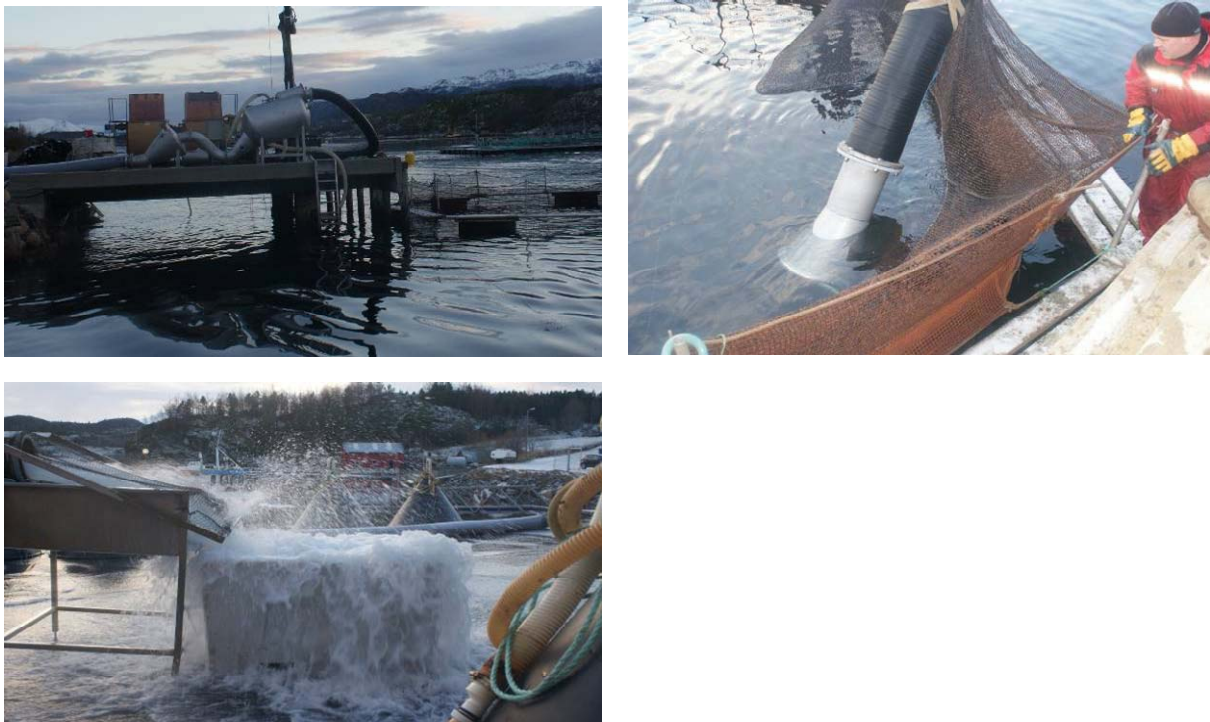
Følgende forsøk ble gjennomført på Averøy desember 2010. Det lot seg ikke gjøre å flytte, heise eller senke pumpa så pumpehøyden ble manipulert ved hjelp av flo og fjære (Figur 26). Antall meter for henholdsvis flo og fjære ble ved de aktuelle tidspunktene målt fra vannoverflaten til pumpeinntakets høyeste punkt (Figur 26).



Figur 26 *Pumpa brukt til Averøyforsøkene var av typen Stranda Prolog. Pumpehøyde ble bestemt ut fra flo og fjære.*

Seksti laks fordelt på tre grupper ble brukt i forsøket. Gruppe 1 = flo; gruppe 2 = fjære; gruppe 3 = kontroller. Kontrollene ble ikke pumpet men håvet rett fra ventemerd. All fisk ble drept med slag mot hodet. En og en fisk ble pumpet rett fra ventemerd (Figur 27). Hver pumpesekvens tok 25-30 sekunder. Etter avliving ble det tatt blodprøve, målt pH i muskel og rigor forløpet ble fulgt de neste 25 timer. Det ble også tatt bilde av hver enkelt fisk for å se på ytre skader.

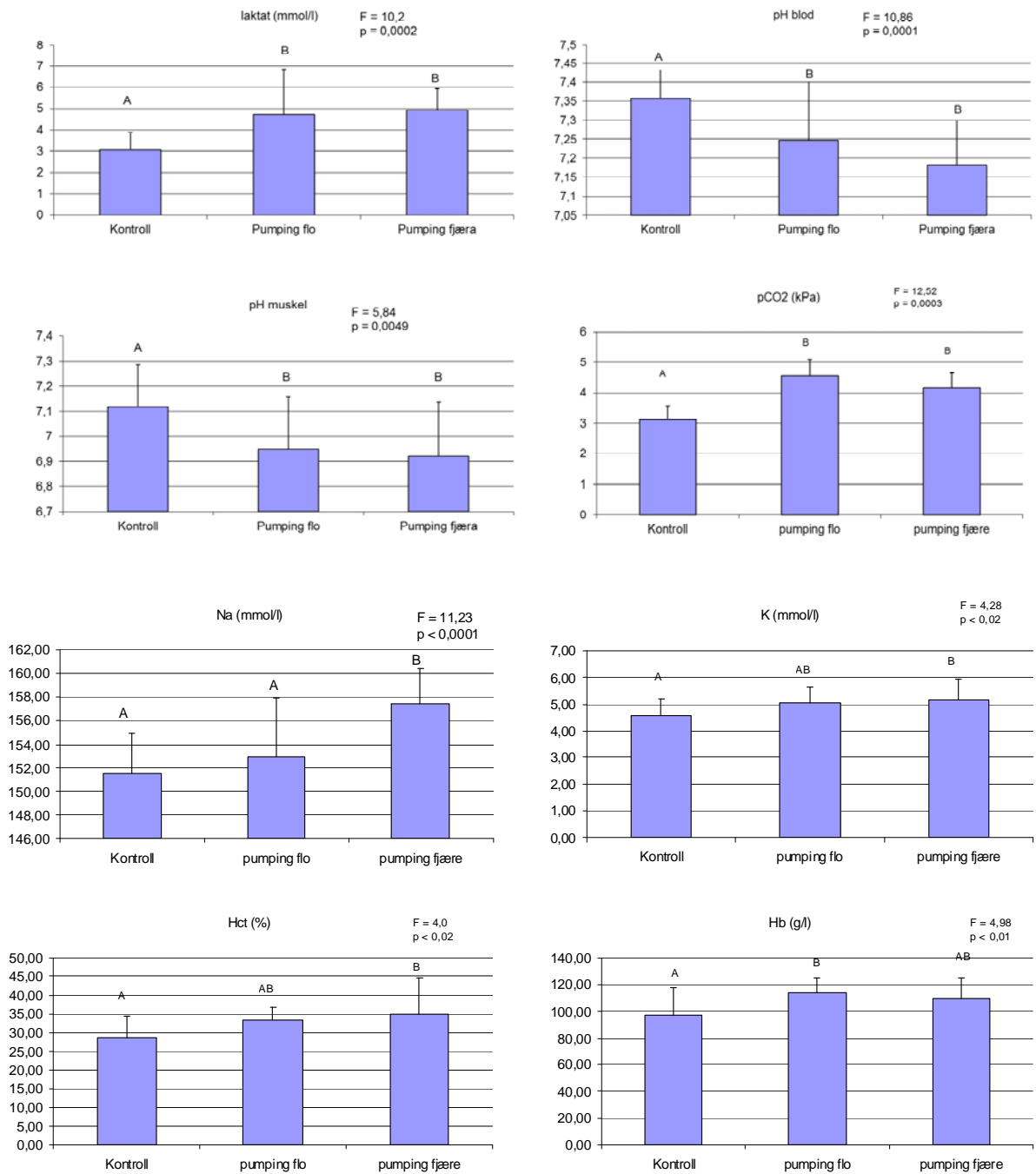
Blodprøvene ble tatt av venøst blod i haleregionen ved hjelp av vakuutainer, sprøyte (Microlance, 23G x 1", 0,6mm x 25mm) og hepariniserte glass. Laktat ble målt med Lactate Pro og glukose ble målt med apparat fra FreeStyle Freedom lite. Resten av blodparametrene ble analysert med I-STAT maskin (CG8+ kassetter). pH muskel ble målt med Hamilton elektrode.



Figur 27 En og en fisk ble pumpet direkte fra en nærliggende merd.

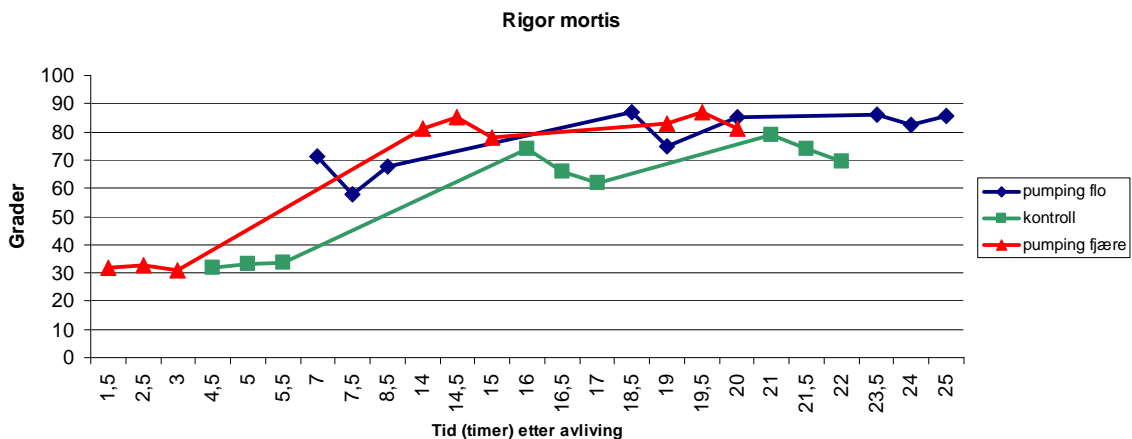
2.2.3.2 Resultater og diskusjon pumpehøyde

I løpet av forsøket var vanntemperaturen 7 °C. Ingen fisk døde som resultat av pumpingen eller tilhørende behandling. I dette forsøket ble effekter av pumping påvist for flere av variablene, men færre effekter av pumpehøyde ble påvist. På anleggene har oppdretterne stort sett tatt konsekvensene av subjektivt observerte effekter av pumpehøyde og plasserer som regel pumpa så nært vannoverflaten som mulig. I dette tilfellet var pumpehøyden på det minste 3,64 meter (flo), noe som er antatt høyere enn hva som er vanlig praksis.

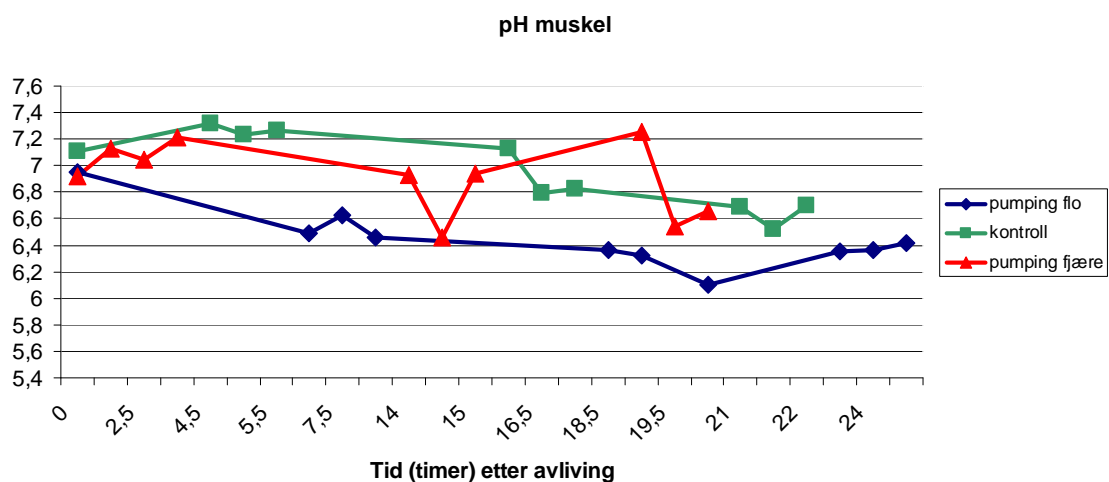


Figur 28 Blodverdier av fisk pumpet på flo eller fjære sjø. Denne behandling skulle herme pumpehøyde. Kontrollfiskene er ikke pumpet.

For de fleste blodverdiene ble det påvist effekt av pumping (laktat, pH muskel og blod, pCO₂, K, Hct og Hb) (Figur 28). Dette er et viktig funn da effekter av pumping er dokumentert i liten grad. For verdiene glukose, pO₂, HCO₃ og TCO₂ var det ingen effekt av pumping eller forskjell på pumpehøyde. Glukose påvirkes av langvarig aktivitet så manglende påvirkning av glukose er som ventet. Det hadde vært ventet å finne effekt på pO₂, HCO₃ og TCO₂ ettersom dette er gasser som påvirkes av stress, også kortvarig. Det var kun natrium som viste forskjell på pumpehøyde. Fiskene som ble pumpet på lav (fjære) pumpehøyde hadde høyest nivå av natrium. Dette tyder på ione-ubalanse.



Figur 29 Utvikling av rigor mortis i løpet av 25 timer post mortem.



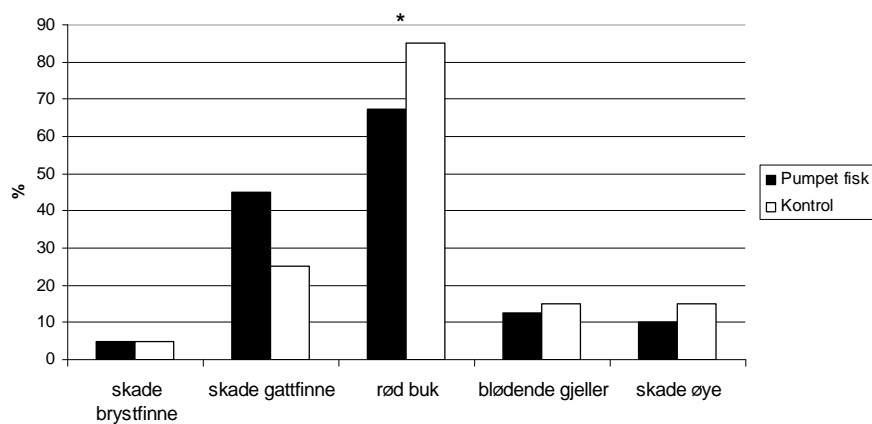
Figur 30 Utvikling av pH i muskel i løpet av 25 timer post mortem.

Et overraskende resultat var at pH i muskel sank hos fiskene som var pumpet ved flo sjø (lavere pumpehøyde) (Figur 30). Årsak til dette er ukjent og uforklarlig i forhold til blodverdiene og utvikling av *rigor mortis* som viste at fiskene pumpet ved fjære sjø (høyere pumpehøyde) kom raskest i rigor sammenliknet med både kontroller og fiskene pumpet ved flo (lavere pumpehøyde) (Figur 29).

Av hver fisk ble det tatt bilde for å avdekke ytre skader (Figur 31). En hypotese er at stress resulterer i rød buk hos laks. I tillegg ble det notert skader på finner, blødende gjeller og øye skader. Da det ikke ble avdekket noen forskjeller mellom pumpehøyder ble disse gruppene slått sammen slik at figur 32 viser forskjell mellom pumpet og ikke pumpet fisk



Figur 31 Eksempler på fisk uten (til venstre) og med (til høyre) rød buk.



Figur 32 Grafisk framstilling av ytre skader på pumpet og ikke pumpet fisk.

En stor andel av fisken hadde rød buk, men det var signifikant flere kontrollfisker med rød buk. Dette resultatet støtter dermed ikke hypotesen om at stress resulterer i rød buk. Hva som er årsaken til at kontrollfisker hadde flere røde buker er ukjent.

2.2.3.3 Metode gjentatt pumping

For å simulere effekten av akkumulert stress ble det på Averøy, mars 2011 gjennomført et standardisert forsøk der fisk ble pumpet gjentatte ganger fra ventemerden. Dette ble gjort ved at en og en fisk ble pumpet fra ventemerden og rett tilbake før den ble pumpet på ny (Figur 33).



