

Sluttrappport for prosjektet :

Effekter på helse, sykdom og velferd ved postsmoltproduksjon i semi-lukkede anlegg - Del A: Tetthetstoleranse og vannforbruk – FHF 900816.



Oppdrett av postsmolt i lukket oppdrettstank, Molnes Skånevik

Ansvarlig FoU-institusjon: Uni Research (UNI)

Samarbeidende FoU partnere: Nofima, UIB, Høyskolen i Bergen, NIVA og UMB

**Industri partnere: Marine Harvest, Lerøy Seafood group ASA, Smøla
klekkeri og Settefisk AS, Grieg Seafood**

Aktivitetsperiode: 01.08.2012 – 01.11.2014

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|-----------|
| 1. Innledning | 4 |
| <i>Kunnskapsfronten om fisketetthet og vannforbruk hos Atlantisk laks</i> | 4 |
| 2. Materiale og metode | 6 |
| <i>Gjennomføring av eksperimentell aktivitet</i> | 6 |
| <i>Innsamlede prøver og analyseaktivitet</i> | 11 |
| <i>Statistisk behandling av data</i> | 12 |
| 3. Leveranser til FHF under prosjektperioden | 13 |
| 4. Organisering av prosjektet (Del A) | 13 |
| 5. Resultat | 14 |
| <i>Resultat fra tetthetsforsøk</i> | 14 |
| <u>Total gjelle NKA</u> | |
| <u>Plasma natrium</u> | 14 |
| <u>Blod PCO₂</u> | 15 |
| <u>Blod HCO₃</u> | 16 |
| <u>Hematokritt</u> | 17 |
| <u>Plasma glukose</u> | 18 |
| <u>Plasmakortisolnivå</u> | |
| <u>Ryggfinneareal</u> | 19 |
| <u>Velferdsindikatorer</u> | 20 |
| <u>Spesifikk vekstrate</u> | 21 |
| <u>Kondisjon</u> | 22 |
| <u>Vannkvalitet; Døgnvariasjon i CO₂ og TAN</u> | 23 |
| <i>Resultat fra vannforbruksforsøk</i> | 25 |
| <u>Gjelle NKA α1a og α1b mRNA uttrykk</u> | 25 |
| <u>Total gjelle NKA under tilvenning til sjø</u> | |
| <u>Total gjelle NKA</u> | |
| <u>Plasmaklorid</u> | 26 |
| <u>Blod PCO₂</u> | 27 |
| <u>Blod HCO₃</u> | 28 |
| <u>Hematokritt</u> | 29 |
| <u>Plasma glukose</u> | 30 |
| <u>Ryggfinneareal</u> | 31 |
| <u>Velferdsindikatorer</u> | 32 |
| <u>Spesifikk vekstrate</u> | 33 |
| <u>Kondisjon</u> | 34 |
| <u>Vannkvalitet; Døgnvariasjon i oksygenkonsum</u> | 35 |
| <u>Vannkvalitet; Døgnvariasjon i O₂, TAN og CO₂</u> | 36 |
| 6. Kortfattet diskusjon og konklusjon | 39 |
| <i>Kvalitet på forsøksfisk</i> | |
| <i>Effekter av økende fisketetthet på fiskevelferd</i> | 39 |
| <i>Effekt av redusert spesifikk vanngjennomstrømning på fiskevelferd</i> | 40 |
| <i>Foreløpige konklusjon</i> | 42 |
| 7. Referanser | 44 |

1. Innledning

Kunnskapsfronten om fisketetthet og vannforbruk hos Atlantisk laks

Produksjon av postsmolt har tradisjonelt foregått i merder i sjø. Nå er flere alternative produksjonsformer under utvikling. Både resirkuleringsteknologi på land og semi-lukkede anlegg i sjø (Rosten, et al., 2011) er aktuelle, og det er stor interesse blant næringsaktørene for å prøve ut slike anlegg. Når nye produksjonskonsept for postsmolt skal evalueres er det avgjørende at vi har god kontroll på hvordan de ulike produksjonsregimene påvirker fiskens ytelse, velferd, og helse.

For å oppnå god lønnsomhet i lukkede anlegg i sjø, må fisketettheten være høyere enn dagens regelverk for tradisjonelle nøter (25 kg/m^3 , Henriksen, et al., 2013). En høy tetthet gir en lavere investeringskostnad, men for at denne skal ha en positiv effekt på produksjonskostnad forutsettes det at fiskens velferd og ytelse ikke blir skadelidende. Målbare biologiske effekter på fisk som følge av høy tetthet (kg/m^3) vil avhenge av vannutskifting, vannkvalitet, lysregime, tilstrekkelig tilgang på fôr og eventuell grad av sosiale interaksjoner mellom individene. Er vannutskiftingen høy, d.v.s. at O_2 , CO_2 og NH_3 er innenfor akseptable grenser og fisken gis tilstrekkelig med fôr, så kan en operere med tettheter som langt overgår dagens grenser (Kjartansson, et al., 1988; Hosfeld, 2010). Uten tilfredsstillende vannutskifting vil derimot effekten av redusert vannkvalitet og fôrtildeling kunne bidra til økende aggresjon, lav tilvekst og manglende velferd (Ellis, et al., 2002). Det er stor usikkerhet knyttet til effekter av fisketetthet og vannkvalitet på velferd og prestasjon hos postsmolt i lukkede anlegg i sjø. En gjennomgang av publisert litteratur viser stor variasjon i anbefalinger m.h.p. grenseverdi for fisketetthet og vannkvalitet (Ellis, et al., 2002; Rosten, et al., 2011; Thorarensen and Farrell, 2011; Terjesen, et al., 2013). Det antas likevel som en generell konklusjon at økende tetthet vil ha en gradvis negativ effekt på vekst uten at grensen for negativ påvirkning kan settes eksakt.

Målsettingen for dette prosjektet har vært å fremskaffe grunnleggende og anvendt kunnskap om effekter av økende tetthet og redusert vannforbruk på biologisk prestasjon og fiskevelferd hos postsmolt av laks. En sentral del av aktiviteten har vært å generere viktig basisinformasjon som skal tas i bruk i en eventuell storskalauttesting av semi-lukkede anlegg i sjø i regi av Marine Harvest, Smøla Settefisk og Klekkeri og Lerøy Vest, herunder etablere ny kunnskap om grenseverdier for oppdrett av postsmolt i semi-lukkede systemer. Prosjektet har blitt finansiert av FHF (dette prosjekt, #900816) og NFR (OPP, optimalisert postsmoltproduksjon, 217502/E40).

Følgende hypoteser er lagt til grunn for de to forsøkene som er gjennomført:

H_0 , Tettheter inntil 75 kg/m^3 i FT (flow-through) system vil ikke gi signifikante effekter på fiskevelferd og tilvekst hos postsmolt av laks, sammenlignet med lavere tettheter.

H_0 , Spesifikk vanngjennomstrømning ned til $0.2 \text{ l/kg fisk/min}$ vil ikke gi signifikante effekter på fiskevelferd og tilvekst hos postsmolt av laks sammenlignet med høyere vanngjennomstrømning.

2. Materiale og metode

Gjennomføring av eksperimentell aktivitet

Dette prosjektet har bestått av ett kombinert tetthets- og vannforbruksforsøk for postsmolt i sjøvann under forhold med kontinuerlig vanngjennomstrømning (altså ikke ved bruk av resirkulert vann, RAS). Den eksperimentelle delen av forsøkene ble gjennomført på Høyteknologisenteret i Bergen, ILAB i perioden 10 oktober til 20 desember 2012.

Tetthetsforsøket ble kjørt i Akvahall 2, ILAB (10 forsøkskar, Bilde 1) og besto av fem forsøksgrupper som ble etablert med hhv. 25, 50, 75, 100 og 125 kg fisk pr m^3 (vannforbruk: 0.6 l/kg fisk/min). Vann tilførsel til hvert kar ble kontrollert jevnlig med flowmåler (PortaFlow) av personell fra ILAB (Prosedyre etter ILAB standard ISO9001).

Vannforbruksforsøket ble kjørt i Biohall 11 (8 forsøkskar) og besto av fire ekstra forsøksgrupper med en start tetthet på 75 kg/m^3 . I disse gruppene ble imidlertid spesifikk vanngjennomstrømning justert til henholdsvis 0.5, 0.4, 0.3 og 0.2 l/kg fisk/min.

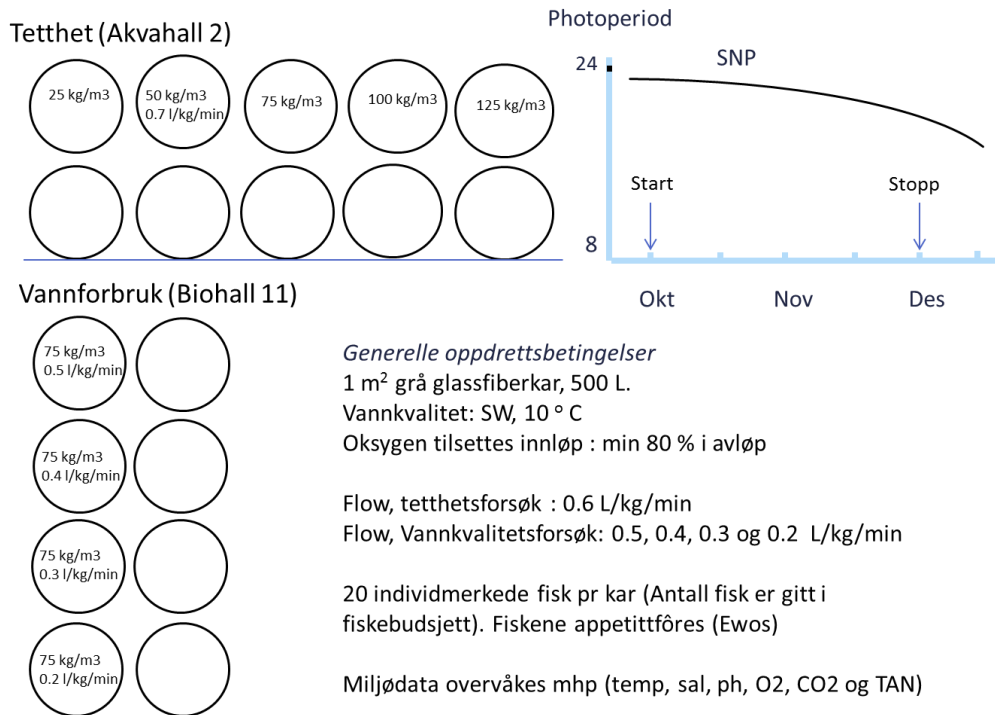
Vanngjennomstrømningen i hvert kar ble kontrollert daglig. Vannet sin strømningshastighet i det enkelte kar ble standardisert gjennom å justere vinkelen på stigningsrøret; fra 90° med vannsøylen til direkte inn mot karvegg. Etter at vinkelen var satt ble strømningshastigheten målt som tidsbruk (sek) mhp hvor lang tid en kork brukte på å flyte mellom to definerte punkt på karvegg (avstand mellom punktene: 30 cm).