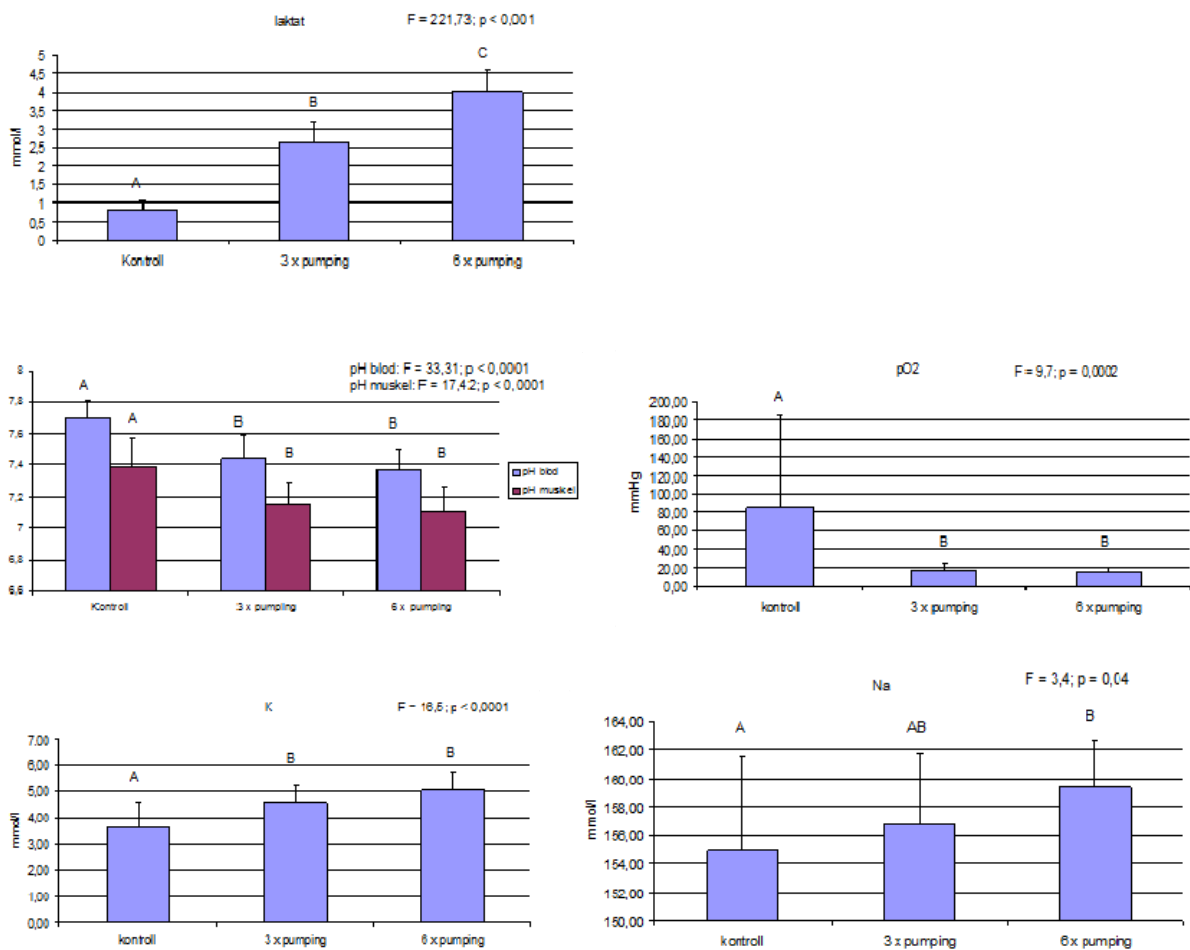
Figur 33 Gjentatt pumping. Fisk ble pumpet opp og tilbake til samme merd.

I løpet av to dager ble en og en fisk pumpet enten 3 ganger (N = 20), 6 ganger (N = 20), eller 0 ganger (N = 20 kontroller håvet direkte fra merd) før de ble avlivet med slag og tatt blodprøve av. På grunn av ressursmangel ble det her ikke målt *rigor mortis*. For å forhindre effekt av flo og fjære ble rekkefølgen på fiskene tilhørende de ulike behandlingene randomisert. Hver pumpesekvens tok 25-30 sekunder. Etter endt pumping ble fisken håvet fra merden og avlivet med slag.

Samme blodprøveprosedyre ble fulgt som beskrevet i kapittel 3.2.2.1, bortsett fra at blodprøvene i tillegg ble sentrifugert ved 3000G og plasma analysert for kortisol.

2.2.3.4 Resultater og diskusjon for gjentatt pumping

Vanntemperaturen var 3,5 °C. Ingen fisk døde som resultat av pumpingen eller tilhørende behandling. I-STAT maskinen ga ingen verdier for variablene pCO₂, pO₂, HCO₃, TCO₂.



Figur 34 Blodverdier av pumpet 3 ganger, 6 ganger og kontroll fisk som ikke er pumpet.

Tilsvarende som for pumpehøyde var det også her et flertall av variablene som påviste effekt av pumping (pH blod + muskel, pO₂, Na og K) (Figur 34). Imidlertid var det høyere nivåer av laktat hos fisk som var pumpet 6 ganger sammenliknet med fisk som var pumpet 3 ganger. Kontrollene hadde lavere laktatnivåer enn begge disse gruppene (Figur 34). For variablene glukose, Hb, Hct og kortisol var det ingen effekt av varken pumping eller gjentatt pumping. Kortisol har tidligere vist seg å være en vanskelig variabel å standardisere slik at manglene forskjeller her kan være et resultat av håndtering (eks håving).

2.3 Etablere samarbeid med Storvik AS og evaluere effekt av oksygenering i forbindelse med trenging

Under dette delmålet ble det gjennomført en aktivitet i 2010.

2.3.1 Evaluere biologiske effekter og effekter på vannkvalitet av oksygenering i forbindelse med trenging ved hjelp av NetOx (SalMar, oktober 2010)

Dette forsøket ble gjennomført i samarbeid med Storvik Aqua AS på SalMar sitt slakteri på Frøya, oktober 2010. Hensikten med forsøket var å undersøke effekter av oksygenering av ventemerder under trenging på fisken sin biologi og på vannkvalitet

2.3.1.1 Bakgrunnsinformasjon om fisk

Prøveuttaket ble foretatt ved SalMar sitt lakseslakteri 13. og 14. oktober 2010. I løpet av disse dagene ble fisk pumpet fra tre ulike ventemerder; der de to første ikke var oksygenererte mens den siste var oksygenerert. Tabell 2 viser bakgrunnsdata for de to dagene.

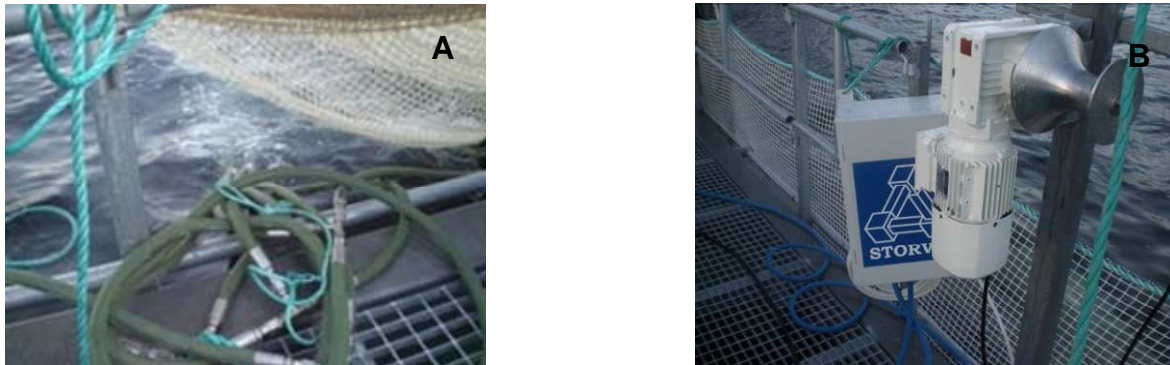
Størrelse på ventemerdene er 24 x 24 x 15 meter (8640 m³). Ventemerdene ligger med ulik distanse fra slakteriet, i alt 6 ventemerder ligger på rekke.

Tabell 2 Bakgrunnsdata for fisk slaktet fra ventemerder 13. og 14. oktober.

	13. oktober 1. trenging	13. oktober 2. trenging	14. oktober 3. trenging
Oksygenering	Nei	Nei	Ja
Antall fisk i merd	60026	9578	50138
Snittvekt fisk	5,4 kg	4,8 kg	6,1 kg
Biomasse	37,5 kg/m ³	5,3 kg/m ³	35,4 kg/m ³
Tid mellom ankomst og slakt	5 døgn	3 døgn	1 døgn
Transporttid fra oppdrettsanlegg	6 timer, fra Farmannsøya	1,5 time, fra Kattholmen	46 timer, fra Kvitfloget
Sultetid	14 dager	21 dager	12 dager

2.3.1.2 Oksygenering

Oksygenering av ventemerden ble gjort med oksygeneringsenheten NetOx under dag 2 (14. oktober). NetOx er en innovasjon fra OxyVision, og utstyret distribueres av Storvik AS. Storvik var med til Frøya for å bistå med montering og bruk av NetOx (Figur 35). NetOx er et slangesystem som ble montert under ventemerden slik at hele undersiden var dekket av oksygenering. NetOx ble montert på 8 meters dyp, ventemerdbunnen stikker 6 meter ned slik at det var 2 meter fra ventemerdbunnen til NetOx enheten.



Figur 35 Montering av NetOx under ventemerd A), styring av oksygentilførsel B).

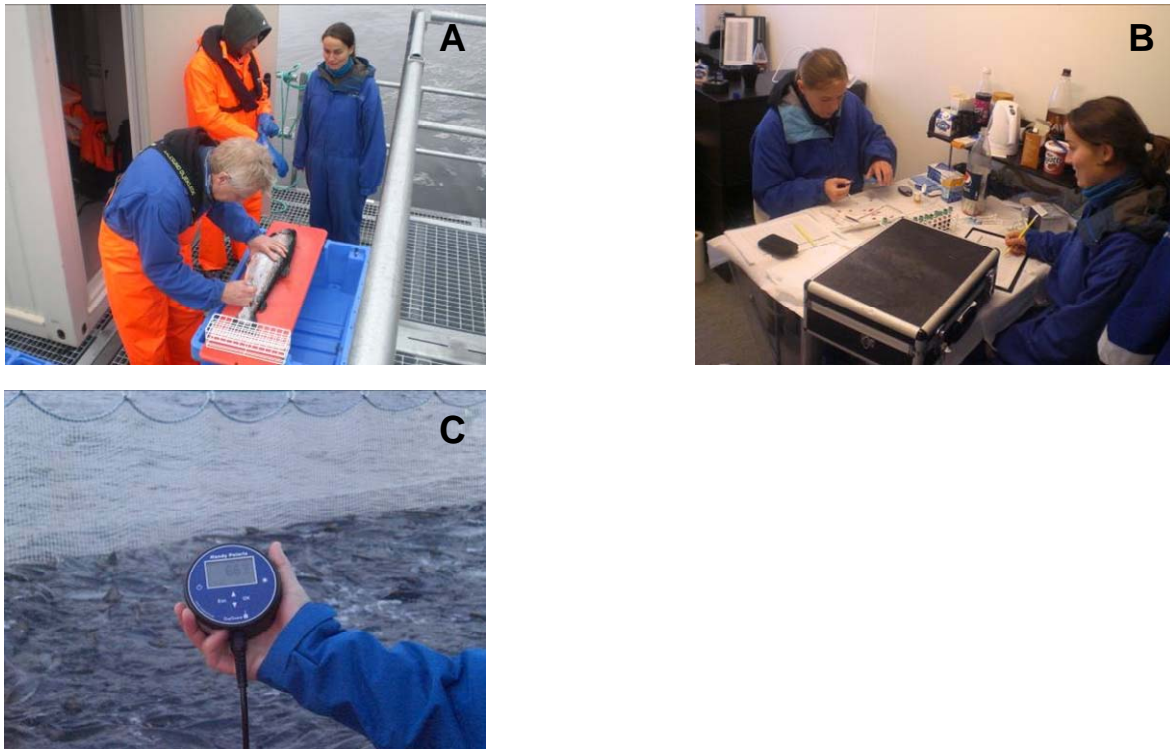
2.3.1.3 Prøvetaking

I løpet av de to dagene vi jobbet på Frøya fikk vi ut totalt 98 fisk fordelt på følgende måte:

1. 1. trenging: uten oksygenering. Fra ventemerd ved trengestart (antall fisk = 10)
2. 1. trenging: uten oksygenering. Fra ventemerd under trenging og pumping (antall fisk = 15)
3. 2. trenging: uten oksygenering. Fra ventemerd ved trengestart (antall fisk = 10)
4. 2. trenging: uten oksygenering. Fra ventemerd under trenging og pumping (antall fisk = 15)
5. 3. trenging: med oksygenering. Fra ventemerd ved trengestart (antall fisk = 20)
6. 3. trenging: med oksygenering. Fra ventemerd under trenging og pumping (antall fisk = 28)

All fisk ble avlivet med slag til hodet direkte på merdkanten. Etter avling ble blodprøve tatt på ventral side av haleregionen (venøst blod) og analysert for pH, glukose, laktat, pO_2 , pCO_2 , TCO_2 (karbondioksid + karbonsyre + bikarbonat), natrium, kalium, hematokritt og hemoglobin (Figur 36). Blodprøvene ble analysert med ved hjelp av i-STAT maskin. Laktat ble analysert med LaktatPro.

Metning (%) av oksygen (med Oxy-Guard) (Figur 36 c) og temperatur ble målt i ventemerdene 13. og 14. oktober. Figurene 43 a og b viser prøvetakingsprosedyren.



Figur 36 Prøvetaking ved SalMar sitt lakseslakteri på Frøya. A) blodprøvetaking, B) analysering av blod, C) måling av oksygenmetning med Oxy-Guard.

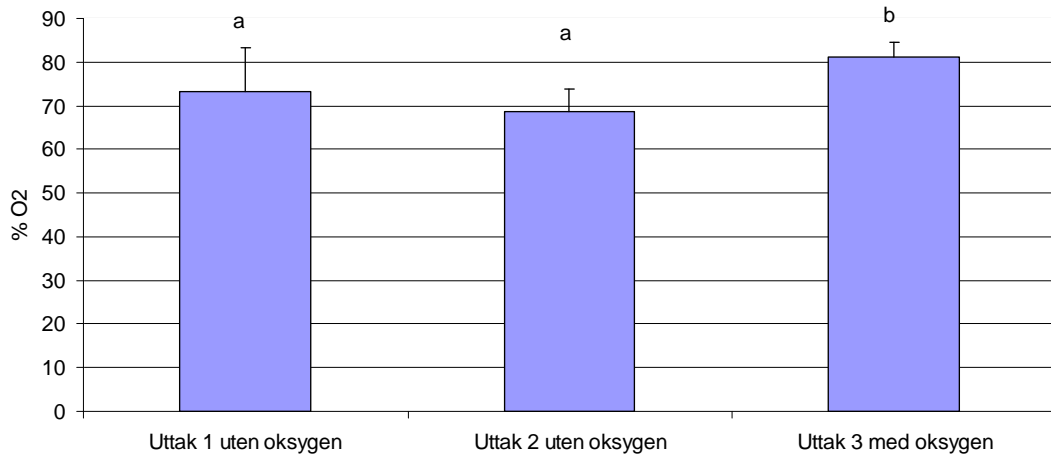
2.3.1.4 Resultat og diskusjon

Ettersom de tre ulike uttakene kommer fra så vidt forskjellig utgangspunkt (tabell 2) behandler vi dem hver for seg, selv om to av dem er fra merder som ikke mottok oksygen.

Vannkvalitet

Vanntemperaturen i perioden 13. og 14. oktober lå på 10 – 11 °C.

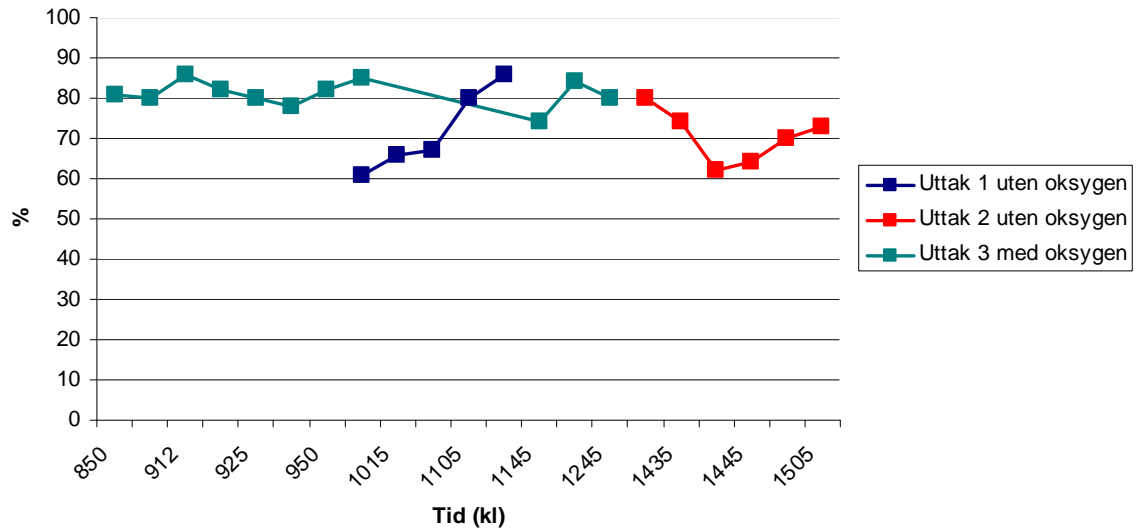
Det var målt høyere nivåer av oksygen i vannet den dagen oksygenering av ventemerd pågikk (Figur 37). Figur 38 viser endringene i oksygenmetning i løpet av prøvetakingsperioden. Som figuren viser var oksygenmetningen også mer stabil på uttak 3 da oksygen ble tilsatt. På de to andre uttakene var oksygenmetningen varierende fra 61 % til 86 % metning oksygen.



Figur 37 Gjennomsnittsverdier (med standardavvik) av oksygenmetning for de tre uttakene. Forskjellene er analysert med Kruskal - Wallis variansanalyse. Ulike bokstaver over søylene indikerer ulikheter, mens like bokstaver betyr at det ikke er noen forskjeller. Den samme forklaringen går igjen på de kommende figurene.

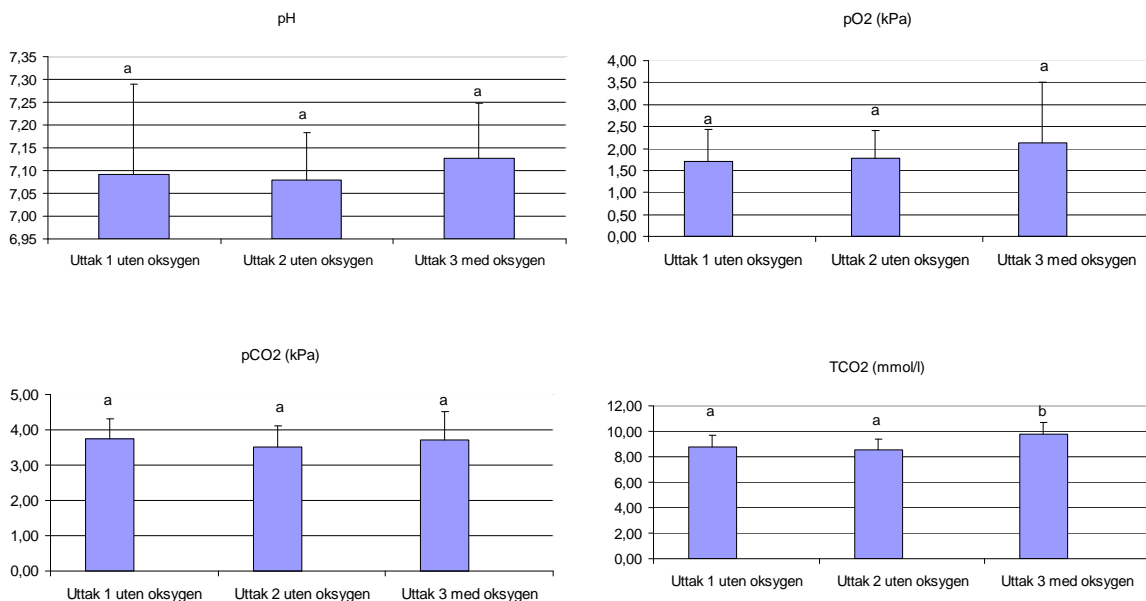
Fysiologisk stress – blodanalyser

Ved stress forårsaket av eks trenging, ventes forhøyede nivåer av laktat (under anaerob muskelaktivitet) og glukose (under aerob muskelaktivitet). Som forventet var det ingen forskjeller mellom oksygenerte og ikke oksygenerte ventemerder i dette prøveuttaket hva angår laktat og glukose. Dette kommer sannsynligvis av at tilsetning av oksygen ikke medførte dramatiske endringer i muskelaktivitet. Hyperoksi/hypoksi kan føre til økt aktivitet, men da skal nivåene av oksygen være atskillig mer avvikende fra normalen enn observert her. På den andre side forventes det større endringer i blodgasser ettersom dette indikerer endringer i syre-base balansen som ofte er resultatet av endringer i oksygentilførselen.



Figur 38 Endring i oksygenmetning over tid. Uttak 1-3 er fra ulike trenginger og må derfor sees hver for seg.

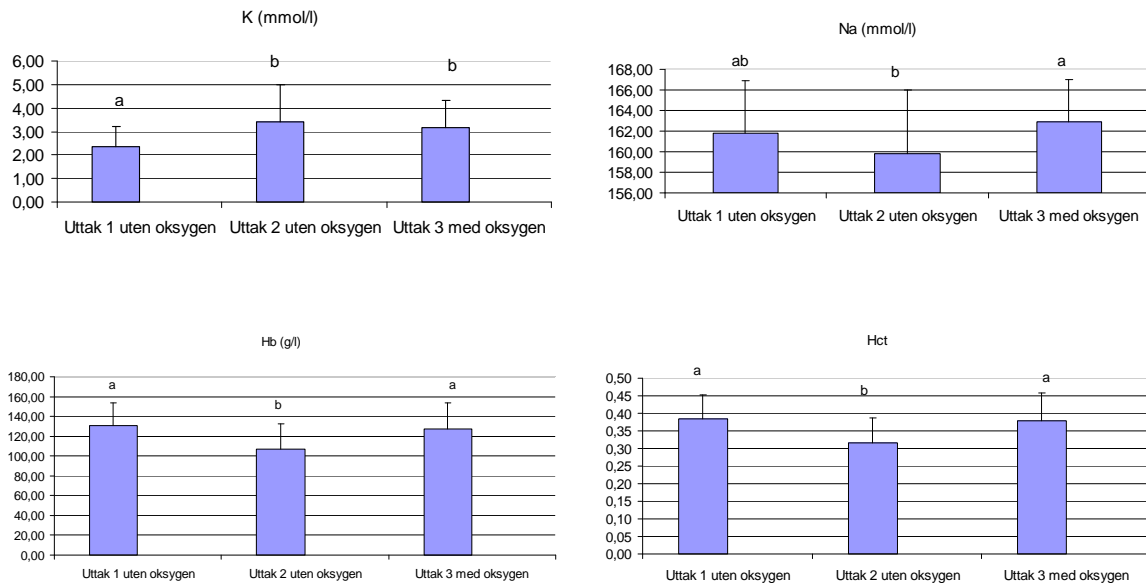
Det var imidlertid store individuelle variasjoner i laktatnivåer. Disse individuelle forskjellene viste at enkeltindivider hadde laktatnivåer opp mot 8 mmol/l som indikerer stress.



Figur 39 Nivåer av pH, pO₂, pCO₂ og TCO₂ (karbondioksid + bikarbonat + karbonsyre) i helblod.

Andre resultater fra målinger i helblod viste at det ikke var noen forskjeller mellom oksygenerte og ikke oksygenerte fisker i nivåer av pH i blod, heller ikke i pO₂ eller pCO₂. Derimot hadde den oksygenerte fisken noe høyere nivåer av totalt CO₂ (TCO₂) (Fig. 39).

Dette er ofte resultat av høyt forbruk av oksygen som igjen gjør at fiskene får ubalanse i syre-base sammensetningen.



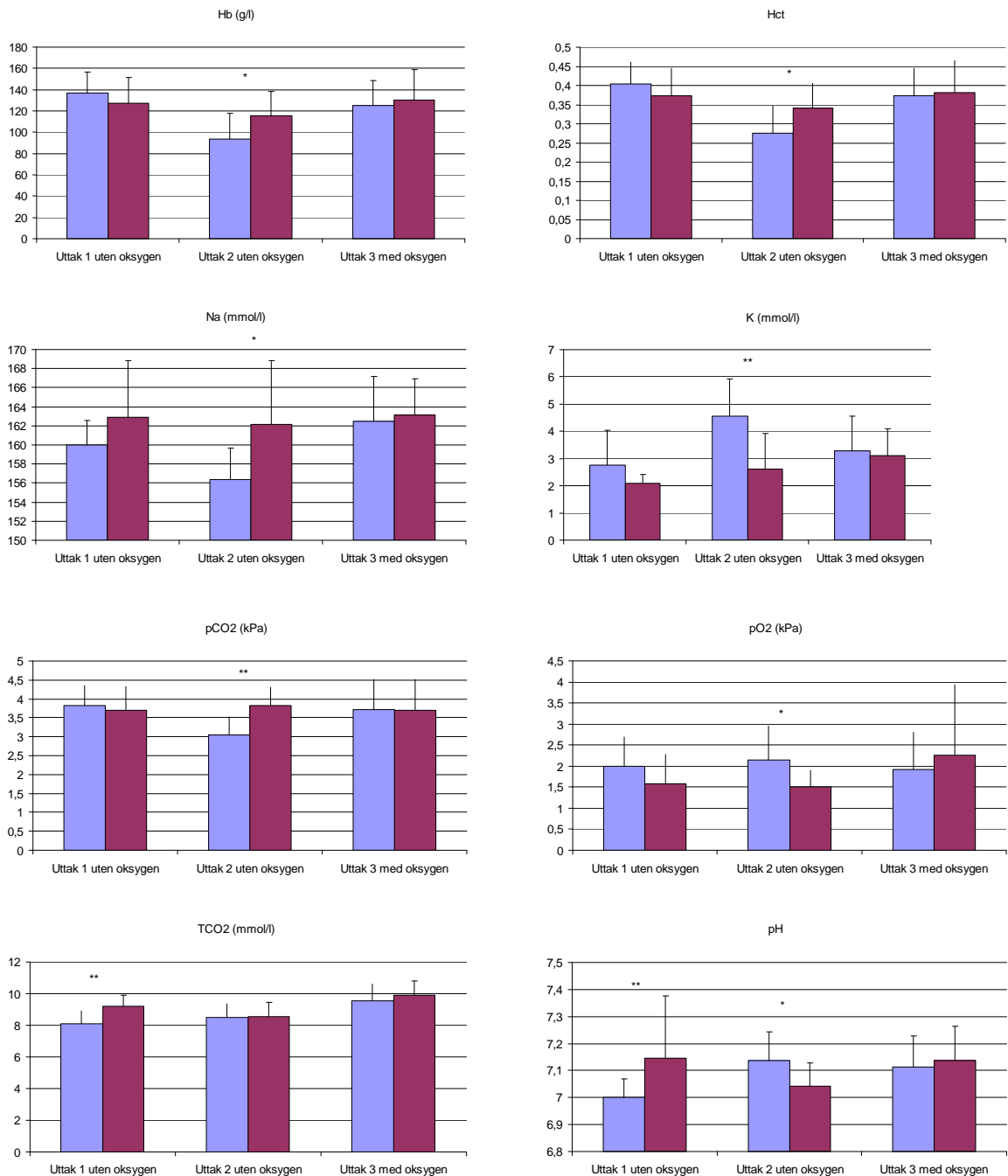
Figur 40 Nivåer av kalium (K), natrium (Na), hemoglobin (Hb) og hematokritt (Hct) i helblod.

Oksygenering av ventemerd ha ikke store utslag på kalium, natrium, hemoglobin eller hematokritt (Figur 40). Dette betyr at oksygennivåene i fiskene i de ikke oksygenerte merdene også var tilfredsstillende. Imidlertid var det forskjeller mellom de to ikke oksygenerte trengingene (uttak 1 og 2), sannsynligvis som et resultat av ulik bakgrunnsbehandling (eks transporttid, sultetid etc.).

Konklusjon så langt er at oksygenering av ventemerd på SalMar i dette tilfelle ikke ga store fordeler for fisken, heller omvendt. Høyere nivåer av TCO_2 kan tyde på at oksygentilførselen i utgangspunktet er god og at det ekstra tilførte oksygenet under gjeldende temperaturer og årstid ga fisken i overkant av hva de trenger. Men figur 38 viser også at ventemerden med tilført oksygen holdt jevnere oksygenivå enn de to merdene som ikke motto oksygen.

Forskjeller før og under pumping?

For å undersøke om ulike stadier av trenging påvirket oksygenerte og ikke oksygenerte fisker ulikt tok vi prøver av fisk i starten av trenging og før pumping og når trenging og pumping var i gang. For laktat og glukose utgjorde dette ingen forskjell. Det var forventet å finne noe høyere nivåer av spesielt laktat under pumping når tetthetene er større i merdene på grunn av trenging, men dette var ikke tilfelle.



Figur 41 Forskjeller mellom før pumpestart (blå) og under pumping (lilla) for hemoglobin (Hb), hematokritt (Hct), natrium (Na), kalium (K), pCO₂, pO₂, TCO₂ og pH i blod.

For hemoglobin, hematokritt, natrium, kalium, pCO₂, pO₂, TCO₂ og pH (Figur 41) var det ingen forskjeller mellom trengestadiene for de oksygenerte fiskene, men for de ikke oksygenerte fiskene var det for disse verdiene forskjell mellom trengestadiene.

Det er verdt å merke seg at for det andre uttaket, der fisken var transportert 1,5 time og sultet i 21 dager medførte trenging og pumping at fiskene hadde høyere nivå av pCO₂ og lavere nivå av pO₂ (Figur 41). Dette medfører lavere pH i blodet hos de samme individene og betyr at fiskene forbrukte mer oksygen og dermed produserte mer CO₂ som et resultat av

oksidativt stress. Det økte forbruket av oksygen kan videre forklare de forhøyede nivåene av hemoglobin (Figur 41). Hemoglobin er blodets oksygenbindende proteiner. Stress blant fiskene i uttak 2 forklarer sannsynligvis også syre-base ubalansen (Na og K), og økt hematokritt..

2.3.1.5 Konklusjon

Oksygenering av ventemerd på høsten og ved lave vanntemperaturer har nokså liten effekt. I tilfeller der oksygentilgangen er god fra før kan denne ekstra oksygentilførselen til og med være negativ med at fisken blir hyperoksisk. Vi kan se tendenser til dette ved høyere nivåer av TCO₂ hos den oksygenerte fisken. På den andre siden medførte tilsetningen av oksygen stabile oksygenivåer i merden og det ble heller ikke registret noen endringer i de målte blodvariablene i ulike deler av trengingen der tettheten er ulik. Tilførsel av oksygen kan dermed skape et mer stabilt miljø i merdene.

Disse resultatene tilsier at det er nødvendig å gjennomføre de samme testene når vanntemperaturen er atskillig høyere, og eventuelt på en lokalitet der vanngjennomstrømningen er dårlig. Lokaliteten på SalMar sitt anlegg på Frøya er med all sannsynlighet en god lokalitet også om sommeren ettersom den ligger eksponert ved kysten og med god vanngjennomstrømning.

Det ble planlagt en oppfølging av dette forsøket i september 2011 på Eggesbønes. Etter flere runder med dette anlegget måtte planene skrinlegges da de stadig så seg nødt til å ender slakteplanen grunnet at de måtte slakte PD fisk. Samme årsak var gjeldende for et anlegg på Bømlo. Begge disse anleggene har slaktet PD fisk hele høsten 2011.

2.4 Utvikle system for hurtig vurdering av skader på gjeller, finner og skinn

Formålet med denne arbeidspakken var å finne en rask metode for å detektere skader og som kunne implementeres i kommersiell skala.

2.4.1 Farge fisk ved hjelp av "fast green"

"Fast green" er en fargemetode der skadene på fisken blir farget grønn. Metoden går ut på at den avlivete fisken blir dyppet i 0,1 % FCF (metode utviklet ved Western Fisheries Research Centre, Washington) i ett minutt. Deretter blir fisken rensset i rent vann i ett minutt (Figur 42).



Figur 42 Fisk farget med "fast green". Fisken på dette bildet er tatt fra et tidligere forsøk ved Nofima.

2.4.1.1 Evaluering

Farge med "fast green" var den eneste metoden som ble evaluert i dette prosjektet. Tidligere erfaringer både ved Nofima og HI sier at dette er en tungvint og tidkrevende metode som ikke gir nevneverdige bedre opplysninger om skader på fisken enn ved tradisjonell visuell evaluering.

2.5 Finne hvordan fisk påvirkes av undertrykk

Under vakuumpumping av fisk er det observert blod i pumpevann fra fisk som blør fra gjellene og andre skader. For å undersøke om dette skyldes vakuum ble det nødvendig å isolere vakuum fra resten av pumpeprosessen. Dette delmålet ble delt i to hoveddeler. I den første delen som ble utført ved HI avd. Matre, ble effekter av vakuum undersøkt på bedøvd fisk. Resultatene fra dette forsøket gjorde at det ble interessant å gjennomføre en del to der effekter av vakuum på ubedøvd fisk ble undersøkt. Det var et mål å teste undertrykk som har kommersiell relevans. Typisk eksempel er Tauranga der trykkprofilen ligger mellom 0,5 – 0,7 bar. Lavere trykk (ned mot 0,3) bar er imidlertid ikke uvanlig.

2.5.1 Bedøvd laks eksponert for vakuum (Matre, februar 2010)

2.5.1.1 Metode

For å undersøke effekt av vakuum alene som mulig forklaring på observert blod i pumpevann ble det i februar 2010 gjennomført en pilotstudie ved Matre Havbruksstasjon, Havforskningsinstituttet i Bergen. Bakgrunnsdata på vakuumeksponering ble samlet inn under andre forsøk i forkant på Marine Harvest sitt slakteri og på brønnbåten Tauranga på Hjelmeland Ryfylke. Max vakuum observert her var 0,58 bar, mens snitt av minimumsverdier var på 0,64 bar. Maks varighet i vakuum var ca. 30 sekunder, mens de fleste sekvensene var rundt 10 sekunder. I tillegg er det målt verdier ned mot 0,3 bar og 20 sekunder på andre

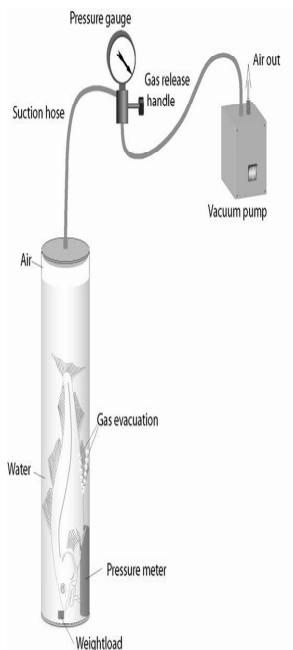
anlegg (ref. til Skjervøy resultater). Se figur 23 for generell beskrivelse av pumpesekvens. Siden både oppholdstid i vakuum og trykkvariasjon forekommer ble effekt av vakuum undersøkt i 6 ulike regimer som var ment å dekke alt fra svært lav vakuum eksponering til mer enn normalt forekommende i industrien.