Bilde 1. Karoppsett på Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB).

Hver forsøksgruppe var satt opp med to parallelle kar. En skjematisk oversikt over oppsett for begge forsøk er gitt i figur 1.

Kombinasjonsforsøk, tetthet og flow



Figur 1. Oversikt over oppsett for tetthet og vannforbruk forsøk.

Begge forsøkene har tatt utgangspunkt i ordinær 0+ smolt fra Lerøy Vest, Flatråker, Hordaland. Totalt sett ble 6250 fisk hentet inn til ILAB, hvoretter fiskene ble likt fordelt i 18 stk 1m forsøkskar med kontinuerlig tilførsel av ferskvann. En oversikt over forsøksgrupper, antall fisk og vannforbruk for hvert forsøk er gitt i Tabell 1 (tetthet) og 2 (vannforbruk).

Tabell 1. Forsøksgrupper, fiskebudsjett og vannforbruk benyttet i tetthetsforsøk.

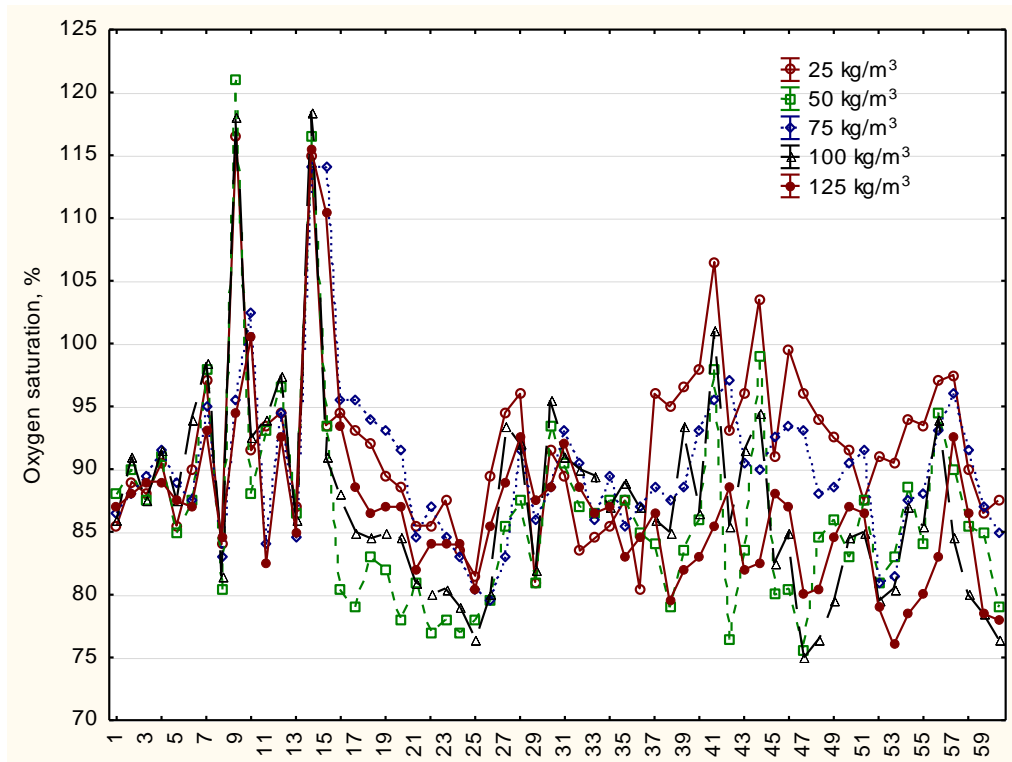
| Tetthet (kg/m ³) | Tank volum (l) | Ind størr. Snitt (gr) | Antall ind. (n) | Spes. vann (l/kg/min) | Vannforbr. (l/min) | Vannutskiftn. (min) |
|------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| 25 | 500 | 110 | 125 | 0,6 | 7,5 | 66,6 |
| 50 | 500 | 110 | 250 | 0,6 | 15 | 33,3 |
| 75 | 500 | 110 | 375 | 0,6 | 22,5 | 22,2 |
| 100 | 500 | 110 | 500 | 0,6 | 30 | 16,6 |
| 125 | 500 | 110 | 625 | 0,6 | 37,5 | 13,3 |
| | | | | | | |
| Sum | | | 1875 | | | |
| 2 paralleller | | | 3750 | | | |

Tabell 2. Forsøksgrupper, fiskebudsjett og vannforbruk benyttet i vannforbruksforsøk.

| Tetthet (kg/m ³) | Tank volum (l) | Ind størr. Snitt (gr) | Antall ind. (n) | Spes. vann (l/kg/min) | Vannforbr. (l/min) | Vannutskiftn. (min) |
|------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| 75 | 500 | 110 | 312 | 0,5 | 18,75 | 26,6 |
| 75 | 500 | 110 | 312 | 0,4 | 15 | 33,3 |
| 75 | 500 | 110 | 312 | 0,3 | 11,25 | 44,4 |
| 75 | 500 | 110 | 312 | 0,2 | 7,5 | 66,6 |
| | | | | | | |
| Sum | | | 1250 | | | |
| 2 paralleller | | | 2500 | | | |

Ett døgn etter at forsøksfisken var overført til ILAB (11. oktober) ble en subpopulasjon fisk (n=20) fra hvert kar merket for studie av individuelt vekstmønster. Den 14 oktober ble vannkvaliteten i de ulike karene endret fra ferskvann til 17 promille saltholdighet. Dagen etter ble saliniteten økt fra 17 til 25 promille og tilslutt den 18 oktober, satt videre opp til 34 promille. Forsøkene startet 24. oktober, altså ca to uker etter at fisken var overført/tilpasset sjø. Under den eksperimentelle perioden ble fiskene gitt naturlig lys (LDN) og naturlig temperert sjøvann (9.3°C, SD=0.1). I alle karene ble biomassetilveksten tatt ut hver 2 uke for å sikre stabil tetthet under hele forsøksperioden. I begge forsøkene ble O₂ tilsatt innløpsvannet gjennom ulike diffusorer (Point Four, 30 cm) som var lokalisert i en header tank ovenfor hvert kar. Oksygenet ble injisert på en slik måte at det ikke oppsto hyper-oksia rundt fisken (>80% metning i avløp). Tetthetsforsøket hadde manuell styring av oksygentilsetning. All overvåking av oksygen og flow ble gjennomført av personell fra ILAB. Oksygenivå i utløp ble registrert daglig mellom kl 11.00 og 12.00 i alle kar. Resultatene fra disse målingene, midlet over forsøksperioden, er gitt i Figur 2 og Tabell 3. I tillegg til disse målingene ble det i begge forsøk gjennomført to døgnregistreringer av endringer i CO₂ produksjon og TAN-ekskresjon. Døgnregistreringene ble gjennomført

henholdsvis 28. november og 13. desember 2012. Gjennom hver døgnsyklus ble det hentet inn vannprøver kl. 0900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 0300 og 0600. Prøvene ble analysert mhp oksygeninnvå (mg/l), CO₂ (mg/l) og TAN (ug/l, Total ammonia nitrogen).



Figur 2. Daglige målinger av oksygeninnvå i de ulike tetthetsgrupper. Biomassejusteringen som ble gjennomført hver 14 dag forklarer toppene i oksygenverdi utover i forsøket.

Tabell 3. Gjennomsnittlig oksygenverdi midler gjennom forsøksperioden (n=60 pr kar).

| Tank | 4 | 7 | 3 | 8 | 9 | 2 | 5 | 6 | 1 | 10 |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tetthet | 25 | 25 | 50 | 50 | 75 | 75 | 100 | 100 | 125 | 125 |
| O ₂ , % | 92,23 | 92,88 | 87,36 | 85,65 | 88,40 | 91,54 | 88,16 | 86,64 | 85,66 | 86,29 |
| Snitt | | 92,55 | | 86,51 | | 89,97 | | 87,40 | | 85,98 |

I vannforbruks-forsøket var all tilsetningen av oksygen automatisert (Sterner Commander). Systemet ble satt opp på en slik måte at det responderte automatisk på en oksygensensor i avløpsvannet og som deretter, via Commander, aktiverte en magnetventil i forkant av hver diffusor (styrt til >80% metning i avløp). I tillegg til oksygen kontroll var Commander systemet satt opp med automatisert logging av oksygeninnvå i innløp og avløp (loggeintervall: 10 min.). Under begge forsøkene ble det i tillegg jevnlig hentet inn vannprøver fra alle kar for dokumentasjon av reelt nivå av CO₂ (mg/l) og TAN (ug/l) under gjennomføring av forsøk. Gjennomsnittlige verdier av CO₂ og TAN er gitt i tabell 4 og 5.

Total karbonat konsentrasjonen, som er summen av CO_2 , HCO_3^- and CO_3^{2-} , ble bestemt ved hjelp av karbondioksid elektrode ifra Orion (Model 9502). Karbondioksid konsentrasjonen ble beregnet ifra prosentdel karbondioksid av total karbonat og den målte karbonat konsentrasjonen (Gebauer et al., 1992). Prøveflaskene til TAN analysene ble syrevasket på forhånd. Prøvene ble forsuret til $\text{pH} < 2$ ved bruk av konsentrert svovelsyre og lagret ved ca. 4 °C i kjøleskap. TAN bestemmelsen ble utført etter Norsk Standard 2005, NS-EN ISO 11732 ved hjelp av auto-analysator.