En og en fisk (lengde 60,5 cm +/- 2,3SD) ble bedøvd i MS 222 og utsatt for enten:

- 0,3 bar i ½ og 1 minutt = høy dose.
- 0,5 bar i ½ og 1 minutt = normal/medium dose.
- 0,7 bar i ½ og 1 minutt = lav dose.
- 1 bar i 1 minutt = kontroll håndtering, bedøvd og satt i sylinter uten å endre trykk.
- Ingen behandling = referanse som kun ble bedøvd og overført til oppfølgingskar.

Hver gruppe bestod av 10 fisk, totalt ble 60 fisk utsatt for vakuum (Figur 43) og 20 fisk fungerte som kontroll/referanse fisk. Under vakuum ble det kontrollert for blod i vann ved hjelp av visuell inspeksjon gjennom sylinter og prøver før og etter ved hjelp av blodstrips (Multistix). Disse stripsene ble først kalibrert mot standardløsninger av blod i vann. Etter eksponering ble hver fisk floytagget og satt i ett 5 meter kar for oppfølging i 6 uker.

Fem fisker ble i tillegg eksponert for høy dose (ett minutt i vakuum på 0,3 bar) for så å bli avlivet med overdose MS 222. Disse fiskene ble blodtappet ved å kutte gjellebuene og lagt i rennende vann i ca. 40 minutter før de ble dissekert og grovt undersøkt for makroskopiske blødninger og/eller skader på indre organer og i filet.



Figur 43 En spesialtilpasset vakuumsylinder.

En spesialtilpasset vakuumsylinder ble bygget for å kunne eksponere fisk for vakuum. Trykket kunne avleses under eksponering fra måler, samt en trykklogger plassert inne i sylinder ble brukt for å kontrollere faktisk trykk i ettertid. Ved oppnådd vakuum ble ventil stengt og pumpen slått av og eksponeringstid lagt til tiden det tok for å fjerne ønsket mengde gass fra sylinder (ca. 40 sek ekstra for 0,3 bar, 30 sek til 0,5 bar og 20 sek til 0,3 bar). Ved endt eksponeringstid ble ventil åpnet slik at lokk kunne fjernes og fisk tas ut.

2.5.1.2 Resultat og diskusjon

Det ble ikke påvist blod i vann hverken visuelt eller ved hjelp av multistix for noen av eksponeringsgruppene eller referanse/kontrollgruppene. Både under kalibrering av strips og pipettering av blod i sylinder var godt synlig og man kan derfor med stor sikkerhet si at ingen fisk blødde under eksponering. Fisken var veldig rolig under eksponering og i de fleste tilfeller var det kun observert pustebevegelser. På grunn av utforming av vakuumtank var det nødvendig å bedøve laksen for å unngå panikkadferd hvor den lett kunne skade seg. Fysiologiske mål ble derfor heller ikke tatt av fisken som følge av sannsynlig maskering forårsaket av bedøvelse. Bedøvelse gjorde likevel at effekt av vakuum kunne studeres alene. Blod eller skader på indreorganer ble ikke påvist under disseksjon. Det er verdt å merke seg at antallet fisk undersøkt er lavt og omfanget av disseksjon kun var basert på grov makroskopisk overflatisk bedømmelse (ble ikke dissekert i organene). Etter eksponering våknet all fisk fra bedøvelse og startet å svømme etter 1-4 minutt etter innsetting i oppfølgingskar. Det ble ikke observert noen tegn til avvik fra normal adferd observert i kontroll/referansegruppene. All laks begynte etter kort tid å oppta stimadferd lik den som kunne observeres fra identisk tank ved siden av hvor fisk ble tatt fra til eksponeringsstudien. Det ble ikke observert dødelighet i de tre påfølgende ukene.

Vi konkluderer med at vakuuum i seg selv trolig ikke kan forklare blod og skader observert under pumping og at kun subletale effekter er sannsynlig etter vakuumeksponering isolert sett. På grunnlag av denne pilotstudien ble det gjennomført en oppfølgingsstudie på frittstående laks for også å kunne studere adferdsendringer som følge av vakuuum og kunne undersøke stressfysiologi.

2.5.2 Ubedøvd laks eksponert for vakuuum (Averøy, november 2011)

2.5.2.1 Metode

Vakuuumtestingen ble utført på Nofima sin forskningsstasjon på Averøy uke 46 – 2011. Vanntemperatur i den aktuelle perioden var 9,4 – 9,6 °C. Vakuuumtanken (Figur 44) ble produsert av HI i Bergen og transportert fra Bergen til Averøy.

Totalt ble 100 laks (gjennomsnittlig vekt = 1024 gram ± 241 gram) brukt. Omtrent en uke før forsøket ble fisken plassert i en liten merd så langt nære prøveområdet som mulig. Samme morgen som uttestingen foregikk ble 50 fisk transportert med truck fra merden til et plastkar med kontinuerlig vanngjennomstrømming, plassert helt i nærheten av vakuuumtanken.



Figur 44 Vakuuumtank for uttesting av vakuuum på ubedøvd laks. Inngangen er øverst.

Forsøkene gikk over to dager.

Dag 1: Fysiologisk stress og atferd:

Uttesting av en og en fisk fordelt på 5 grupper:

- Ingen behandling = referanse (N=10) – gjelder ikke atferdsregistreringer ettersom disse fiskene ikke ble satt i vakuuumtanken, men tatt direkte fra plasttanken
- Kontroll: fisk ned i vakuuumtank uten vakuuum (N=10)
- 0,3 bar i 1 minutt (N=10)
- 0,5 bar i 1 minutt (N=10)
- 0,7 bar i 1minutt (N=10)

En etter en ble fisk plassert i vakuuumtanken. Fisken ble akklimatisert 5 minutter før vakuuum ble slått på og fisken ble vakuumeksponert i ett minutt. Rekkefølgen for eksponering ble randomisert for å minimere effekten av tid. Etter vakuumeksponering ble fisken håvet opp og avlivet med slag. Følgende prøver ble tatt av fisken:

- Vekt og lengde
- Blodprøver
- Håndmålere av laktat og glukose
- pH muskel
- Blodprøve for i-STAT-målinger
- Plasma for laboratoriemålinger av kortisol, laktat og glukose (blodprøvene ble sentrifugert i 10 minutter ved 3000 omr)

Afterdsregistreringer – all fisk i vakuumbanken ble filmet. Filmen ble analysert for

- Svømmetid per minutt
- Om fisken slapp luft
- Ventilasjonsfrekvens

Dag 2: Makroskopiske skader:

Uttesting av grupper på fem fisk fordelt på 5 grupper:

- Ingen behandling = referanse (N=10)
- Kontroll: fisk ned i vakuumbank uten vakuumbank (N=10)
- 0,3 bar i 1 minutt (N=10)
- 0,5 bar i 1 minutt (N=10)
- 0,7 bar i 1minutt (N=10)

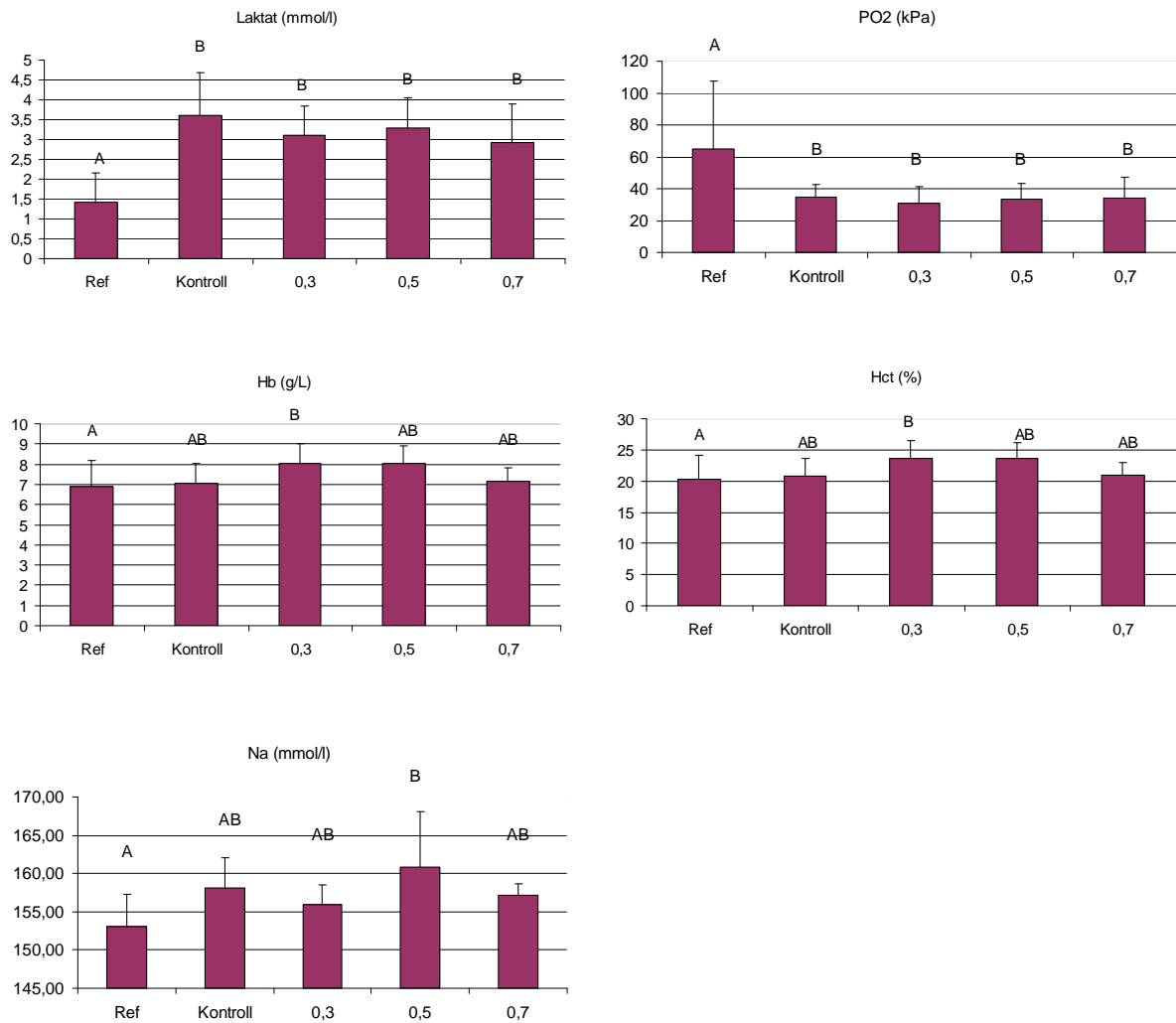
Fem fisk om gangen ble plassert i vakuumbanken. Fisken ble akklimatisert 5 minutter før vakuumbank ble slått på og fisken ble vakuumbankponert i ett minutt. Rækkefølgen for eksponering ble randomisert for å minimere effekten av tid. Etter vakuumbankponering ble fisken håvet opp og plassert i kar med en overdose bedøvelse (metacain) for avliving. Den døde fisken ble bløgget og utblødd i 45 minutter før filetering. Følgende prøver og observasjoner ble tatt av fisken:

- Observasjoner av blod i bedøvelsesbanken
- Åpning av fisk, se etter makroskopiske skader på organer, spesielt svømmeblære
- Filetering, se etter blodrester i muskel og bukside av filet
- All fisk ble fotografert

2.5.2.2 Resultat og diskusjon

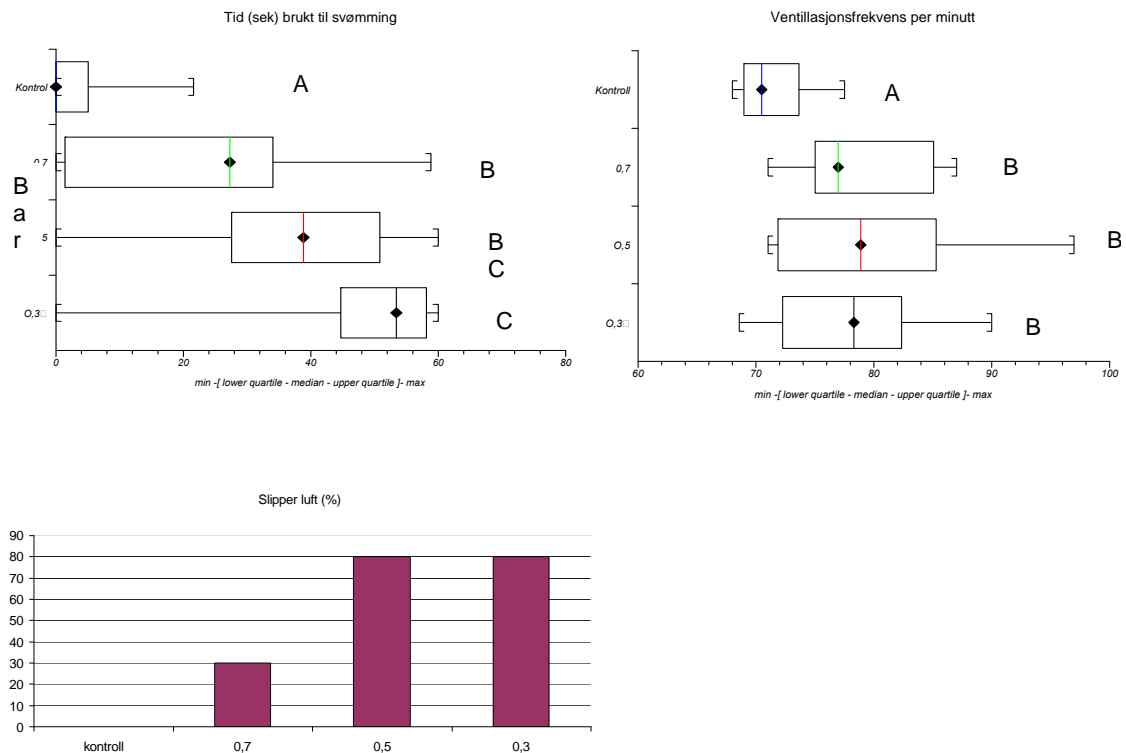
Dag 1: Fysiologisk stress og atferd:

Plasmaprøvene ble analysert i 2012. Det var ingen avvikende resultater for laktat og glukose mellom i-STAT og plasma. For kortisol var det ingen forskjeller mellom gruppene. Glukose, pH muskel, kalium og iCa viste ingen forskjeller mellom noen av gruppene.



Figur 45 Blodverdier på vakuumentestet fisk. Laktat ble testet både fra i-STAT og plasma, men viste like verdier.

Laktat og pO₂ viste en klar vakuumentankeeffekt men uten at vakuum virket inn på disse (Figur 45), ingen av verdiene var derimot høye. Hemoglobin og hematokritt var høyere hos 0,3 bar fisken, og tyder på at denne fisken har sluppet mye luft. Na viser at ionebalansen i vakuumentestet fisk er noe forstyrret. Ser man på atferden (Figur 46) vil alle vakuumentestinger gi fisk som slipper luft, men det er tydelig å se på videoopptakene at 0,3 bar fisken slipper mer luft enn 0,5 bar fisken, selv om det er like mange som slipper luft.



Figur 46 Atferd hos vakuumbehandlet fisk.

Svømmetiden øker med vakuumbelastningen ved at 0,3 bar fisken svømte mer enn de andre fiskene (Figur 46). Dette ga seg også utslag i ventilasjonsfrekvensen som var raskere for vakuumeksponert fisk. Den økte aktiviteten forklarer økt Hb og Hct.

Dag 2: Makroskopiske skader:

Det ble ikke observert noe blod i bedøvelseskaret etter vakuumbehandlingen for noen av behandlingene. Videre ble det ikke observert skader på organer, muskel eller på innsiden av buken (Figur 47).



Figur 47 All fisk ble fotografert. Øverste rekker er referansefisk mens nedre rekke viser fisk eksponert for 0,3 bar. Ingen skader som kunne forårsake blødninger ble registrert.

2.5.3 Workshop Gardermoen 15. mars 2012

Med bakgrunn i resultatene som prosjektet oppnådde på effekter av vakuum ble det arrangert en Workshop på Gardermoen 15. mars 2012, der deltakere fra oppdrettsnæring, pumpeprodusenter og forskere diskuterte FoU behov innen vakuumproblematikk. Fra oppdrettsnæringen deltok Marine Harvest og Lerøy Aurora, mens pumpeprodusentene var representert med deltakere fra Cflow og Stranda Prolog.

Resultatene fra workshopen med prioriterte videre arbeidsoppgaver vil bli oppsummert i et skriv som vil bli overlevert til FHF. Vi anser resultatene fra workshopen til ikke å være en del av prosjektet "Pumping av torsk og laks – faktorer som påvirker velferd og kvalitet" og gjengir dem derfor ikke her.

2.6 Utforme protokoll og foreslå grenseverdier for god/dårlig velferd

Prosjektet har utformet en protokoll for evaluering av kvalitet og velferd ut fra fysiologisk stress, atferd og morfologi. Protokollen inneholder tabeller med resultater fra prosjektet "Pumping av torsk og laks – faktorer som påvirker velferd og kvalitet". I tillegg inneholder den en omfattende litteraturoversikt over studier som omfatter stress på ulike arter, og som blir brukt som referanse til resultatene prosjektet har bidratt med. Protokollen legges i sin helhet ved denne rapporten som vedlegg 1.

2.7 Etablere samarbeid med Thelma as med mål å utvikle nye fiskemerker som kan kvantifisere hvor mye aktivitet (akselerasjoner) fisk utsettes for under pumping

Akselerometer ble testet ut på død fisk i en av aktivitetene under det første delmål. Det henvises til kapittel 2.2.2. for omtale av dette.