Tabell 4. Konsentrasjon av CO_2 (mg/L) og TAN (ug/l) i vannforbruksforsøket (n = 8).

| Grupper | 0,5 L/kg/min | 0,4 L/kg/min | 0,3 L/kg/min | 0,2 L/kg/min |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Karbondioksid (mg/L) | 3-8 | 4-8 | 6-13 | 11-24 |
| TAN (ug/l /L) | 0,18-0,55 | 0,21-0,57 | 0,32-0,80 | 0,50-1,20 |

Tabell 5. Konsentrasjon av CO_2 (mg/L) og TAN (ug/l) i tetthetsforsøket (n = 6-8).

| Grupper | 25 kg/m ³ | 50 kg/m ³ | 75 kg/m ³ | 100 kg/m ³ | 125 kg/m ³ |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Karbondioksid (mg/L) | 3-5 | 3-6 | 3-6 | 3-6 | 3-7 |
| TAN (ug/l /L) | 0,22-0,66 | 0,29-0,62 | 0,28-0,57 | 0,20-0,62 | 0,16-0,65 |

I begge forsøkene ble fisken fôret med Skretting, Optiline (3mm settefiskfôr) med skiveautomater, to ganger daglig i periodene 08:00 til 09:00 og 16:00 til 17:00. Alt fôr ble veiet inn før utfôring og gitt med 10 % overskudd, basert på fôrspill. Etter oppsatt fôrplan skulle fôrkvaliteten endres fra settefisk til sjøvannsfôr etter overføring til sjø. Tidlige observasjoner av sjøvannfôrets synkehastighet i kombinasjon med lav vannsøyde i karet (ca 70 cm) skapte imidlertid en bekymring om redusert reell fôrtilgjengelighet. Basert på observasjonen ble det besluttet å videreføre bruken av opprinnelig settefiskfôr, også i sjøfasen. Dette fôret hadde klart lavere synkehastighet og var således tilgjengelig for fiskene i flere minutt etter utfôring.

De fire siste ukene av tetthetsforsøket ble alt fiskefôr veiet inn og fôrspill samlet opp fra avløpsvannet (filter), tørket (24 timer i varmeskap, 50°C) og registrert (Metler vekt) i den hensikt å beregne fôrfaktor, fôrutnyttelse og appetitt (Helland, et al., 1996). I tillegg ble det ved oppstart og avslutning av fôrøppsamlingsperioden gjennomført en total biomasse registrering i alle kar. Fôrfaktor, fôrutnyttelse og appetitt ble deretter beregnet med utgangspunkt i følgende formler:

Fôrfaktor = (Spist fôr i perioden (kg)/tilvekst biomasse i perioden, kg)*100

Fôrutnyttelse = (Tilvekst biomasse i perioden (kg)/ Spist fôr i perioden, kg)*100

Appetitt = F % = 100 [C / ((B1 + B2)/2)] (t2 – t1)⁻¹

Hvor C er for konsum (g). B1 og B2 er fiskebiomasse (g) på dag t1 og t2.

En oversikt over forsøksprotokoll er gitt i Tabell 6.

Tabell 6. Forsøkslogg for gjennomført forsøksaktivitet.

| Dato | Gjennomføring | Kommentar |
|--------------|------------------------------|---|
| 10.10.2012 | Fisk til ILAB | Fiskene fordeles likt i alle kar (veies til 37.5 kg + 10 fisk), alle på ferskvann |
| 11.10.2012 | Merking av individ fisk | Merking av fisk |
| 15.10.2012 | FW uttak | Prøveuttak FW, Alle gruppene er like, uttak begrenset til max 20 fisk |
| 15.10.2012 | Overføring til sjøvann | All fisk overføres til 10°C sjøvann |
| 16.10.2012 | 24T SW uttak, 17 promille | Prøveuttak 17 ppt, Alle gruppene er like, uttak begrenset til max 20 fisk |
| 17.10.2012 | 48T SW uttak, 25 promille | Prøveuttak 25 ppt, Alle gruppene er like, uttak begrenset til max 20 fisk |
| 18.10.2012 | 96T SW uttak, 34 promille | Prøveuttak 34 ppt, Alle gruppene er like, uttak begrenset til max 20 fisk |
| 23.10.2012 | Kontrolluttak | Prøveuttak SW, Alle gruppene er like, uttak begrenset til max 20 fisk |
| 24.10.2012 | Oppstart forsøk | Forsøksgrupper etableres, karene bulkveies. Lys til LDN, vannflow justeres. |
| 07.11.2012 | Prøveuttak uke 2 | Hver FHF/OPP-partner har ansvar for egen sampling |
| 08.11.2012 | Biomasse justering | Biomassejustering basert på prøveuttak av fisk |
| 21.11.2012 | Prøveuttak uke 4 | Hver partner har ansvar for egen sampling |
| 22.11.2012 | Biomasse justering | Biomassejustering basert på bulk. |
| 28.-29.11.12 | Døgnsyklus vannkvalitet | Ansvar HiB |
| 05.12.2012 | Prøveuttak uke 6 | Hver partner har ansvar for egen sampling |
| 06.12.2012 | Biomasse justering | Biomassejustering basert på prøveuttak av fisk |
| 12.-14.12.12 | Døgnsyklus vannkvalitet | Ansvar HIB |
| 19.12.2012 | Prøveuttak uke 8, avslutning | Hver partner har ansvar for egen sampling |
| 20.12.2012 | Slutt veiing | Fiskene avlives, Registrering av individveiet fisk |

Sentralt i begge forsøk har vært å kartlegge kombinasjonseffekter av økende fisketetthet og redusert vannkvalitet. Innledningsvis ble blod og vevsprøver hentet inn fra smolt i ferskvann, samt etter 24, 48 og 96 timer etter endring til fullstyrke sjø. Etter forsøksstart ble prøver av fisken tatt ved dag 0 samt etter 14, 30, 45 og 60 dager. Vannkvalitet i alle kar ble overvåket daglig mhp. oksygennivå, temperatur, salinitet og pH.

Innsamlede prøver og analyseaktivitet

I dette prosjektet er smoltkvalitet karakterisert som endring i genuttrykk for ionetransporterne NKA subenheter $\alpha 1a$ (FW isoform) og $\alpha 1b$ (SW isoform), og som er lokalisert i kloridceller i gjellene (Nilsen, et al., 2007). Disse parametrene er sammenholdt med en utvidet analyse av total gjelle Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) aktivitet i henhold til en metode utviklet av McCormick (1993). Alt innsamlet blod er analysert for glukose, ionenivå (Na^+ , K^+ , Cl^-), Hb, Hct, pH, PaO_2 , PaCO_2 og HCO_3^- ved bruk av en ISTAT analyser (Abbot) herunder bruk av EC8+ kassetter. Plasmakortisol nivå etter 8 uker behandling (tetthetsforsøk) ble analysert ved bruk av validert protokoll for enzym immunoassay (EIA) beskrevet av Carey og McCormick (1998). Denne protokollen innbefattet bruk av en 96 brønns mikrotiter plate som ble mettet med hare anti-cortisol polyklonalt antistoff (Cat# 20-CR50, Fitzgerald Ind. Int'l; fortyntet 1:30000) i 3 timer ved 37 °C. Til hver brønn ble det tilsatt 2.5 μl standard (Cat # 400364, Cayman Chemical Company) eller plasmaprøve med 100 μl kortisol-konjugat (horseradish peroxidase cat. # 65-IC08, Fitzgerald Ind. Int'l; Diluted 1:6000), etterfulgt av overnatt inkubering. Som fremkalling ble hver brønn tilsatt 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Cat # 53-00-02, Kirkegaard and Perry) og deretter lest av hver 10 minutt ved bruk av en Sunrise Basic Tecan (software: magellan V6.5). Ved ønsket optisk tetthet (70 til 110 min) ble reaksjonen stanset (0.5 M HCl). Absorbans ble avlest ved 450 nm. Maksimum binding ($B_0=150\mu\text{l}$ EIA +100 μl kortisol-horseradish peroxidase konjugat) og ikke-spesifikk binding (NSB=150 μl EIA) ble bestemt på hver plate. Alle standarder ble kjørt som triplikat og plasma som duplikat. Avslutningsvis ble fiskene undersøkt m.h.p. ytre morfologi; finneslitasje, gjellelokk, sår, og katarakt basert på en metode utviklet av Hoyle *et al.* (2007). Kataraktregistreringen innbefattet visuell observasjon av øyet, men uten bruk av spaltelampe. Hver av de observerte velferdsindikatorer ble gitt heltallsscore mellom 0 og 5 (fra 0 til 2 for gjellelokk, katarakt og sår). Karakteren 0 betydde ingen skade mens karakteren 5 (eller 2) betydde ett klart velferdsproblem. Ved siste prøveuttak (20.12.12) ble all individmerkede fisk registrert m.h.p. lengde (mm) og vekt (gr), samt høyde (mm) og bredde (mm) på ryggfinne.

Kondisjonsfaktor (KF) og spesifikk vekstrate (SGR, intervall Dag0 til Dag70) ble deretter beregnet ved hjelp av følgende formler:

$$KF = \text{vekt}/(\text{lengde})^3 * 100$$

$$SGR (\% \text{ pr dag}) = (\ln(V_2) - \ln(V_1)) / (T_2 - T_1) * 100$$

$$\text{Finne areal} = \text{høyde (mm)} * \text{bredde (mm)}$$

Alt innsamlet materiale, resultat og øvrige analyser fra dette prosjektet inngår i Dr. grad arbeidet til Sara Calabrese, Marine Harvest. Deler av dette materialet er under analyse og vil bli offentliggjort i forbindelse med disputas og peer-review publisering (se tabell 7, Ferdigstilling av MS). Resultater fra dette arbeidet er presentert på EAS Aquaculture Europe i Trondheim, 2013, NFR-konferanse Trondheim, 2014, FHF konferanse, Trondheim, 2014. En kortfattet artikkel til Norsk fiskeoppdrett ‘Oppdrett av postsmolt laks i semi-lukkede system; Krav til fisketetthet og vannforbruk’ ble publisert i oktober 2014 (ref). Utover dette vil de første to MS fra prosjektet bli sendt til publisering i internasjonalt tidsskrift våren 2015. Gjenstående materiale som er under analyse innbefatter både vev (skinn og hjerne) og blod plasma. Dette materialet vil bli undersøkt mhp. ulike biologiske markører som vil bli påvirket av endringer i vannkvalitet herunder, total gjelle NKA, ammoniakk-transportere som Rhcg1/2, evt. også NHE og H-ATPase (Kolarevic, et al., 2012). α -MSH, plasma cortisol, cortisol reseptorer, forhold MR og GR, BDNF og NevroD mRNA nivå for nevrologisk plastisitet og læremulighet. Resultatene fra analysene vil, når de foreligger, sammenholdes med miljødata i karene (temperatur, salinitet, pH, O₂, CO₂, TAN).