2.7.1 Hensikt

Utvikle elektroniske fiskemerker (små datamaskiner som plasseres i eller på enkeltfisk) som gir objektive mål for belastningen fiskene utsettes for ved trenging og pumping. Skal brukes til å kvantifisere belastning på fisk for evaluering av skånsomhet (fiskevelferd og produktkvalitet) ved ulike pumpeteknologier og operasjonelle prosedyrer.

2.7.2 Aktiviteter

Teknologi- og prosjektsamarbeid. Aktuell teknologi er primært vurdert å være spesialtilpassede 3-dimensjonale akselerometermerker som også tåler bruk i sjøvann. Dette innebærer da enten merker som kontinuerlig eller regelmessig sender data til en mottaker i form av ultralyd (= akustiske tags) eller som lagrer data i selve merket for senere gjenfangst og nedlasting (= DSTs, «data storage tags» / datalagrings-merker). For akustiske merker er det etablert og videreført samarbeid med Thelma Biotel AS, Trondheim, inklusive videreutvikling og uttesting av respirasjonsmerker (diffensialtrykk; SmartTags), dybdemerker (absolutt trykk) og 3-dimensjonale akselerasjonsmerker (3Dacc-merker). Nofima har videre også vurdert datalagrings-merker fra flere ulike teknologileverandører, og gjennomført uttesting av et akselerometermerke fra Cefas Technology Limited (CTL), Lowestoft, UK.

Akustiske merker og samarbeid med Thelma Biotel AS. For akustiske akselerasjonsmerker er det gjennomført uttesting av en tilpasset variant av Thelma Biotels 3Dacc-merke. I fase 1 av dette arbeidet ble 3Dacc merker testet på laksesmolt (80 – 150 g). Algoritmer for lateral akselerasjon (mål for haleslagsrate) og for 3-dimensjonal total akselerasjon var basert på tidligere forsøk på laks i merd. Resultat av fase 1 var at merkene og algoritmene ble vurdert å fungere hensiktsmessig. Det ble videre gjennomført en fase 2 med kort eksperimentell evaluering av merkene og algoritmene på laks i svømmetunnel og merd, der merkene og deres algoritmer ble vurdert som tilfredsstillende for videreføring. Dette ble gjort i en fase 3 sommeren 2011, bestående av to måneders fullt eksperiment på laks utsatt for ulike vannkvaliteter (resultatene fra fase 3 er fortsatt under bearbeidelse). Videre gjøres det arbeid for å utvikle og teste ny og forbedret mottakerteknologi for akustiske merker.

Datalagringsmerker og samarbeid med Cefas Technology Ltd. Vedrørende (ikke-akustiske) datalagrings merker (DSTs) for måling av akselerasjonsbelastning ved trenging og pumping er det gjennomført uttesting av standard akselerometermerke fra CTL. Resultatet fra disse undersøkelsene viste at CTL's standard akselerometer-merke er altfor sensitivt og ikke tilfredsstillende tilpasset bruk i slike studier. Andre eksisterende akselerometermerker med intern datalagring fra andre teknologileverandører (f.eks. StarOddi, Vemco, Lotek) er også vurdert basert på deres oppgitte tekniske spesifikasjoner, men disse ble heller ikke vurdert som egnet. Vi er imidlertid i dialog med CTLs utviklingsavdeling i England, og vurderer CTL

som en lovende samarbeidspartner for utvikling av en spesialtilpasset akselerometer-DST for evaluering av fiskevelferd og produktkvalitet ved pumping av fisk.

2.7.3 Konklusjon

Thelma Biotel sin ekspertise ligger i akustiske merker, og deres 3Dacc merke har algoritmer og tekniske spesifikasjoner som synes lovende for videreutvikling og bruk ved undersøkelse av trenging og pumping av torsk og laks. Utfra erfaringene så langt vurderes likevel akustisk teknologi totalt sett som mindre egnet for bruk ved pumping utfra en vurdering av akustiske sende- og mottaker forhold i selve pumpeprosessen. Isteden anbefales utvikling av et spesialtilpasset akselerometer-datalagringsmerke (DST), og CTL i England synes da mest lovende. Hvis mulig bør man dra nytte av eksisterende teknologikunnskap fra Thelma Biotels akustiske 3Dacc merke i en slik utvikling.

3 Arbeidspakke 2: Mammut – skånsom metode for flytting av levende fisk

3.1 Bakgrunn Start her

Luftpumpe, air-lift eller mammut er alle navn på en type pumpe som bruker luft som drivmiddel og i havbruksnæringen best kjent fra firmaet «Lift-up» som bruker teknologien til å fjerne overskudd av fôr og død fisk. Pumpen baserer seg på injeksjon av trykkluft i et rør noen meter under havflaten. Vannet i røret over injeksjonsstedet får mindre tetthet og nivået inne i røret stiger over havflaten (Arkimedes). Luftboblene ekspanderer mot overflaten og "drar" vannet med seg.

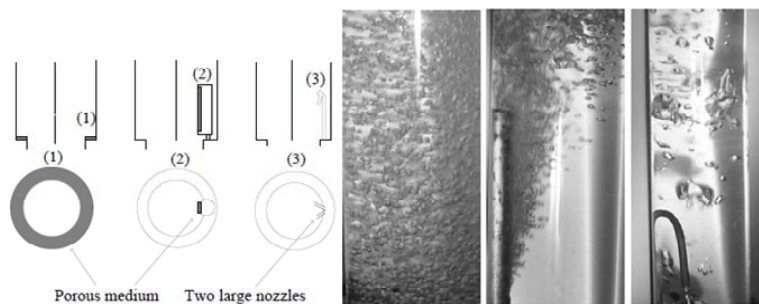
Air-lift teknologien er gammel og var frem til 1980-årene svært populær i havbruksnæringen. Den ble særlig benyttet til pumping i forbindelse med sortering. Krav til økt effektivitet, store brønnbåter og større løftehøyder gjorde at hele den norske havbruksnæringen gikk over til vakuumpumper (og senere også lavtrykkspumper og hevert-systemer på brønnbåtene). Imidlertid fortsatte man å bruke mammut-teknologien på steder som Tasmania og Canada der slakterienhetene er mindre. For bedriftene som slakter direkte fra oppdrettsmerdene (jfr. Dead-haul"-prosjektet ved Marine Harvest, region sør (Midling m.fl. 2008)) er viktigheten av skånsomhet stor ettersom lang transporttid (opptil 20 timer) øker behovet for sen inntredelse av *rigor mortis* som er en nødvendighet for å unngå feilskjæring i stiv fisk. Denne delen av prosjektet skal utvikle teknologien videre og hadde følgende to delmål:

3.2 Delmålene for arbeidspakk 2

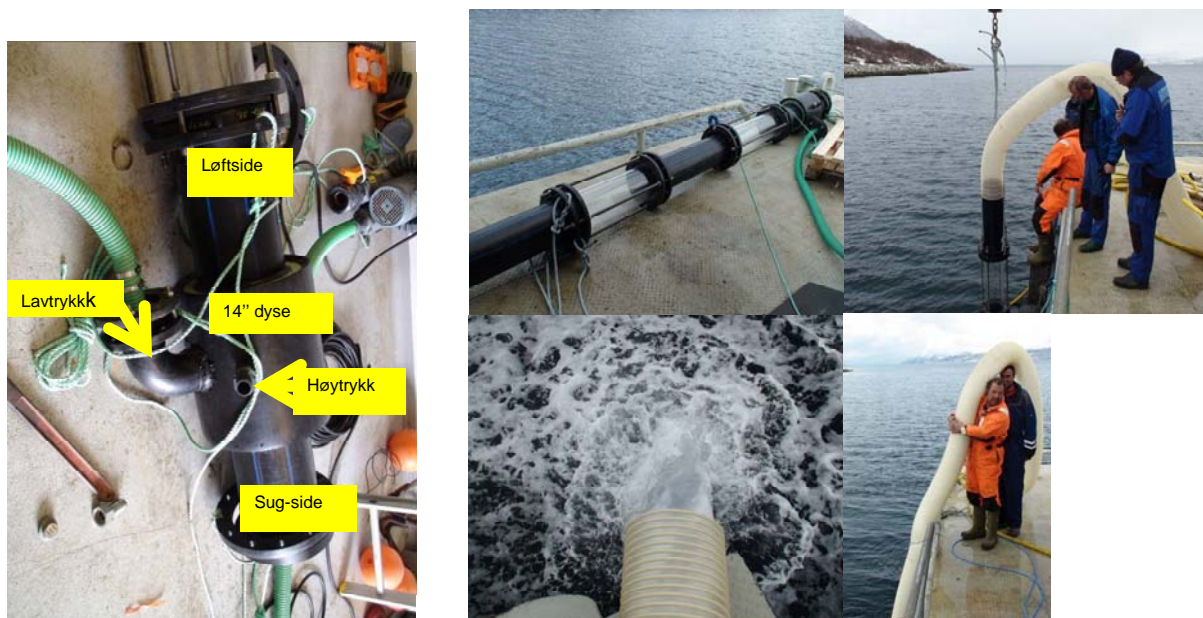
- a) Utvikle og dokumentere mammutpumpe
- b) Teste mammutpumpe ved flytting av fisk

Injeksjonsdyse

For å utnytte luften best mulig er det sentralt at luft/vann blir blandet best mulig og på en effektiv måte. Viktige sammenhenger her vil være: injeksjonsdyp, rørdiameter, luftmengde og løftehøyde. Å etablere slike sammenhenger er derfor et viktig mål for denne delen av prosjektet. Olje og gassnæringen bruker imidlertid air-lift aktivt (Gas-lift Technique) og det foreligger data på de fleste av disse sammenhengene (Guet, 2004) som i prinsippet er identiske til air-lift i fiskeri- og havbruksnæringen (Figur 48).



Figur 48 Effekt av ulike dyser (porøst medium t.v. eller store enkelt-dyser t.h.) fra Guet, 2004.



Figur 49 Uttesting av dyse i forhold til innløsnings effekt.

Det er produsert en egen dyse til mammut-pumpe i prosjektet, tilpasset 10" rørdimensjon. Den består av et 50 cm langt 14" rør montert på utsiden av 10"-røret. 14"-røret er tettet i begge ender inn mot 10"-røret. På forhånd er det boret mer enn 3000 hull (å 3 millimeter) gjennom 10"-røret som luften skal passere gjennom.

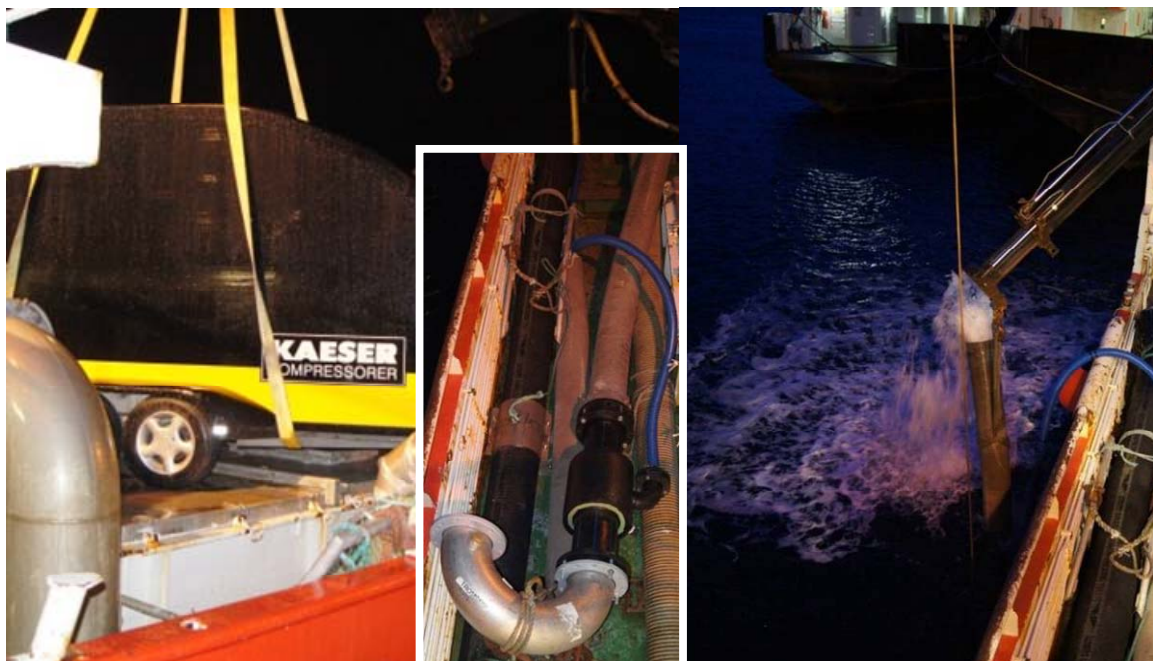
Det er montert både lav- og høytrykk-koblinger på 14"-røret (hhv. 1,5" og 3") for kompressor eller blåser.

Det er gjennomført tre funksjonstester av mammut-pumpen hvor vi prøver å finne rett luftmengde og-trykk. Figur 49 er fra Havbruksstasjonen i Tromsø (Sjøanlegget) hvor vi sjekker dysen i forhold til innløsnings effektivitet (champagne plexi-glass).

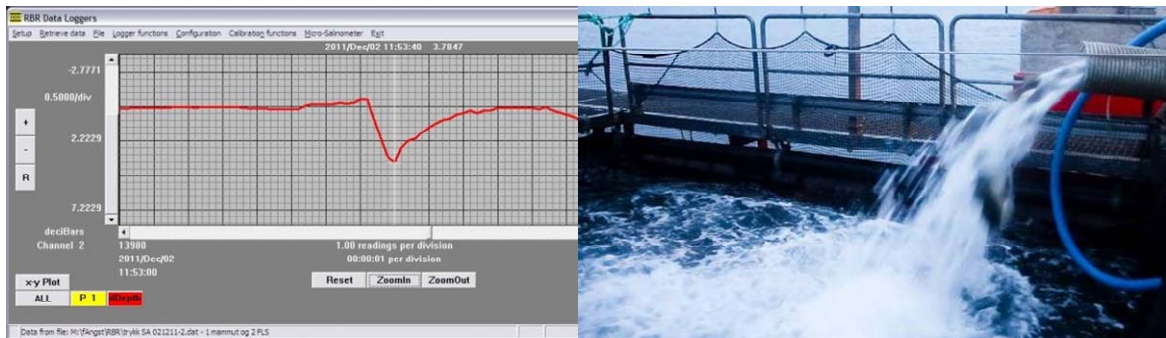
Med et injeksjons-dyp på fem meter, greide denne pumpen å løfte vann litt over fire meter over havflaten. Vi brukte her kompressoren fra Lift-up.

Den ideelle blanding av luft og vann beskrives som "Champagne-effekt", en homogen blanding med stor effekt. Tilsettes mer luft vil det oppstå peristaltiske pulser og røret vil ha områder med bare vann eller bare luft. Økes luftmengden ytterligere vil det oppstå en "jet-strøm" midt i røret med vann i preferien.

Skrukompresor og blåser ble testet om bord på M/K Kloegga (Figur 50). Utstyret var utlånt av Kaeser Norge og var montert inne i en egen tilhenger (t.v.). Det ble gjennomført funksjonstester ved kai i Tromsø og dysa er her montert på rør og 180-graders bend for bruk om bord i fiskebåt (midten). Skrukompresoren var for liten og svak, men blåseren fungerte relativt godt som bildet til høyre viser. «Vår» blåser hadde maksimalt trykk på 370 mbar og leverte da ca. 4 m³ per minutt. Til sammenligning opererer prosessfartøylene i Canada med kompressorer med 830 mbar og 12 m³ per minutt. I fiskerisammenheng (snurrevad) vil man ikke trenge så høyt trykk, men løse inn luften på maksimalt seks meters dyp. Vi trenger imidlertid noe mer luft og ønsker å teste dette i fullskala med minst 600 mbar og 6 m³ per minutt.



Figur 50 Bilder fra forsøk med skrukompresor og blåser om bord på M/K Kloegga.



Figur 51 Trykkprofilen i mammutpumpen ble målt (t.v.) og pumpen testet ved å pumpe torsk i merd (t.h.).

3.3 Videre fremdrift

Denne mammutpumpen er planlagt testet i forbindelse med FHF's teknologiprojekt innen fangstbasert akvakultur i 2012. Med en mer skånsom lasteteknologi kan overlevelse i fangstbasert akvakultur bli enda høyere, og fisk som tåler lite behandling (hyse og loddetorsk) kan tas ombord med mindre klemskader.

4 Oppsummering

4.1 Arbeidspakke 1

Slakteriene skiller seg fra hverandre i hvilke deler som stresser fisken og hvilke deler som ikke stresser like mye. Dette avhenger mye av hvilket utstyr de bruker, og hvordan de bruker det. På Skjervøy viser våre resultater at bortsett fra kort pre-rigortid og lav muskel pH er pumpingen sannsynligvis mindre stressende enn trengingen. En årsak til dette kan være at fisken blir avlivet med slag, og for at denne prosessen skal gå optimalt må fisken være rolig og riktig plassert før de ankommer slagmaskinene. Til dette bruker de "atferdskamrene". I tillegg står pumpa på kai, dvs. lav pumpehøyde. Mange har kommet langt med å innføre skånsom pumping. Ventemerdd kan være en begrensende faktor

Dette betyr at pumping er uheldig for kvalitet mens skal man bevare fisken sin velferd bør det gjøres endringer med trengingspraksisen.