Tabell 7. Gjennomført tidsplan for Postsmolt A (avsluttes 01.07.13, NFR-OPP avsluttes desember 2014).

| Aktiviteter og milepæler | 2012 | | | | 2013 | | | | 2014 | | | |
|--|------|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Oppgave | | | | | | | | | | | | |
| Innlevering av prosjektplan til FHF | | | X | | | | | | | | | |
| Planlegging av forsøk | | | X | | | | | | | | | |
| Gjennomføring av forsøk | | | X | x | | | | | | | | |
| Leveranse av første statusrapport | | | | x | | | | | | | | |
| Analyse og statistisk opparbeidelse av innsamlet materiale | | | | | x | x | x | | | | | |
| Innlevering av sluttrapport til FHF | | | | | | | x | | | | | |
| Ferdigstilling av MS (videreføres i OPP, merket stor X) | | | | | | | x | x | X | X | X | X |

Statistisk behandling av data

Alle verdier som er gitt i de ulike figurer og tabeller er gitt som gjennomsnittsverdier (\pm SE), eller \pm observasjonsområde (velferdsdata), og med forsøkskar som statistisk enhet. All statistisk analyse er gjennomført ved bruk av programmet Statistica 64, bortsett fra velferdsdata (se under). I forkant av hver analyse ble alle data log-transformerte og testet for normalitet samt homogen varians mellom de ulike grupper ved hjelp av en Kolmogorov-Smirnov test og en Hartley F-max test (Sokal and Rolf 1995). De ulike snittverdiene er testet mot hverandre ved hjelp av to-veis nested ANOVA (GLM) etterfulgt av enveis ANOVA og Student Newman Keul test hvis resultatene fra GLM analysen viste signifikant effekt. Eventuelle korrelasjoner mellom forsøksbehandling (tetthet) og SGR ble analysert ved bruk av multippel regresjon. Alle data knyttet til velferdsscore ble analysert ved bruk av GLM modell for multivariate datasett, etterfulgt av Tukey post-hoc test. Eventuelle effekter av variabelt oksygennivå på SGR ble testet ved bruk av en GLM Co-variensanalyse (O_2 som co-variater). For alle testene ble signifikansnivået satt til 0.05.

3. Leveranser til FHF under prosjektperioden

Dette prosjektet har hatt følgende leveranser til FHF:

1. Referat fra møte med styringsgruppen 20.08.2012 og en fullstendig forsøksplan basert på diskusjoner med styringsgruppen.
Leveret: 1. september, 2012.
2. Referat fra møte med styringsgruppen, herunder gjennomgang av resultat fra forsøket.
Leveret: 15.12.2012.
3. Statusrapport til FHF som oppsummerte de viktigste resultatene av økende fisketetthet og redusert vannforbruk på tilvekst og overlevelse hos postsmolt av laks.
Leveret: 18. januar, 2013.
4. Sluttrapport til FHF. Rapporten synliggjør anbefalte grenseverdier for vannforbruk og fisketetthet basert på analyser hentet inn under forsøksperioden.
Leveret: 01.12.14.
5. En artikkel til Norsk Fiskeoppdrett; 'Oppdrett av postsmolt laks i semi-lukkede system; Krav til fisketetthet og vannforbruk'. Publisert i oktober 2014 (ref).
6. To stk manuskript til internasjonal journal m/referee-ordning; MS1: Stocking density limits for postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in semi-closed sea. MS2: system specific waterflow required by postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in semi-closed sea systems.

4. Organisering av prosjektet (Del A)

Prosjektet har blitt ledet av Sigurd Handeland, Uni Research AS sammen med en styringsgruppe bestående av; Cato Lyngøy (MH) (leder styringsgruppe), Ørjan Tveiten (MH) (vara for Lyngøy), Harald Sveier (Lerøy), Frode Mathisen (Grieg), Svein Martinsen (SKS) og Erlend Haugarvoll (Lingalaks). I tillegg til styringsgruppen har prosjektet støttet seg til en referanse gruppen bestående av følgende personer; Albert Imsland (AkvaPlan NIVA), Brit Hjeltnes (VI), Torstein Kristensen (NIVA), Bjørn Olav Rosseland (UMB), Torbjørn Åsgård (Nofima) og Gunnar Stein Gunnarsson (LV). Straks prosjektet ble godkjent ble det etablert en prosjektgruppe med ansvar for gjennomføring og innrapportering av resultat til FHF. Prosjektgruppen har bestått av prof. Sigurd Stefansson (UIB), Dr. Tom Ole Nilsen (UIB), Dr. Lars Ebbesson (UNI), Dr. Bendik Fyhn Terjesen (Nofima), Dr. Harald Takle (Nofima), prof. Sveinung Fivelstad (HIB) Dr. Camilla Hosfeld (HIB), Dr. Åse Åtland (NIVA) og Dr. Hans Teien (UMB).

5. Resultater

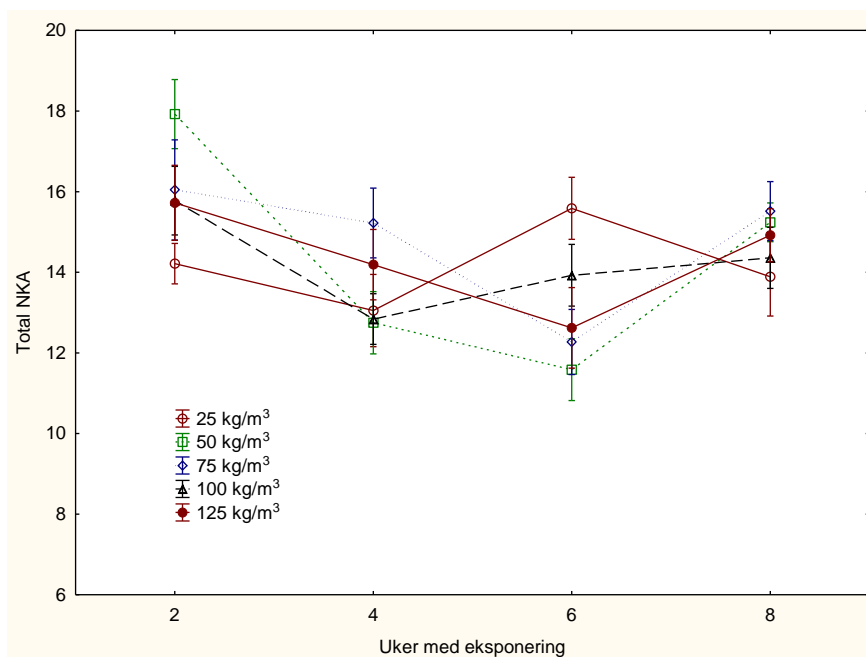
Denne rapporten oppsummerer ett utvalg resultat fra prosjektet (opparbeidet pr. 01.11.14). Øvrig materiale som er under opparbeidelse vil fremlegges i forbindelse med avsluttende Dr. grad arbeid til Nærings-PhD Sara Calabrese.

Resultat fra tetthetsforsøk

Ingen dødelighet av fisk relatert til behandlingene ble observert gjennom forsøksperioden.

Total gjelle NKA

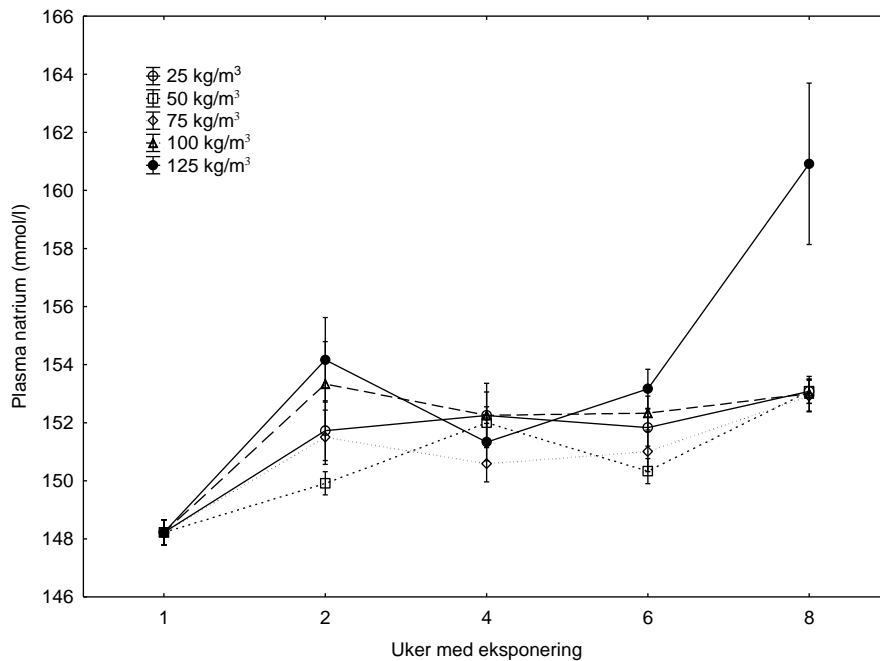
Resultatene fra total NKA analysen viste jevnt stabile verdier i alle gruppene i perioden fra uke 2 til 8 (Fig 3). Det ble i denne perioden ikke funnet noen signifikante forskjeller i total NKA nivå mellom gruppene.



Figur 3. Total gjelle NKA ($\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1}\text{h}^{-1}$) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Plasma natrium

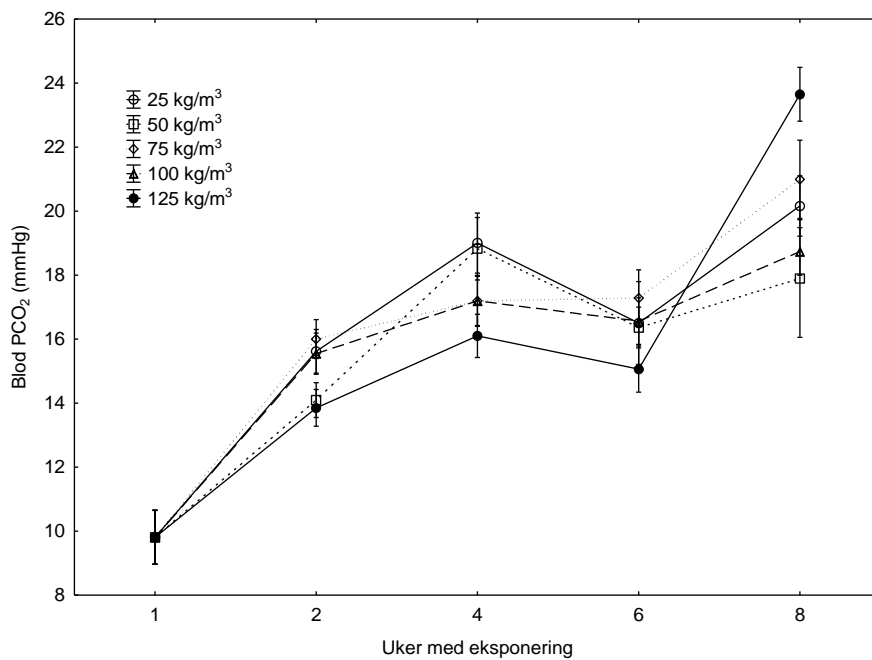
Plasma natrium nivået var signifikant påvirket av både tetthet og antall uker med eksponering til tetthetsbehandlingene ($p < 0.05$, Fig 4). For alle gruppene ble det registrert en svak økning i plasma natrium nivå de første to ukene av forsøket. I perioden fra uke 2 til uke 6 ble det ikke registrert noen endring i plasma natrium nivå i noen grupper. Siste periode ble det imidlertid registrert en signifikant økning i plasma natrium nivået i 125 kg/m³ gruppen ($p < 0.05$). Tilsvarende økning ble ikke registrert i de andre gruppene.



Figur 4. Plasma natrium (mmol/l) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Blod PCO₂

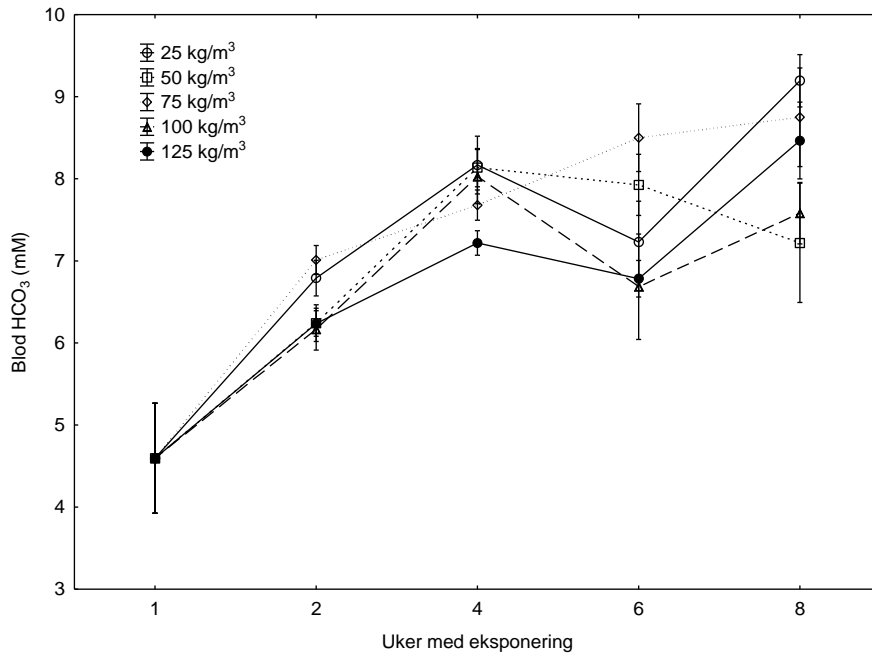
Blod PCO₂ nivået var signifikant påvirket av antall uker med eksponering ($p < 0.05$, Fig 5) og viste en generell og økende trend de første fire ukene av forsøket. I perioden fra uke 4 til uke 6 ble det observert en stabilisering av blod PCO₂ i alle grupper, hvorefter verdiene fortsatte å stige frem til forsøksavslutning. Høyest blod PCO₂ nivå ved forsøksavslutning, 23.6 mmHg, ble registrert i 125 kg/m³ gruppen og som på dette tidspunktet var signifikant høyere enn 50 og 100 kg/m³ gruppene ($p < 0.05$).



Figur 5. Blod PCO₂ (mmHg) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Blod HCO₃

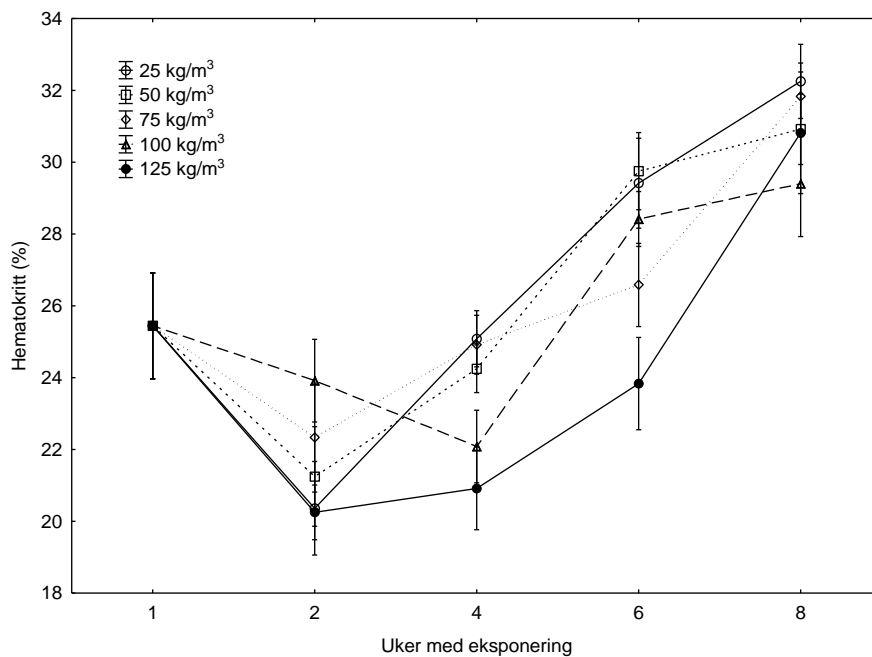
Blod HCO₃ (mM) var signifikant påvirket av eksponeringstid og gruppe ($p < 0.05$, Fig 6). I alle grupper ble det registrert en signifikant økning i Blod HCO₃ de første fire ukene av forsøket ($p < 0.01$), etterfulgt av en periode med stabilisering. Det ble ikke registrert noen signifikant forskjell mellom de ulike forsøksgruppene ved avslutning av uke 8.



Figur 6. Blod HCO₃ (mM) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Hematokritt

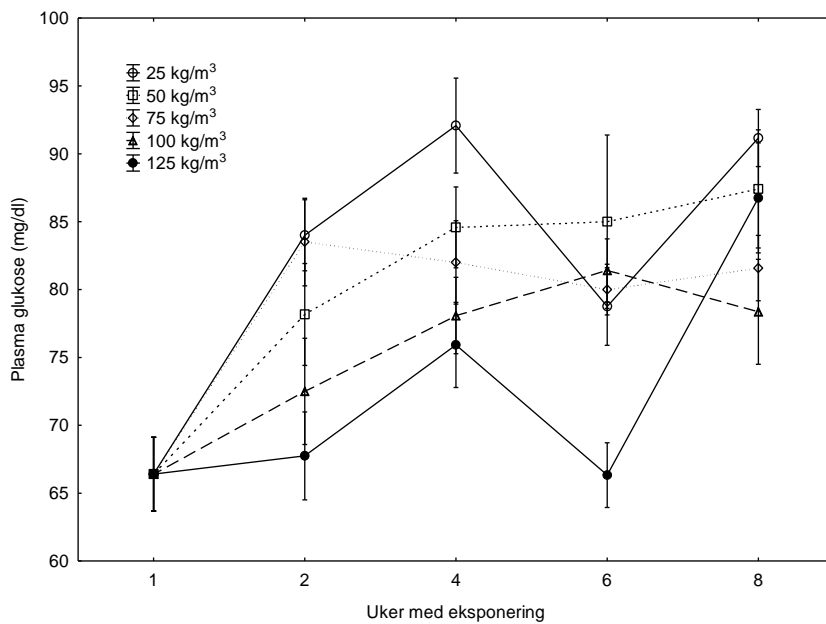
Hematokritt verdien i blodet var signifikant påvirket av både tidsforløp ($p < 0.001$) og fisketetthet ($p < 0.05$, Fig 7). Midlet over hele forsøksperioden hadde 125 kg/m^3 gruppen ett signifikant lavere hematokrittnivå enn de andre forsøksgruppene ($p < 0.05$). For alle grupper ble det registrert en reduksjon i hematokritt de første 2-4 ukene av forsøket, etterfulgt av en signifikant økning i alle grupper fra uke 4 og frem mot uke 8 ($p < 0.001$). Ved forsøksavslutning ble det ikke registrert noen signifikant forskjell mellom noen tetthetsgrupper.



Figur 7. Hematokritt (%) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m^3). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Plasma glukose

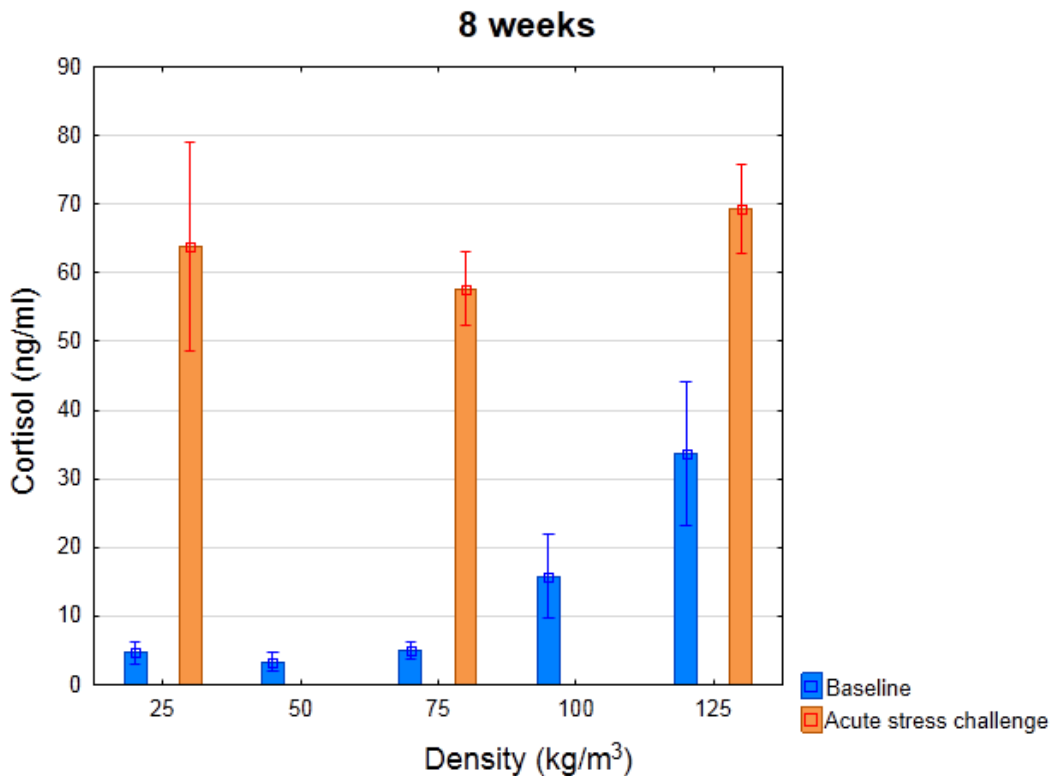
Resultatene fra forsøket viste at plasmaglukose nivået var signifikant influert av både fisketetthet og eksponeringstid ($p < 0.001$, Fig 8). Høyeste plasmaglukose nivå ble registrert i 25 kg/m³ gruppen (83 mg/dl) etter fulgt av gruppene på 50, 75, 100 og 125 kg/m³ og som viste nivåer på henholdsvis 80.7, 79.1, 75.6 og 72.8 mg/dl. Over hele forsøksperioden viste resultatene signifikant lavere glukose verdi i både 100 og 125 kg/m³ gruppene sammenliknet med de øvrige grupper ($p < 0.05$).