Videre forsøk i denne arbeidspakken viste at vakuum i seg selv ikke kan forklare blødninger som av og til observeres i vakuumentanken. I et første forsøk ble bedøvd fisk eksponert for 0,3; 0,5 og 0,7 bar. Det ble ikke observert ytre eller indre skader. Atferd var normal etter oppvåking og ingen fisk døde etter behandlingen. I et andre forsøk med ubedøvd fisk og eksponering for de samme bar-verdiene som for ubedøvd fisk ble det heller ikke notert makroskopiske skader. Derimot gjorde vakuum at fisken slapp luft og viste økt svømmeaktivitet. Den økte aktiviteten kan, i kommersiell skala der det er mange fisk og ikke bare en som i dette forsøket, gjøre at fisk kolliderer mer med hverandre og vegger/skarpe kanter, som igjen kan skade fisken. Videre forsøk ønsker å avdekke hva som skal til av slag for at fisken skal begynne å blø.

Manipulering av pumpehøyde og gjentatt pumping påviste en klar effekt av pumping isolert, og en delvis effekt av gjentatt pumping (akkumulert stress). Sannsynligvis hadde vi en effekt av pumpehøyde, men høydeforskjell mellom flo og fjære var for små til å få overbevisende forskjeller.

Vi undersøkte effekten av oksygenering av ventemerdd under trenging ved hjelp av oksygeneringsenheten NetOx. På lokaliteten til SalMar på Frøya var imidlertid forholdene så gode at oksygenering ikke var nødvendig i utgangspunktet. Under trenging droppet oksygen i vannet til ca. 60 %, mens den holdes stabil dersom oksygen tilsettes. Men ettersom O₂ droppen skjer kun i en kort periode ser det ikke ut til å skade fisken. Ekstra oksygen er ikke nødvendigvis positivt for fisken selv om oksygenivåene i vann holdes stabile under trenging. Under forhold der fisken ellers er i mindre god kondisjon (som under hektisk transport) vil trenging, uten oksygenering påvirke fisken negativt.

I det følgende skal vi se nærmere på verdiene til de vanligste målte fysiologiske variablene (kortisol, laktat, glukose, pH muskel og blod, Hct og inntredelse av *rigor mortis*).

Kortisol

I vårt dose/responsforsøk på Sunndalsøra resulterte 5 minutter med omrøring i karet i 550 nmol/l kortisol mens gjentatt pumping under kontrollert forhold på Averøy resulterte i 500 nmol/l kortisol. Disse verdiene er ikke høye i sammenligning med Espmark (2004; trenging av laks = 603 nmol/l), Iversen et al. (1998; transport laks = 500 nmol/l), Skjervold et al. (1999; trenging laks = 936 nmol/l), Veiseth et al. (2006; trenging laks = 1000 nmol/l)

Laktat

I vårt dose/responsforsøk på Sunndalsøra resulterte trenging tilsvarende en tetthet på 400 kg/m³ i et laktatnivå på 8,5 mmol/l. Kommersiell trenging på Skjervøy resulterte i 7,5 mmol/l, pumping isolert på Averøy 4-5 mmol/ mens vakuum i seg selv kun resulterte i 3,5 mmol/l laktat. Til sammenligning viste Espmark (2004) at trenging av laks i kommersiell skala ga laktatnivåer på 6,3 mmol/l, mens Iversen et al. (2005) viste at transport av laks resulterte i laktatnivåer på 9 mmol/l.

Glukose

I vårt dose/responsforsøk på Sunndalsøra resulterte 5 minutter med omrøring i karet i 5,5 mmol/l glukose mens gjentatt pumping og pumpehøyde under kontrollerte forhold på Averøy også resulterte i 5,5 mmol/l glukose. Pumping og trenging i kommersiell skala på Lerøy Aurora resulterte i glukosenivåer på 4,5 mmol/l. Til sammenligning viste Espmark (2004) at trenging av laks i kommersiell skala resulterte i glukosenivåer på 6 mmol/l, Iversen et al. (2005) viste at transport av laks ga glukosenivåer på 9 mmol/l, mens Misimi et al. (2008) viste at håndtering av laks kan gi glukosenivåer på 8,5 mmol/l.

pH muskel

I vårt dose/responsforsøk på Sunndalsøra resulterte trenging tilsvarende en tetthet på 400 kg/m³ en pH verdi i muskel på 6,9. Trenging og pumping på Lerøy Aurora på Skjervøy resulterte i pH muskel = 6,85 mens pumpehøyde under kontrollerte forhold på Averøy ga pH verdier i muskel på 6,9. Til sammenligning viste Erikson et al. (2006) at trenging av laks resulterte i pH verdier i muskel på 6,8, mens pumping av laks ga verdier på 6,6-6,9 (Mejdell et al., 2009). Misimi et al (2008) viste at håndtering av laks resulterte i pH verdier i muskel = 7,5.

pH blod

I blod var pH noe høyere enn i muskel i våre forsøk. Trenging på Skjervøy resulterte i pH verdier på 7,05 mens pumpehøyde i kontrollerte omgivelser ga pH verdier i blod = 7,16. Til sammenligning viste Erikson et al. (2006) at trenging av laks kan gi pH verdier i blod på 6,4 mens Mejdell et al. (2009) og Merkin et al. (2008) viste at pumping ikke trenger i gi lave pH verdier i blod (henholdsvis 7,2 og 7,37).

Hct

Hematokritt øker i blodet med stress. Iversen et al. (1998) viste at under transport av laks kan Hct øke til 62 % mens Olsen et al. (2002) viste at akutt stress hos laks kunne gi Hct = 46 %. I våre forsøk fikk vi ikke like høye Hct verdier. Pumpehøyde under kontrollerte forhold ga Hct nivåer på 35 % mens vakuu isolert kun ga 27 %. Trenging i kommersiell skala på Skjervøy resulterte i Hct nivåer på 37 %.

Rigor mortis

Inntredelse av *rigor mortis* bør være så lang at fisken kan prosesseres før dette skjer. Problemene med skjærefeil kan oppstå også før fisken går i full stivhet (90°). Våre oppsummerte resultater tar uansett hensyn til når fisken er i full rigor. I våre kontrollerte forsøk på Sunndalsøra tok dette 6 timer når fisken var utsatt for høy tetthet ved trenging. Fisken som ble pumpet på Skjervøy brukte 7 timer på å nå full rigor, mens pumping under kontrollerte forhold på Averøy resulterte i 14 timer til full rigor. Til sammenligning viste Espmark (2004) at under kommersiell pumping brukte laksen 7,5 timer før den nådde 90° stivhet, Sigholt et al. (1997) viste at håndtert laks kunne gå i full rigor allerede etter 2,5 timer. Berg et al. (1997) viste at i noen tilfeller av pumping kan det gå 10 timer før fisken er i full rigor.

4.2 Arbeidspakke 2

Mammutpumpeteknologien er gammel og ble mye brukt i havbruksnæringen på 1980-tallet. Mammut-pumpen pumper fisken mer skånsomt enn vakuu i og med at det er en jevn strøm av vann og fisk uten overgangen mellom vakuu og trykk som er kjent for vakuumpumpene. Pumpen baserer seg på injeksjon av trykkluft i et rør noen meter under havflaten. Vannet i røret over injeksjonsstedet får mindre tetthet og nivået inne i røret stiger over havflaten (Arkimedes). Luftboblene ekspanderer mot overflaten og "drar" vannet med seg.

I dette prosjektet ble det laget en mammut-pumpe som med lift-up kompressor løftet vann 4 meter over havoverflaten med et injeksjonsdyp på 5 meter. Pumpa ble funksjonstestet 3 ganger for å finne rett luftmengde og -trykk, og pumpa løftet både vann og fisk på en tilfredsstillende måte. Optimalisering av pumpa skal videreføres i andre prosjekter og pumpa skal testes i fullskala.

5 Referanser

- Akse L., Midling K., Joensen S., Tobiassen T., Martinsen G. 2011. Pumping av torsk og laks. Arbeidspakke 3: Hvitfisk – effekt av pumping (Nofima rapport nr 9/2011).
- Berg T., Erikson U., Nordtvedt T.S. 1997. *Rigor mortis* assessment of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and effects of stress. Journal of Food Science 62, 439-446.
- Espmark Å.M. 2004. Behavioural and physiological indicators of stress during crowding in Atlantic salmon – and effects on *rigor mortis*. Akvaforsk report 34/2004.
- Erikson U., Hultmann L., Steen J.E. 2006. Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia. 1. Establishing a method for large-scale processing of farmed fish. Aquaculture 252, 183-198.
- Guet S., Ooms G., Oliemans R.V.A., Mudde R.F. 2004. Bubble size effect on low liquid input drift-flux parameters. Chemical Engineering Science 59, 3315-3329.
- Iversen M., Finstad B., Nilssen, K.J. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Aquaculture 168, 387-394.
- Iversen M., Eliassen R.A., Finstad B. 2009. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. Aquaculture Research 40, 233-241.
- Iversen M., Finstad, B., McKinley R.S., Eliassen R.A., Carlsen K.T., Evjen T. 2005. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts during commercial well boat transport, and effects on survival after transfer to sea. Aquaculture 243, 373-382.
- Mejdell C.M., Midling K.Ø., Erikson U., Evensen T.H., Slinde E. 2009. Evaluering av slaktesystemer for slaktefisk i 2008 – fiskevelferd og kvalitet. Veterinærinstituttet rapport nr 01-2009.
- Merkin G.V., Roth B., Gjerstad C., Dahl-Paulsen E., Nordtvedt R. 2010. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 309, 231-235
- Midling K.Ø., Mejdell C., Olsen S.H., Tobiassen T., Aas-Hansen Ø., Aas K., Harris S., Oppedal K. og Fremsteinevik Å. 2008 Slakting av oppdrettslaks på båt, direkte fra oppdrettsmerd. Nofima rapport 6/2008.
- Misimi E., Erikson U., Digre H., Skavhaug A., Mathiassen J.R. 2008. Computer vision-based evaluation of pre- and post-rigor changes in size and shape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) filets during *rigor mortis* and ice storage: Effects of perimortem handling stress. Journal of Food Science 73, E57-E68.

- Olsen R.E., Sundell K., Hansen T., Hemre G., Myklebust R., Mayhew T.M., Ringø E. 2002. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 211-221.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T.S., Seland, A. 1997. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* 62, 898-905.
- Skjervold, P.O., Fjæra, S.O., Oestby, P.B. 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture* 175, 93-101.
- Veiseth, E., Fjæra, S.O., Bjerkeng, B., Skjervold, P.O., 2006. Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology, B.* 144, 351-358.

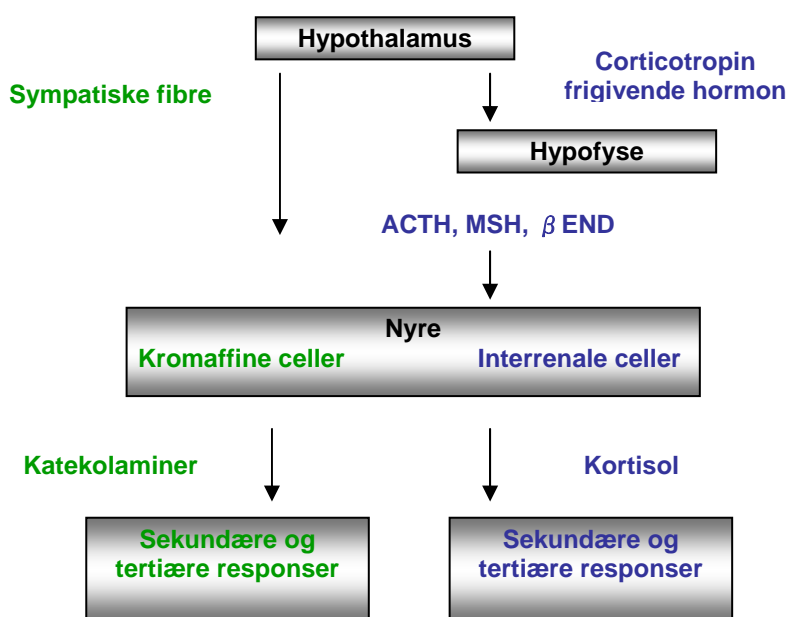
Protokoll for å evaluere fiskevelferd og kvalitet under slakteprosessen

1 Bakgrunn for protokoll og beskrivelse av data

Følgende protokoll utgjør delmål 5 "Utforme protokoll og foreslå grenseverdier for god/dårlig velferd" i arbeidspakke 1 "pumping av levende fisk" i FHF-prosjektet "Pumping av torsk og laks: faktorer som påvirker velferd og kvalitet. Protokollen presenterer en oversikt over anbefalte grenseverdier for fysiologiske testvariable som indikerer god velferd og kvalitet for slakteferdig oppdrettsfisk. Oversikten består videre av referanser til eksisterende publisert litteratur og av aktiviteter utført gjennom prosjektet.

Velferd- og kvalitetsvariable – basisinformasjon

For å få en forståelse av egnetheten til ulike målevariable er det nødvendig med litt basiskunnskap om deres fysiologiske virkemåte.



Figur 1 Den primære stressrespons (Hypothalamus – hypofyse – interrenal aksen).

For det første er det viktig å skille mellom kronisk og akutt stress. Stress er i utgangspunktet en nødvendig strategi som dyr bruker for å forsvare seg mot spesielle forhold i miljøet, eks konkurranse og fare for angrep fra rovdyr. Som regel er dette forhold som forsvinner etter en tid og betegnes som akutt stress. Men i oppdrett vil det forekomme tilstander som fisken ikke er i stand til å unnsnippe, eks dårlig vannkvalitet, suboptimale tettheter, håndtering osv. Slike typer stressfaktorer vil med tiden forårsake kronisk stress som er skadelig for velferd og kvalitet.

Figur 1 viser en skjematisk framstilling av stressrespons hos fisk. I nyrenes hoderegion sitter kromaffine celler og interrenale celler som ved stress skiller ut henholdsvis katekolaminer (hovedsakelig adrenalin og noradrenalin) og kortisol. Fisk har ikke binyrebark som pattedyr, men de interrenale celler er trodd å ha en analog funksjon hos fisk. For å måle primær stressrespons er det mest vanlig å måle kortisol i blodplasma. Måling av adrenalin har vist seg å være uhensiktsmessig ettersom det er vanskelig å bestemme et hvilenivå da utskillelsen skjer svært raskt etter små stresspåvirkninger. Måling av kortisol har da vist seg mer nøyaktig. Imidlertid er også kortisol vanskelig å måle ettersom nivåene hever seg raskt etter håndtering, som håving. Erfaringer fra Nofima tilsier at for å måle stress hos fisk er det mer hensiktsmessig å måle sekundære stressresponser, så som glukose og laktat, og pH i blod og muskel. Stress og høy aktivitet fører til aktivering av glykogen fra lever og muskel som omdannes til glukose under aerobe prosesser og laktat under anaerobe prosesser. Anaerob aktivitet hos fisk er ofte et tegn på utmattelse ettersom musklene da jobber uten oksygen. Utskillelsen av laktat gjør at vi kan måle lave pH verdier i muskel. Stress fører også til syre-base ubalanse og metabolsk stress. Dette måles ut fra en rekke variable som vil bli vist senere i protokollen.

Etter at fisken er død vil den gå inn i *rigor mortis*, og inntredelsen av denne går raskere dersom fisken har vært stresset før den døde, og energireservene i muskelen er brukt opp.

I det følgende vil verdier av stressvariable bli presentert i form av allerede publiserte resultater og prosjektrelaterte aktiviteter. Tolkning av og kommentarer til resultatene blir tatt fortløpende.

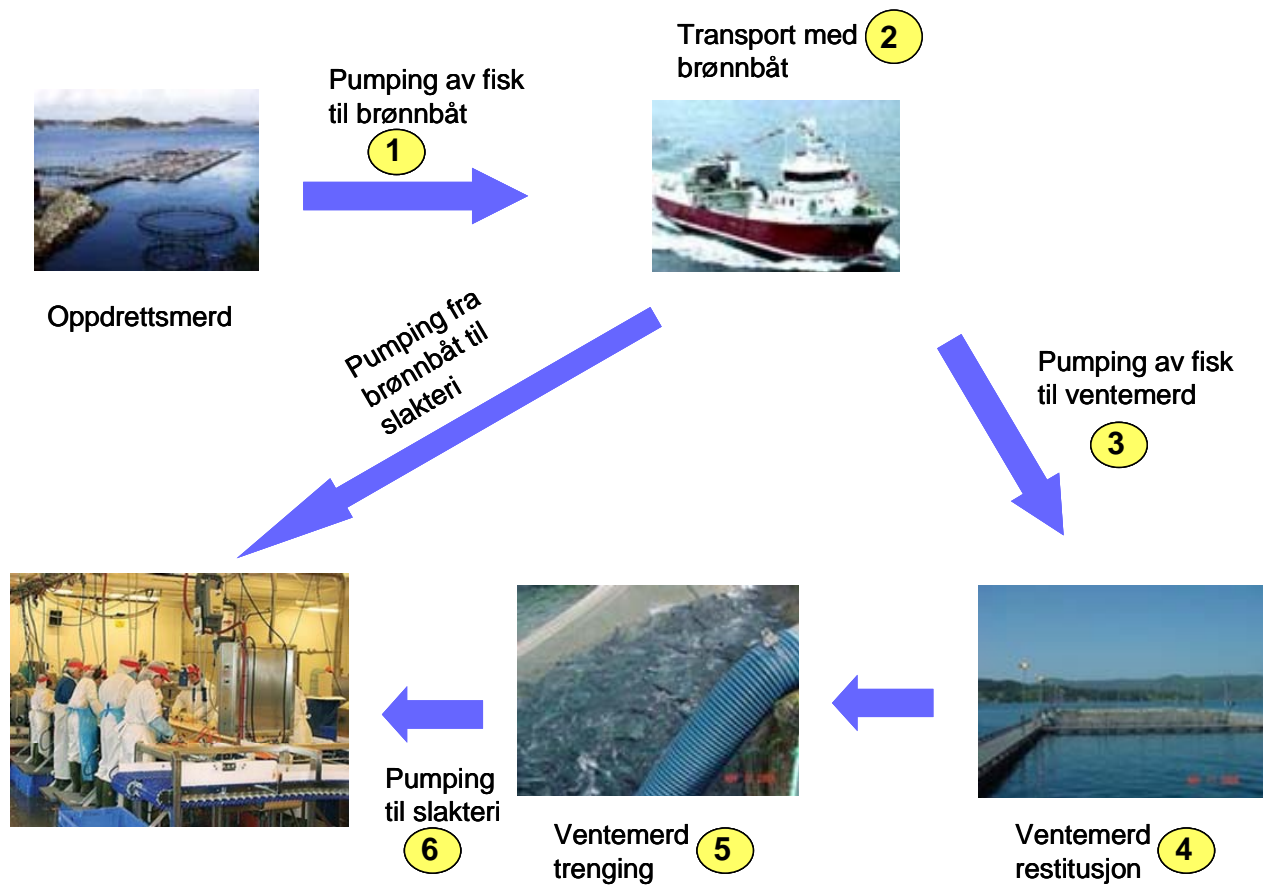
Hvordan kan protokollen brukes?

Protokollen består av en skjematisk framstilling av flyten i en slakteprosess. De angitte verdiene i skjema indikerer anbefalt grenseverdi for den aktuelle del av prosessen. Grenseverdiene er hentet fra litteratur og eksperimentelle forsøk utført i dette og andre prosjekter. Det er kun listet opp de mest vanlig brukte variablene. Protokollen er oppbygd på følgende måte:

1. Skjematisk framstilling over prosessflyt slaktning med anbefalte grenseverdier.
2. Grenseverdier fra referert litteratur
3. Dose/respons forsøk utført i prosjektet som referanse.
4. Grenseverdier fra andre prosjektaktiviteter og kommersiell oppdrett

2 Skjematisk framstilling over prosessflyt under slakte-prosessen med anbefalte grenseverdier

Prosessflyt



Figur 2 Skjematisk framstilling av transport av laks fra oppdrettsmerd til slakteri. Tabell 1 viser grenseverdiene for de ulike målestasjonene.

Anbefalte grenseverdier for målepunkter i figur 2

Tabell 1 Anbefalte grenseverdier for ulike steder i slakteprosessen. For målepunktene refereres til figur 2.

Målepunkt	Grenseverdier			
	pH muskel	Laktat (mmol/l)	Glukose (mmol/l)	Atferd
1. Pumping av fisk til brønnbåt fra oppdrettsmerd	<6,9	4-5	4-5	N/A
2. Transport med brønnbåt	<6,9	4-5	4-5	N/A
3. Pumping fra brønnbåt til ventemerd	<6,9	4-5	4-5	N/A
4. Ventemerd restitusjon (utrenget)	<6,9	4-5	4-5	Normal svømmeatferd
5. Ventemerd trenging*	<6,7	6-7	5-6	Ingen luftsnapping. Vær var på finner i overflaten og at fisken ligger på siden
6. Pumping til slakteri	<6,7	6-7	5-6	Inne i vakuumpumpen: ikke panikksvømming

*Trenging bør vare maks 2 timer. Måleresultater fra trenging vil variere etter når i trengeprosessen prøvene tas. De oppgitte verdier forutsetter av prøvene tas midt i trengeprosessen. Mot slutten av trenging kan det være vanskelig å unngå laktatnivåer hos gjenværende "slumpfisk" under til 8-9 mmol/l

Målemetoder

Blodprøvetaking

Blod kan tas fra gjelle eller fra venen på oppsiden av sidelinjeorganet, under fettfinnen, rett etter avliving av fisken. Verdiene vil avhenge noe av hvor på fisken blodet tas, slik at man bør være konsekvent. Ved prøvetaking på halen kan man fortrinnsvis bruke en vakuutainere og hepariniserte rør. Da kan blodet stå lengre dersom man trenger flere analyser. Analysene bør tas innen 30 minutter etter at blodprøven er tatt. Dersom man ønsker å analysere på plasma sentrifugeres blodet på 3000 omdreininger i 10 minutter. Plasma kan fryses på -20 °C. Alle blodprøver bør tas rett etter avliving da verdiene endrer seg *post mortem*.

pH muskel

Bruk et mobilt pH meter. Måleelektroden bør være spiss i enden slik at den kan penetrere fiskeskinn. Bruk også en temperaturføler på metret og kalibrer apparatet til riktig temperatur. Ved måling på død laks lages to små kutt i muskel med skalpell; i det ene stikkes pH elektroden, mens temperaturføleren stikkes i det andre. Les av til metret har stabilisert seg. Ved måling flere ganger på samme fisk må nye hull lages for hver gang.

Laktat

Laktat (melkesyre) kan måles med måleinstrumentene i-STAT 300 Portable Clinical Analyzer (I-STAT Abbott, Princeton, NY, USA) og CG8+ kassetter; og/eller LaktatPro (Arkay Inc, Kyoto Japan).

- I-STAT: Det finnes mange aktuelle kassetter, velg en som måler laktat. Merk at holdbarhetsdatoen på kassetten er kort, så dette er ikke lagringsvare. Ta en dråpe blod på kassetten, som forevist og les av. Dette tar ca. 1 minutt.

Brukerveiledning: <http://www.medinor.no/medinor7/frontend/mediabank/2/28422/NY-i-STAT1-short-user-guide-714254-01E-norsk.pdf>

- LaktatPro: Dette måleinstrumentet krever LaktatPro teststrips. En dråpe blod dryppes på teststrippen og avlesingen tar 1 minutt.

Informasjon: <http://www.medinor.no/diagnostikk-reagenser/immunologi/reagens-aut-instr-immunologi/lactate-pro-laktatmatare-1>

Glukose

Glukose kan måles med måleinstrumentet i-STAT

- I-STAT: Det finnes mange aktuelle kassetter (eks CG8+), velg en som måler glukose. Merk at holdbarhetsdatoen på kassetten er kort, så dette er ikke lagringsvare. Ta en dråpe blod på kassetten, som forevist og les av. Dette tar ca. 1 minutt.
- Freestyle gir et mindre nøyaktig svar enn mer sofistikerte metoder, men for sammenlikning av fiskegrupper eller måling over tid gir dette enn rimelig pekepinn. Freestyle eller liknende finnes på apotek. Apparatet krever strips. Drypp en dråpe blod på strippen og avlesingen tar få sekunder.

Atferd

Det er mest aktuelt å følge atferden til fisken under trenging. Det er også mulig å se hvordan fisken oppfører seg inne i vakuumbakken ved å se gjennom "kuøyet" i tanken.

- Video: Det er mulig å montere et videokamera slik at man kan overvåke og dokumentere fisken sin atferd under trenging.
- Observasjoner: Ved fortløpende justering av trenging er den beste metoden et trent øye som kan se når atferden endrer seg til at fisken er for stresset. De mest velegnede til denne jobben er de som jobber med nota under trenging.

Anbefalinger for håndtering

Basert på gitte resultater, erfaringer og observasjoner er det mulig å skissere følgende anbefalinger:

1. Unngå intensiv trenging som resulterer i fisk over vannflaten som snapper etter luft. Mange synlige finner over vannivå tyder også på for intens trenging

2. Å roe ned fisken etter pumping (atferdskammer) før slagmaskin gir bedre velferd
3. Vær observant på at pumping forkorter tiden til inntredelse av rigor *mortis* og reduserer pH i muskel.
4. Unngå stopp i pumpeprosessen som forårsaker at fisk blir stående i pumperøret for eksempel ved å effektivisere kommunikasjonen mellom personell på ventemerde og inne i slakteriet.
5. Pass på at personell som håndterer fisk og utstyr har de rette kvalifikasjoner og at utstyret blir brukt på korrekt måte.
6. Pass på utstyr – unngå skarpe kanter og bend som kan skade fisken under transport.

3 Grenseverdier fra referert litteratur

Tabell 2 Tabellen gir en oversikt over litteratur som omhandler stressreaksjoner etter trenging, håndtering, transport og pumping av fisk i forbindelse med slakting. Verdiene er maksimal verdier oppgitt i de respektive publikasjonene. Kontrollverdier er oppgitt i parentes.

Referanse	Art	Stress-faktor	pH blod/ muskel	Kortisol	Glukose	Laktat	Hemoglobin	Hematokritt
Acerete et al., 2004	Abbor	Transport		386 nmol/L (124)	4,2 mmol/L (3)	2,7 mmol/L (2,5)	52,4 g/l (37,1)	24% (18)
Acerete et al., 2004	Abbor	Håndtering		331 nmol/L (124)	3,4 mmol/L (2)	2,3 mmol/L (1,5)	51 g/l (40)	19,4% (14)
Arends et al., 1999	Sea bream	Håndtering		202 nmol/L (25)	4,5 mmol/L (3,5)	1,2 mmol/L (0,9)		
Bagni et al., 2007	Sea bass/ Sea bream	Trenging	6,3/6,4 (7,3)					
Caipang et al., 2008	A. torsk	Trenging		159 nmol/L (70)				
Erikson et al., 2006	A. laks	Ventemerd	6,4/6,8 (7,4)					
Espmark, 2004	A. laks	Trenging		603 nmol/L (267)	6 mmol/L (4,4)	6,2 mmol/L (3,2)		
Espmark, 2004	A. laks	Pumping						
Frisch & Anderson, 2000	Plectopomus leopardus	Transport		193 nmol/L (14)	7,5 mmol/L (2)	4,2 mmol/L (1,1)	9,4 g/L (6,2)	45% (29)
Gatica et al., 2008, 2010	A. laks	Trenging + pumping	6,7 (M)	899	1,7	3,8		
Gatica et al., 2010	A. laks	Transport		444	3,4	1,0		
Gomes et al., 2003	Colosso ma macropomum	Transport		593 nmol/L (248)	11 mmol/L (3)			32% (25)

Referanse	Art	Stress-faktor	pH blod/muskel	Kortisol	Glukose	Laktat	Hemoglobin	Hematokritt
Hur et al., 2007	Japansk flyndre	gjentatt håndtering		70 nmol/L (20)	4,7 mmol/L (1)	9 mmol/L (0,5)	Ingen endring	36% (21)
Iversen et al., 2005	A. laks	Transport		540 nmol/L	9 mmol/L	9 mmol/L		
Iversen et al., 1998	A. laks	Transport		500 nmol/L (10-50)	9 mmol/L (4)	3,6 mmol/L (1)		62% (40-50)
Mejdell et al., 2009	A. laks	Pumping	7,2/6,6-6,9		4 mmol/L	5,5-6,5 mmol/L		
Merkin et al. 2010	Ørret	Pumping	7,35	552 nmol/L		6 mmol/L		
Merkin et al. 2010	Ørret	Transport			5,38 (3,4)			
Merkin et al. 2010	Ørret	Trenging	7,37	414 nmol/L		4 mmol/L		
Minchew et al., 2007	Catfish	Lasting		372 nmol/L (8)	8 mmol/L (2)	12 mmol/L (2)		
Misimi et al., 2008	A. laks	Håndtering	6,7 (7,5)		8,5 mmol/L (7,4)			
Misimi et al., 2008	A. torsk	Håndtering	6,9 (7,4)		7,3 mmol/L (5,8)			
Montero et al., 1999	Sea bream	Trenging		44 nmol/L (11)	2,6 mmol/L (2,3)		110 g/l (90)	44% (37)
Olsen et al., 2008	A. torsk	Akutt stress		221 nmol/L (14)	7 mmol/L (2,7)	8 mmol/L (2)	74 g/l (63)	27,5% (21)
Olsen et al., 2002	A. laks	Akutt stress		607 nmol/L (0)	7,7 mmol/L (4)	1,15 mmol/L (2)		46% (37)
Rocha et al., 2004	Brycon caphalus	Trenging		497 nmol/L (303)	4,3 mmol/L (3,3)			
Rotlland et al., 2001	Sea bream	Håndtering		497 nmol/L (28)	6,9 mmol/L (3,6)	3,5 mmol/L (1,3)		
Ruane et al., 1999	R. ørret	Håndtering		110 nmol/L (< 14)	6 mmol/L (4)			46 % (30)
Ruane et al., 1999	Brun ørret	Håndtering		441 nmol/L (<14)	12 mmol/L (5)			42 % (34)
Ruane et al., 2002	Karpe	Trenging		207 nmol/L (25)	3,7 mmol/L (2)	3,7 mmol/L (2,7)	10,45 mg/dl (10,29)	43 % (40)

Referanse	Art	Stress-faktor	pH blod/muskel	Kortisol	Glukose	Laktat	Hemoglobin	Hematokritt
Sadler et al., 2000	Ørret	Håndtering		75,5 ng/ml (24,6)	4,7 mM (3,3)	3,67 mM (0,89)	79,7 g/l (83,7)	35,7 % (32,5)
Sandodden et al., 2001	A. laks	Transport		550 nmol/L	7,5 mmol/L (3)			
Sigholt et al., 1997	A. laks	Håndtering						
Skjervold et al., 2001	A. laks	Trenging		1,5 mmol/L (0,25)	7,5 mmol/L (4,5)	10 mmol/L (1,9)		
Skjervold et al., 1999	A. laks	Trenging		936 nmol/L (278)	4,86 mmol/L	11,9 mmol/L (5,85)		
Tort et al., 2001	Sea bream	Håndtering		279 nmol/L	11 mmol/L	5 mmol/L		
Trenzado et al., 2006	Ørret	Crowding					11mg/100ml (9)	50 % (40)
Urbinati et al., 2004	Brycon cephalus	Transport		270 nmol/L (179)	7,1 mmol/L (2,4)			41 % (33)
Veiseth et al., 2006	A. laks	Trenging	6,8 (7,3) M	1000 nmol/L (190)	4 mmol/L (2,5)	8,5 mmol/l (0,5)		
Wilkinson et al., 2008	Barramundi	Håndtering		119 nmol/L (3)	6,4 mmol/L (4,2)	10,5 mmol/L (4,6)		

Forts. tabell 2

Referanse	Stressfaktor Art	Osmolalitet	Klorid	ACT H	Atferd	Rigor mortis	Skade skinn/ finne	LDH	AST
Acerete et al., 2004	Transport Abbor	0,27mOsm/kg (0,35)							
Acerete et al., 2004	Håndtering Abbor	0,31mOsm/kg (0,31)							
Arends et al., 1999	Håndtering Sea bream			32 pM (7)					
Bagni et al., 2007	Trenging Sea bass/Sea bream					6-7h			
Berg et al., 1997	Pumping A.laks					10h (20)			
Chandroo et al., 2005	Transport R. ørret								Panikk svøm- ming
Erikson et al., 2006	Ventemerd A. laks					22h (46)			
Espmark, 2004	Trenging A. laks	352 mOsmol/L (341)	141 mmol/L (147)						Svøm- ming og luft snap- ping
Espmark, 2004	Pumping A. laks					7-10 h (30)			
Gatica et al., 2008; 2010	Transport/pum- ping A. laks	275/297,1 mosm/kg	122,8/1 26,1 mmol/l			6-9 h			
Grizzle & Lovshin, 1996	Pumping Catfish						5%/ 55%	290 units/L (220)	120 units/ L (80)
Grizzle & Lovshin, 1994	Pumping Catfish						-75%	370 units/L (200)	150 units/ L (50)
Grizzle et al., 1992	Pumping Catfish						17%/ 25%	140 units/L (50)	110 units/ L (50)
Heilfrich et al., 2004	Pumping Morene saxatilis						1,9%/ 18,7%		
Helfrich et al., 2004	Pumping Morene saxatilis						2,4%/ 3,1%		
Hur et al., 2007	Gjentatt håndtering J. flyndre	392 mOsmol/kg (350)							

Referanse	Stressfaktor Art	Osmolalitet	Klorid	ACTH	Atferd	Rigor mortis	Skade skinn/fin ne	LDH	AST
Iversen et al., 1998	Transport A. laks		110 mmol/L (130)						
Merkin et al. 2010	Pumping Ørret					3h			
Merkin et al. 2010	Trenging Ørret					24h			
Mejdell et al., 2009	Pumping A. laks					8h			
Misimi et al., 2008	Håndtering A. laks					9h (45)			
Misimi et al., 2008	Håndtering A. torsk					22h (45)			
Mørkøre et al., 2008	Håndtering før slakt A.laks					9h (30)			
Olsen et al., 2008	Akutt stressA. torsk	369 mOsm (335)	161 mmol/L (146)						
Olsen et al., 2002	Akutt stress A. laks	390 mOsm (330)							
Rocha et al., 2004	Trenging Brycon cephalus		127 mmol/L (133)						
Rotlland et al., 2001	Håndtering Sea bream			270 pg/ml (25)					
Ruane et al., 1999	Håndtering R. ørret		124 mmol/L (149)	70 pg/ml (35)					
Ruane et al., 1999	Håndtering Brun ørret		114 mmol/L (146)	180 pg/ml (70)					
Ruane et al., 2002	Trenging Karpe		97 mmol/L (100)						
Sigholt et al., 1997	Håndtering A. laks					2h (13)			
Skjervold et al., 2001	Trenging A. laks	425mOsmol/L (310)				6 h (20)			
Skjervold et al., 1999	Trenging A. laks	432 mosM/kg (347)				14-24h			
Tort et al., 2001	Håndtering sea bream	432 mosM/kg (347)							
Urbinati et al., 2004	Transport Brycon cephalus	300mOsmol/L (275)	90 mmol/L (120)						
Veiseth et al., 2006	Trenging A.laks	420 mOsm/kg (330)							
Wilkinson et al., 2008	Håndtering Barramundi					3h (12)			