Figur 8. Plasma glukose (mg/dl) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Plasmakortisolnivå

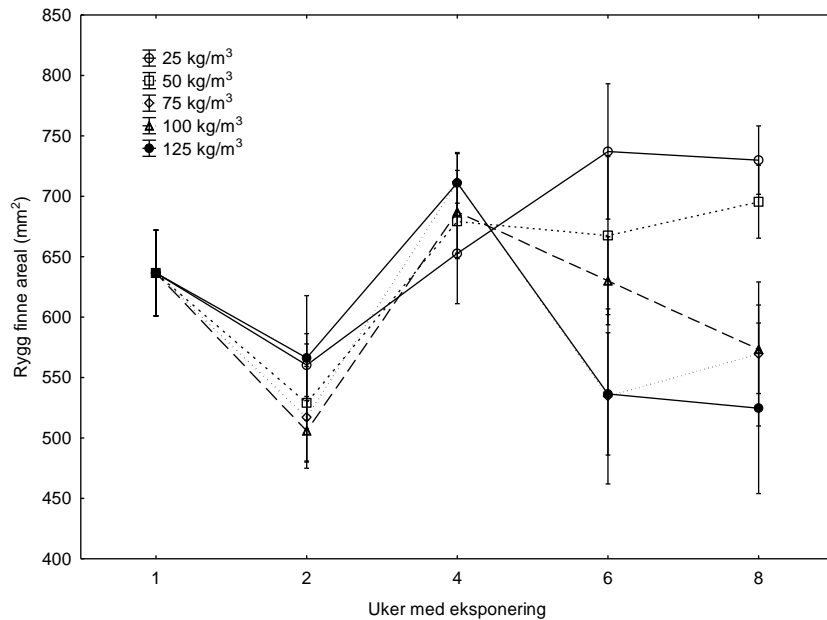
Plasmakortisol analysen ble gjennomført etter 8 uker behandling og viste ingen signifikante forskjeller mellom de tre laveste tetthetsgruppene (25, 50 og 75 kg/m³, Fig 9). Høyest plasmakortisolnivå ble registrert i 125 kg/m³ gruppen, hvilket også var signifikant høyere enn i de tre laveste tetthetsgruppene, 25, 50 og 75 kg/m³.



Figur 9. Plasmakortisol nivå (ng/ml) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Figuren viser basalnivå samt nivå etter en 30 min akutt challenge test (Challenge test delen av forsøket inngår ikke i OPP-Del A). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, ± S.E.

Ryggfinneareal

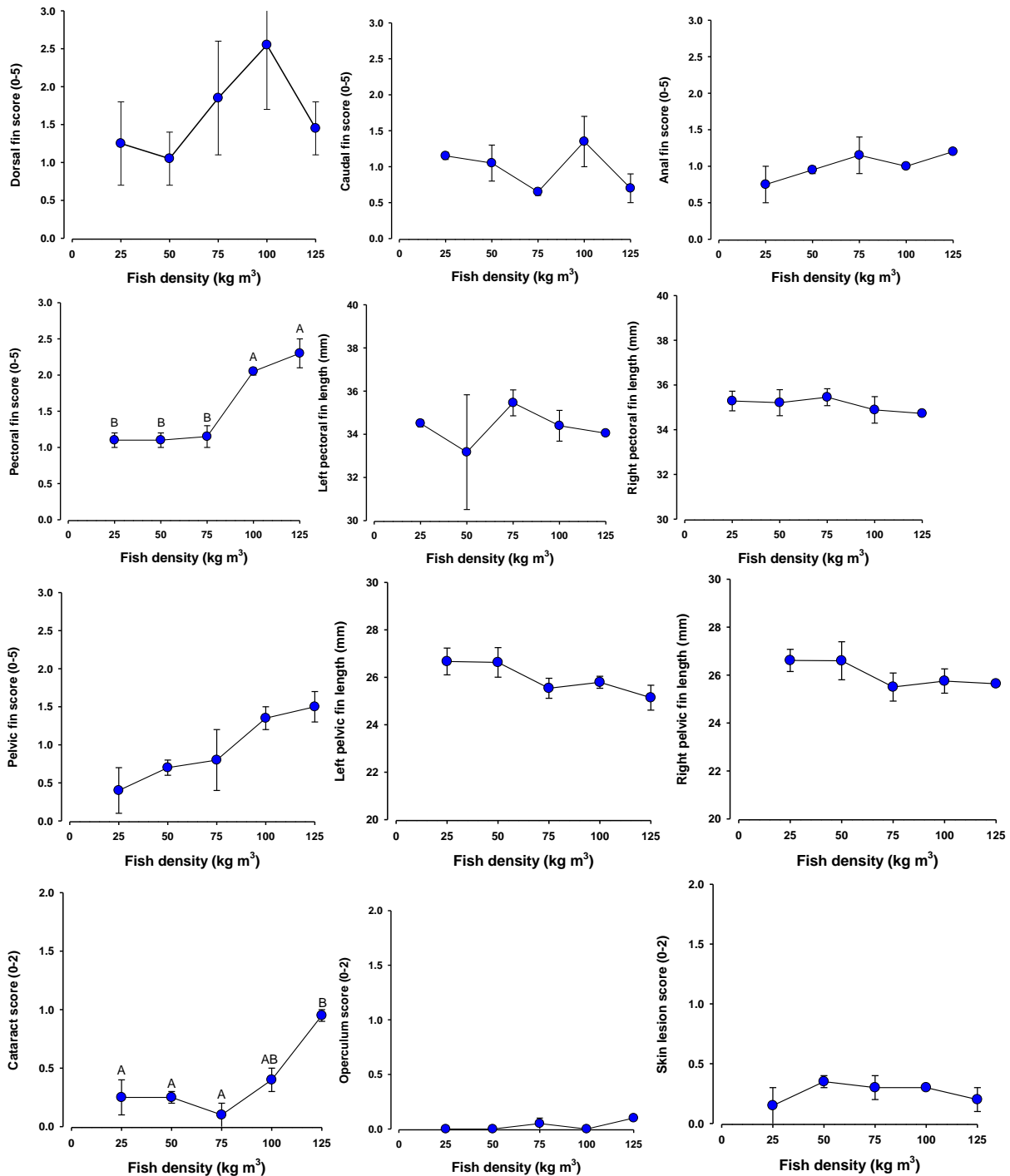
Ryggfinnearealet til fiskene var signifikant påvirket av tetthet og eksponeringstid ($p < 0.05$, Fig 10). En videre analyse av finneareal status etter 8 uker viste et signifikant lavere finneareal i 125 kg/m^3 gruppen sammenliknet med 25 kg/m^3 gruppen ($p < 0.05$).



Figur 10. Ryggfinne areal (mm^2) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m^3). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Velferdsindikatorer

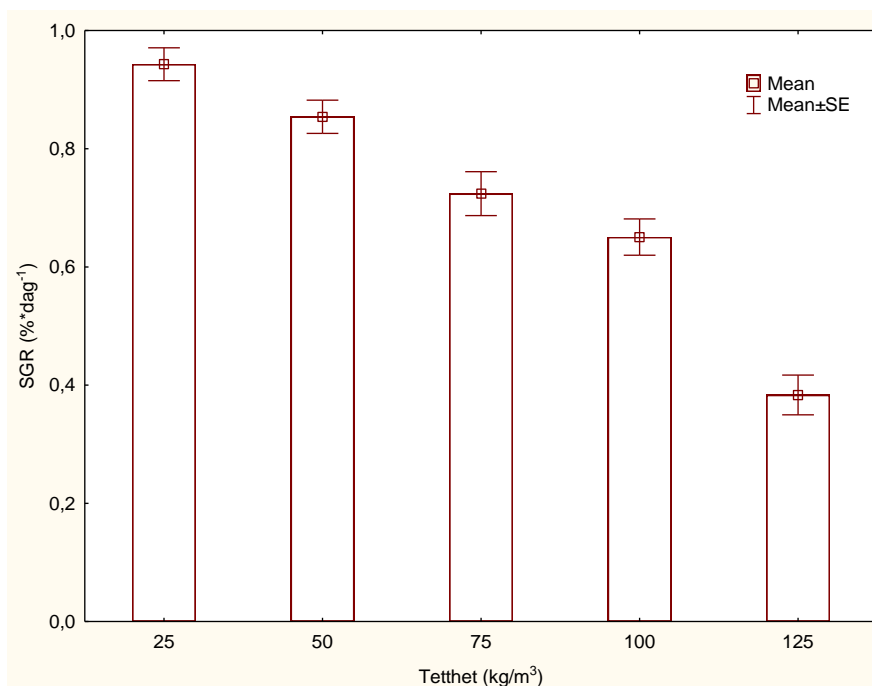
Dette forsøket viste flere forskjeller i registrerte velferdsindikatorer, herunder tilstanden til brystfinne og katarakt som begge var signifikant korrelert til tettheter høyere enn 75 kg/m³ (p<0.05, Fig 11). En tilsvarende trend ble observert m.h.p. bukfinne som viste større grad av skader ved høyere tettheter (p<0.01).



Figur 11. Ytre velferdsindikatorer målt hos postsmolt eksponert for økende fisketetthet. Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av ti fisk per kar, ± observasjonsområde. Behandlinger som viser ulik bokstav indikerer signifikante forskjeller mellom de ulike registrerte parametre (p<0.05).