Forts. tabell 2

Referanse	Stressfakt or Art	pCO ₂ (kPa)	pO ₂ (kPa)	HCO ₃ (mmol/l)	TCO ₂ (mmol/l)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	iCa (mmol/l)
Cnaani et al. 2004	Håving Tilapia					196 meq/l	3,09 meq/l	15,75
Dobisikova et al. 2009	Karpe Transport							4,45
Fanouraki et al. 2007	Jaging Pagrus pagrusu					195	10	
Fanouraki et al. 2007	Høy tetthet Pagrus pagrusu					201	2,55	
Gatica et al., 2010	Transport/ pumping A. laks					147,6/ 156,9		
Iversen et al. 1998	A. laks Transport					211 (kontroll = 159)		
Le Ruyet et a.. 2008	Høy tetthet (FW) Ørret				12,5	141 (kontroll = 153)		
Merkin et al. 2010	Pumping Ørret	1,5	0,67					
Merkin et al. 2010	Trenging Ørret	1,1	1,3					
Nomura et al. 2009	A. laks Transport	0,665				160	4,5	
Ruane et al. 1999	Ørret (ferskvann) Trenging					178 nM (185 = kontroll)	1,24 nM (2,46 = kontroll)	
Sammouth et al. 2009	Tetthet Sea bass	5,9		19,6	20,6	159	6,5	

Atferd som stressindikator

Flere uavhengige utsagn fra ansatte på slakteriene støtter de observasjonene Espmark (2004) dokumenterte på atferd hos trengt og stresset fisk. Under intens trenging er det ikke uvanlig at fiskemassen ser ut som om den "koker". Dette består av fisk som trenges mot overflaten. Typiske observerte atferdstrekk som betegner stress og påvirket velferd er:

- Fisk som snapper luft – når flere fisk per m² er over vannoverflaten og snapper luft
- Ryggfinner synlig over vannoverflaten - når trengingen er så intens at fisken tvinges opp i overflaten. Flere fisk per m² er over vannoverflaten slik at ryggfinneren er synlig
- Lateral side opp – når trengingen er så intens at fisken ikke klarer å orientere seg eller bevege seg fritt legger den seg på siden i vannoverflaten slik at den sølvaktige siden blir synlig
- Antall snubevegelser - når fisketettheten og stresset øker blir bevegelsesmulighetene for enkeltfisk begrenset. Dette vises ved at enkeltfisk inne svømmer fritt men blir stående i ro.

4 Dose/respons forsøk utført i prosjektet som referanse

Tabell 3 Dose-respons forløp for laks (ca. 1000g) utført ved Nofima (Sunnalsøra) og som kan brukes som referanse i tillegg til litteraturverdiene presentert i tabell 2. Blodprøve er tatt rett etter avlaving.

Stressfaktor	Kortisol (nmol/l)	Glukose (mmol/l)	Laktat (mmol/l)	pH blod	pH muskel (tid post mortem)	Skade	Rigor mortis (Timer til maks)
Kontroll (sedert med Eugenol)	40	4,4	1,41		7,31 (0t) 7,02 (20t)	nei	25 (77°)
Håndtering (omrøring 5 min) (standardisert forsøk)	550	5,4	7,5		7 (0t) 6,4 (20t)	nei	11 (90°)
Trenging (200 kg/m ³) (standardisert forsøk)	304	4,8	6,2		7 (0t) 6,6 (20t)	nei	20 (90°)
Trenging (400 kg/m ³) (standardisert forsøk)	306	5,1	8,7		6,6 (0t) 6,3 (23t)	nei	6 (90°)

5 Grenseverdier fra andre prosjektaktiviteter og kommersiell oppdrett

Trenging, håndtering, pumping

Tabell 4 Gjennomsnittsverdier fra prosjektaktiviteter: måling av kortisol, glukose, laktat, pH blod og muskel, skader og rigor-forløp under trening, håndtering og pumping av levende laks. Blodprøver er tatt rett etter avliving

Stressfaktor	Kortisol (nmol/l)	Glukose (mmol/l)	Laktat (mmol/l)	pH blod	pH muskel (tid post mortem)	Skade	Rigor mortis (Timer til maks)
Pumping løftehøyde 3,64 m (November, flo, standardisert forsøk)		4,86	4,73	6,88	6,95 (t0) 6,41 (t25)		18,5 (87°)
Pumping løftehøyde 5,24 m (November, fjære, standardisert forsøk)		5,28	4,92	6,91	6,92 (t0) 6,67 (t20)		14,5 (85°)
Gjentatt pumping (Mars, 3 x, standardisert forsøk)	501,8 (kontroll 438)	5,38	2,64	7,44	7,15		
Gjentatt pumping (Mars, 6 x, standardisert forsøk)	476 (kontroll (438)	5,43	4,02	7,37	7,1		
Trenging medio(september, kommersielt)		3,26	3,83	7,43	6,91 (t0) 6,27 (39t)		17,5h (90°)
Trengestart (september, kommersielt)		2,97	6,04	7,05	7,23 (t0) 6,69 (39t)		42h (90°)
Trengeslutt (september, kommersielt)		3,94	7,48	7,05	6,97 (t0) 6,27 (39t)		15 (87°)
Etter trening og pumping (september, kommersielt)		3,19	5,81	7,38	6,75 (0t) 6,24 (40t)		7 (85°)
Avlossing fra brønnbåt etter transport (september, kommersielt)		2,1	3,73	7,15	7,11 (0t) 6,84 (25t)		18 (78°)

Tabell 5 Gjennomsnittsverdier fra prosjektaktiviteter: måling av pCO_2 , pO_2 , HCO_3 , TCO_2 , Na, K, iCa under trenging, håndtering og pumping (* avvik fra normal) av levende laks. Blodprøver er tatt rett etter avlaving. Måned er det samme som tabell 3

Stressfaktor	pCO_2 (kPa)	pO_2 (kPa)	HCO_3 (mmol/l)	TCO_2 (mmol/l)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	Hb (g/l)	Hct (%)	iCa (mmol/l)
Pumping løftehøyde 3,64 m (flo, standardisert forsøk)	4,55	2,45	6,33*	7,38	153	5,04	113,5	33,4	1,68
Pumping løftehøyde 5,24 m (fjære, standardisert forsøk)	4,16	2,01	6,24*	7,2	157	5,16	109,7	35	1,62
Gjentatt pumping (3 x, standardisert forsøk)		2,35			156,7	4,56	102,6	30,25	
Gjentatt pumping (6 x, standardisert forsøk)	4,3	1,93	8,4	9	159,32	5,05	100,7	29,05	
Trenging (september, kommersielt)	2,57	3,26	6,65	7,27	156,9	4,53	117,5	34,6	1,59
Trengestart (september, kommersielt)	5,03	1,4	6,3	7,0	157	5,2	119	35	1,68
Trengeslutt (september, kommersielt)	3,61	2,17	7,03	7,7	164	4,01	124,6	36,6	1,68
Etter trenging og pumping (kommersielt)	3,06	2,39	6,39	7,3	160	4,2	120 (tr.start)	35,21	1,67
Avlossing fra brønnbåt etter transport (kommersielt)	3,89	2,4	8,18	9,11	154	4,3	123 (tr.start)	36,1	1,53

Effekt av vakuum

Tabell 6a Effekter av vakuum isolert. Bedøvd laks (ca. 1000 g) i vakuum.

Behandling	Atferd etter oppvåking	Dødelighet akutt og etter 6 uker	Observerte skader gjelle, finne, skinn
0,3 bar i 1 minutt	Normal	0	Ingen
0,5 bar i 1 minutt	Normal	0	Ingen
0,7 bar i 1 minutt	Normal	0	Ingen
1,0 bar i 1 minutt	Normal	0	Ingen

Tabell 6b Effekter av vakuum isolert. Ubedøvd laks (ca. 1000 g) i vakuum. Fysiologiske resultat

Behandling	Glukose (mmol/l)	Laktat (mmol/l)	pH muskel	PO ₂ (kPa)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	Hb (g/l)	Hct (%)
Referanse (tatt rett fra kar)	5,27	1,43	7,08	64,8	153	3,97	6,87	20,2
Kontroll (plassert i vakuumtank uten vakuum)	5,46	3,61	7,05	34,7	158,1	3,99	7,03	20,7
0,3 bar i 1 minutt	5,36	3,1	7,08	31,1	155,9	4,16	8,03	23,6
0,5 bar i 1 minutt	5,39	3,29	6,96	33,3	160,9	3,98	8,01	23,6
0,7 bar i 1 minutt	5,31	2,91	6,99	34,2	157,22	3,93	7,14	21

Tabell 6c Effekter av vakuum isolert (median). Ubedøvd laks (ca 1000g) i vakuum. Morfologi og atferd

Behandling	Observerte skader gjelle, finne, skinn	Slipper luft (% fisk)	Ventilasjons frekvens per min	Tid (sek) brukt til svømming per min
Referanse (tatt rett fra kar)	Ingen	NA	NA	NA
Kontroll (plassert i vakuumtank uten vakuum)	Ingen	0	71,4	0
0,3 bar i 1 minutt	Ingen	80	78,14	53,47
0,5 bar i 1 minutt	Ingen	80	79,8	38,87
0,7 bar i 1 minutt	Ingen	30	79,03	27,25

Referanser

- Acerete, L., Balach, J.C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237, 167-178.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Wendelar Bonga S.E. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology* 163, 149-157.
- Bagni M., Civitareale C., Priori A., Ballerini A., Finoia M., Brambilla G., Marino G. 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52-60.
- Berg T., Erikson U., Nordtvedt T.S. 1997. Rigor mortis assessment of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and effects of stress. *Journal of Food Science* 62, 439-446.
- Caipang C.M.A., Brinchmann M.F., Berg I., Iversen M., Eliassen R., Kiron V. 2008. Changes in selected stress and immune-related genes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following overcrowding. *Aquaculture Research* 39, 1533-1540.
- Chandroo K.P., Cooke S.J., McKinley R.S., Moccia E.D. 2005. Use of electromyogram telemetry to assess the behavioural and energetic responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) to transportation stress. *Aquaculture Research* 36, 1226-1238
- Cnaani, A., Tinman S., Avidar Y., Ron M., Hulata G. 2004. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research* 35, 1434-1440.
- Dobsikova R., Svobodova Z., Blahova J., Modra H., Velisek J. 2009. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Czech Journal of Animal Science* 54, 510-518.
- Erikson U., Hultmann L., Steen J.E. 2006. Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia. 1. Establishing a method for large-scale processing of farmed fish. *Aquaculture* 252, 183-198.
- Espmark Å.M. 2004. Behavioural and physiological indicators of stress during crowding in Atlantic salmon – and effects on rigor mortis. *Akvaforsk report* 34/2004.
- Fanouraki E., Divanach P., Pavlidis M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 265, 294-304.
- Frisch A.J., Anderson T.A. 2000. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 23-34.

- Gatica M.C., Monti G., Gallo C., Knowles T.G., Warriss P.D. 2008. Effects of well-boat transportation on the muscle pH and onset of rigor mortis in Atlantic salmon. *Veterinary Record* 163, 111-116.
- Gatica M.C., Monti G.E., Knowles T.G., Warriss P.D., Gallo C.B. 2010. Effects of commercial live transport and preslaughter handling of Atlantic salmon on blood constituents. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42, 73-78.
- Gomes L.C., Araujo-Lima C.A.R.M., Roubach R., Chippari-Gomes A.R., Lopes N.P. 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of the world Aquaculture Society* 34, 76-84.
- Grizzle J.M., Chen J., Williams J.C., Spano J.S. 1992. Skin injuries and serum enzyme activities of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) harvested by fish pumps. *Aquaculture* 107, 333-346.
- Grizzle J.M., Lovshin L.L. 1994. Effect of pump speed on injuries to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) during harvest with a turbine pump. *Aquaculture Engineering* 13, 109-114.
- Grizzle J.M., Lovshin L.L. 1996. Injuries and serum enzyme activities of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*) harvested with a turbine pump. *Aquaculture Engineering* 15, 349-357.
- Helfrich L.A., Bark R., Liston C.R., Weigmann D.L., Mefford B. 2004. Live transport of striped bass and rainbow trout using a hydrostatic pump. *Journal of the World Aquaculture Society* 35, 268-271.
- Hur J.W., Park I., Chang Y.I. 2007. Physiological responses of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to a series stress during the transportation process. *Ichthyological Research* 54, 32-37.
- Iversen M., Finstad B., Nilssen, K.J. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 168, 387-394.
- Iversen M., Finstad, B., McKinley R.S., Eliassen R.A., Carlsen K.T., Evjen T. 2005. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts during commercial well boat transport, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture* 243, 373-382.
- Mejdell C.M., Midling K.Ø., Erikson U., Evensen T.H., Slinde E. 2009. Evaluering av slaktesystemer for slaktefisk i 2008 – fiskevelferd og kvalitet. Veterinærinstituttet rapport nr 01-2009.
- Merkin G.V., Roth B., Gjerstad C., Dahl-Paulsen E., Nortvedt R. 2010. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 309, 231-235

- Minchew C.D., Beecham R.V., Pearson P.R., Green B.W., Kim J.M., Bailey S.B. 2007. The effects of harvesting and hauling on the blood physiology and fillet quality of market-size channel catfish. *North American Journal of Aquaculture* 69, 373-380.
- Misimi E., Erikson U., Digre H., Skavhaug A., Mathiassen J.R. 2008. Computer vision-based evaluation of pre- and postrigor changes in size and shape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets during rigor mortis and ice storage: Effects of perimortem handling stress. *Journal of Food Science* 73, E57-E68.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara J.M. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 53-60.
- Mørkøre T., Mazo P.I., Tahirovic V., Einen O. 2008. Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 277, 231-238.
- Nomura M., Sloman K.A., von Keyserlingk M.A.G., Farrell A.P. 2009. Physiology and behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt during commercial land and sea transport. *Physiology and behaviour* 96, 233-243
- Olsen R.E., Sundell K., Hansen T., Hemre G., Myklebust R., Mayhew T.M., Ringø E. 2002. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 211-221.
- Olsen R.E., Sundell K., Ringø E., Myklebust R., Hemre G., Hansen T., Karlsen Ø. 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L., *Aquaculture* (2008), doi:10.1016/j.aquaculture.2008.05.006.
- Rocha de R.M., Carvalho E.G., Urbinati E.C. 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxa (*Brycon caphalus*) (Gunther, 1869). *Aquaculture Research* 35, 245-249.
- Rotllant, J., Palm, P.H., Perez-Sanchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L. 2001. Pituitary and interregional function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. Teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*. 121, 333-342.
- Ruane N.M., Wendelaar Bonga S.E., Balm P.H.M. 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-renal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology* 115, 210-219.
- Ruane, N.M., Carballo, E.C., Komen, J. 2002. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research* 33, 777-784.

- Le Ruyet J.P., Labbe L., Le Bayon N., Severe A., Le Roux A., Le Dilliou H., Quemener L. 2008. Combined effects of water quality and stocking density on welfare and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquatic Living Resources 21, 185-195.
- Sadler J., Wells R.M.G., Pankhurst P.M., Pankhurst N.W. 2000. Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 184, 349 – 361.
- Sammouth S., d Orbcastel MR., Gasset E., Lamarie G., Breuil G., Marino G., Coeurdacier J., Fivelstad S., Blancheton J. 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. Aquaculture Engineering 40, 72-78.
- Sandodden R., Finstad B., Iversen M. 2001. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Anaesthesia and recovery. Aquaculture research 32, 87-90.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T.S., Seland, A. 1997. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Food Science 62, 898-905.
- Skjervold, P.O., Fjaera, S.O., Oestby, P.B. 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. Aquaculture 175, 93-101.
- Skjervold, P.O., Fjaera, S.O., Oestby, P.B., Einen, O. 2001. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 192, 265-280.
- Tort, I., Montero, D., Robaina, L., Fernández-Palacio, H., Izquierdo, M.S. 2001. Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linneaus, 1758). Aquaculture Research 32, 593-598.
- Trenzado C.E., Morales A.E., Higuera M.de la. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), selected for low and high stress responsiveness. Aquaculture 258, 583 – 593.
- Urbinati E.C., de Abreu J.S., da Silva Camargo A.C., Parra M.A.L. 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. Aquaculture 229, 389-400.
- Veiseth, E., Fjæra, S.O., Bjerkeng, B., Skjervold, P.O., 2006. Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. Comparative Biochemistry and Physiology, B. 144, 351-358.
- Wilkinson, R.J., Paton, N., Porter, M.J.R. 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in babbamundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture 282, 26-32.



ISBN 978-82-7251-957-4 (trykt)
ISBN 978-82-7251-958-1 (pdf)
ISSN 1890-579X