Spesifikk vekstrate, biomassetilvekst, fôrfaktor, fôrutnyttelse og appetitt.

Start og sluttvekt på fiskene er gitt i tabell 6. Resultatene fra forsøket viste at SGR fra den individmerkede fisken var signifikant påvirket av tetthetsnivået i tanken ($p < 0.01$, Fig 12). For alle gruppene avtok SGR med økende tetthet. Mellom de fire første tetthetsgruppene, 25, 50, 75 og 100 kg/m^3 ble det registrerte en prosentmessig reduksjon i SGR på henholdsvis 9, 15 og 9 %. Mellom 100 og 125 kg/m^3 gruppene ble det imidlertid observert en reduksjon i SGR på 42 %. Når SGR beregnes på bakgrunn av hele biomassen i karet for de to periodene (0-4, 4-8, Tabell 7), var nedgangen i veksthastighet med økende tetthet utpreget i alle forsøksgrupper, i forhold til 25 kg/m^3 i løpet av de 4 første ukene. Mellom 4 og 8 uker derimot, var veksten redusert i 25 kg/m^3 og 125 kg/m^3 gruppene i forhold til øvrige grupper ($p < 0.05$). Gjennom hele forsøksperioden (0-8 uker) var det ingen større forskjell i biomasse SGR mellom 25, 50 og 75 kg/m^3 gruppene, i motsetning til 100 og 125 kg/m^3 gruppene hvor det ble registrert en reduksjon i SGR fra 0.59 til 0.29 % pr dag. Dette utgjør en 50 % reduksjon i SGR mellom disse gruppene. Parallelt med vekstreduksjonen ble det for samme grupper også registrert en økning i fôrfaktor (1.01 mot 1.63), en reduksjon i fôrutnyttelse (0.99 mot 0.61) og en reduksjon i appetitt (0.22 mot 0.17, tabell 8). Regresjonsanalysen viste en signifikant lineær negativ trend i SGR mellom 25 og 100 kg/m^3 gruppene ($\text{SGR}_{25-100} = 1.0454 - 0.0041 * X$, $r^2 = 0.92$, $p < 0.001$). Tilsvarende analyse mellom 100 og 125 kg/m^3 gruppene gav følgende resultat: $\text{SGR}_{100-125} = 1.7085 - 0.0106 * X$, $r^2 = 0.83$, $p = 0.08$. SGR for alle behandlinger kan beskrives gjennom funksjonen: $\text{SGR-alle} = 0,9727 - 0,0008 * x - 3,0118E-5 * x^2$.



Figur 12. Spesifikk vekstrate (%*dag⁻¹) hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av 20 fisk per kar, ± S.E.

Tabell 6. Start og sluttvekt (gr) på forsøksfisken i tetthetsforsøket.

| | 125 kg/m ³ | | 100 kg/m ³ | | 75 kg/m ³ | | 50 kg/m ³ | | 25 kg/m ³ | |
|-------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) |
| Start punkt | 111,2 | 21,8 | 114,4 | 22,1 | 119,9 | 22,7 | 118,4 | 22,4 | 111,1 | 21,9 |
| SD | 13,9 | 1,0 | 10,8 | 0,9 | 16,8 | 2,4 | 14,2 | 1,0 | 10,0 | 0,9 |
| Stopp punkt | 147,4 | 24,3 | 181,1 | 25,8 | 202,4 | 26,6 | 217,9 | 27,1 | 217,4 | 26,7 |
| SD | 30,7 | 1,6 | 28,1 | 1,4 | 45,9 | 1,9 | 41,5 | 1,6 | 31,3 | 1,4 |

Tabell 7. Biomassetilvekst (%*dag⁻¹) hos forsøksfisken i tetthetsforsøket.

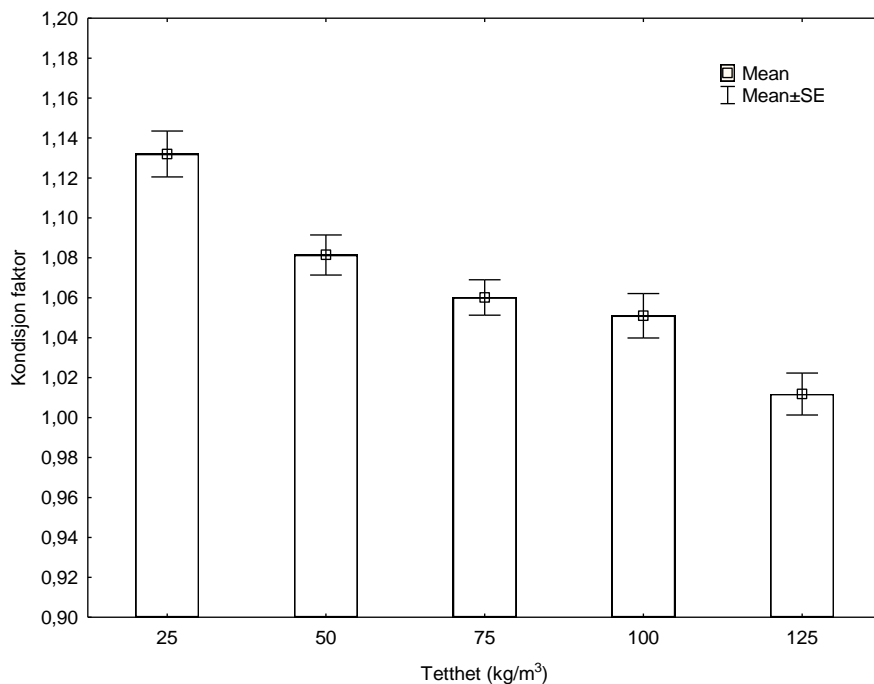
| Periode | 25 kg/m ³ | 50 kg/m ³ | 75 kg/m ³ | 100 kg/m ³ | 125 kg/m ³ |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0-4 uker | 0.90 | 0.70 | 0.58 | 0.44 | 0.23 |
| 4-8 uker | 0.51 | 0.75 | 0.76 | 0.74 | 0.36 |
| 0-8 uker | 0.71 | 0.72 | 0.67 | 0.59 | 0.29 |

Tabell 8. Registrert fôrfaktor, fôrutnyttelse og appetitt på forsøksfisken i tetthetsforsøket.

| Periode | 25 kg/m ³ | 50 kg/m ³ | 75 kg/m ³ | 100 kg/m ³ | 125 kg/m ³ |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Fôrfaktor | 0.87 | 1.12 | 1.06 | 1.01 | 1.63 |
| Fôrutnyttelse | 1.16 | 0.89 | 0.94 | 0.99 | 0.61 |
| Appetitt | 0.13 | 0.25 | 0.24 | 0.22 | 0.17 |

Kondisjon

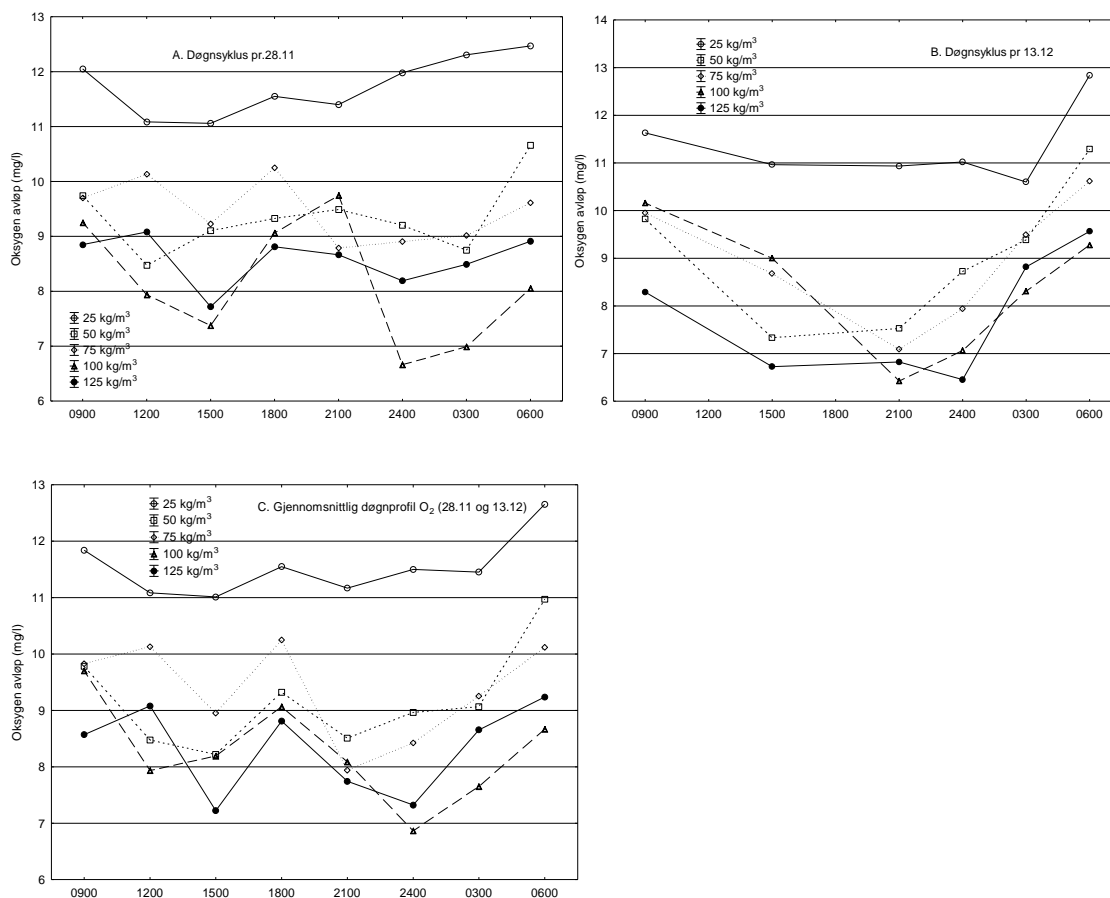
Endring i kondisjon fulgte samme mønster som observert for SGR (Fig 13). Den statistiske analysen viste ett signifikant fall i kondisjon mellom gruppene på 25 og 50 kg/m³ (p<0.01). For de neste tre gruppene 50, 75 og 100 kg/m³ ble det ikke registrert noen signifikant forskjell hvoretter samme analyse viste ett signifikant fall i kondisjon mellom 100 og 125 kg/m³ gruppene (p<0.01).



Figur 13. Utvikling av kondisjon hos grupper av postsmolt laks under fem ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av 20 fisk per kar, ± S.E.

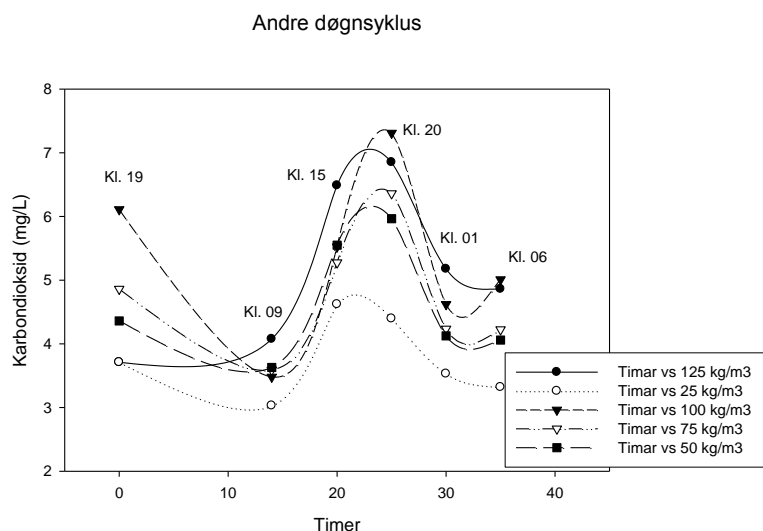
Vannkvalitet; Døgnvariasjon i O₂, CO₂ og TAN

Resultatene fra døgnsyklus analysen viste at det i særlig grad er kontrollgruppen som skiller seg fra de øvrige gruppene gjennom å inneha ett høyere oksygennivå i avløp (Fig 14abc). For de øvrige gruppene 50, 75, 100 og 125 kg/m³ viser resultatene ett klart overlapp i konsentrasjon. I de samme gruppene viser døgnsyklusmålingen pr 13.12 ett generelt fall i oksygennivå fra 9.9-8.3 mg/l til 7.5-6.5 mg/l i perioden fra kl 0900 og 2100 (SDA effekt, specific dynamic action of food). Effekten av variasjon i oksygen verdi i avløp på SGR er analysert for alle tidspunkt, herunder 28.11, 13.12 og gjennomsnittlige verdier (28.11+13.12). Resultatene fra alle analyser viste ett utslag av signifikant co-variasjon mellom SGR og oksygennivå, i.e prøven hentet inn kl 2400, gjennomsnittlig døgnprofil. En videre analyse av dette uttaket viste at det signifikante forholdet utelukkende var knyttet til 25 kg/m³ gruppen som hadde høyest oksygennivå i avløp. For alle andre klokkeslett, samt for gruppene 50, 75, 100 og 125 kg/m³ alle klokkeslett, ble det ikke funnet noen signifikant sammenheng mellom SGR og oksygennivå.

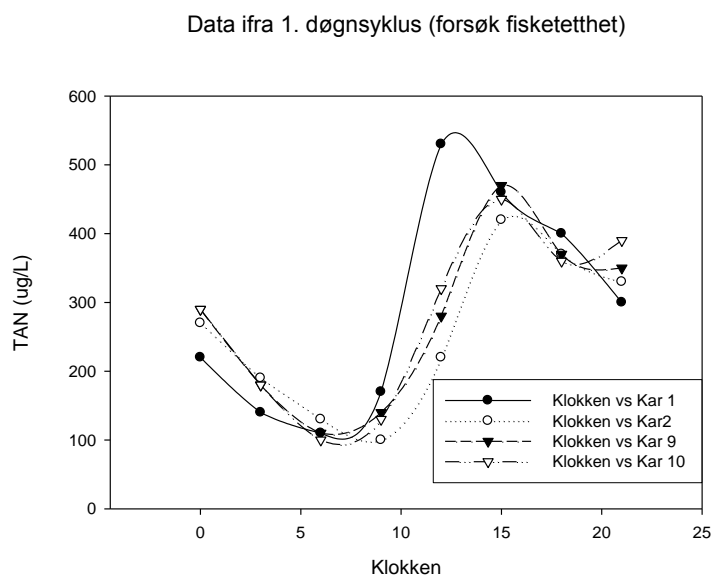


Figur 14abc. Resultat fra døgnsyklusanalyser av oksygennivå fra i tetthetsforsøket. A: Døgnsyklus pr 28.11, B: Døgnsyklus pr 13.12 og C: Døgnsyklus pr 28.11 og 13.12.

I første døgnsyklus var høyest målte karbondioksid-konsentrasjon ca 8 mg/L i alle kar, mens høyest målte konsentrasjon i andre døgnsyklus var ca 7 mg/L (Fig 15). De fleste målingene var mellom 3 og 6 mg/L i begge døgnsyklusene. I tetthetsforsøket var det lave konsentrasjoner av total TAN mellom kl. 03.00 og kl. 09.00 under første døgnsyklus (Fig 16). I de fleste fiskekarene ble det høyeste TAN nivået målt kl. 15.00. Det ble registrert en økning i TAN konsentrasjon på 4-5 ganger fra morgen til ettermiddag i dette forsøket.



Figur 15. Døgnvariasjon i CO₂ (mg/l) i karutløp, hos grupper av postsmolt laks under ulike tetthetsnivå (25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³). Antall timer er over 24, siden undersøkelsen ble startet med en måling kl. 19 dagen før det mer hyppige prøveuttaket ble startet.

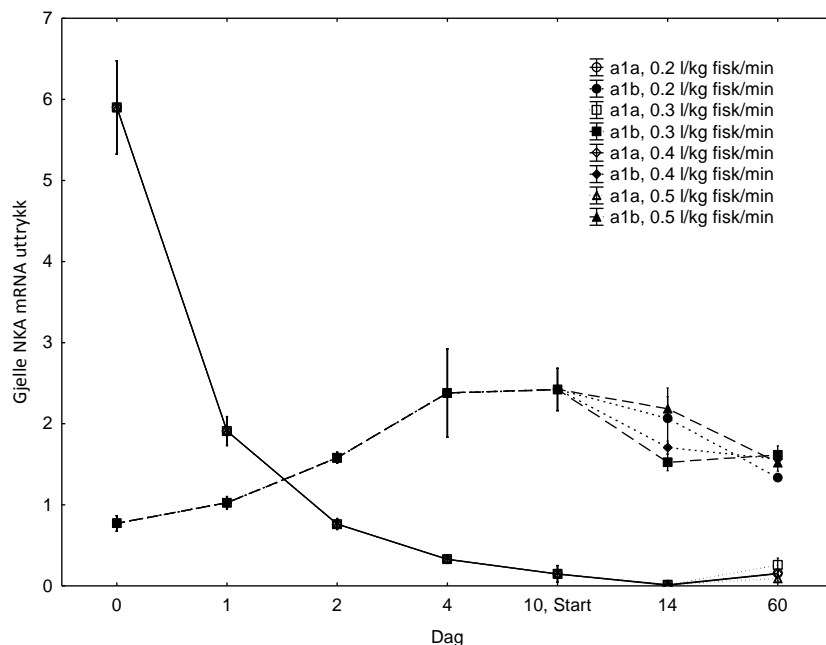


Figur 16. Døgnvariasjon i TAN hos grupper av postsmolt laks under ulike tetthetsnivå (Kar 1 og 10=125 kg/m³, Kar 2 og 9=75 kg/m³).

Ingen dødelighet av fisk relatert til behandlingene ble observert gjennom forsøksperioden.

Gjelle NKA α 1a og α 1b mRNA uttrykk

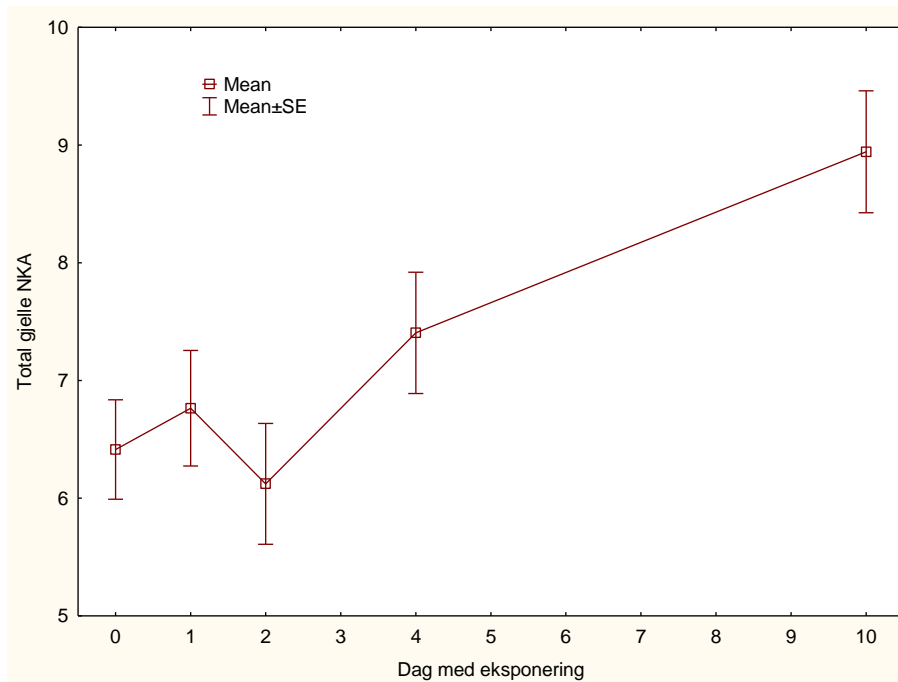
En oversikt over dokumentert smoltkvalitet, her karakterisert som endring i genuttrykk for ionetransporterne NKA α 1a og α 1b, er vist i Figur 17. Den statistiske analysen viste at genuttrykk for både NKA α 1a og α 1b var signifikant påvirket av tid ($p < 0.01$). Uttrykk av NKA α 1a viste en klar nedgang i perioden fra dag 0 til dag 10, i motsetning til NKA α 1b som ble signifikant oppregulert. Det ble ikke observert noen forskjeller mellom gruppene.



Figur 17. Endring i genuttrykk for ionetransporterne NKA α 1a og α 1b under sjøvannstilvenning. Ved dag 0 gikk fiskene i ferskvann. Vannkvaliteten ble deretter endret til henholdsvis 17 promille frem mot dag 1, 25 promille frem mot dag 2 og 34 promille frem mot dag 4. Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Total gjelle NKA under tilvenning til sjø

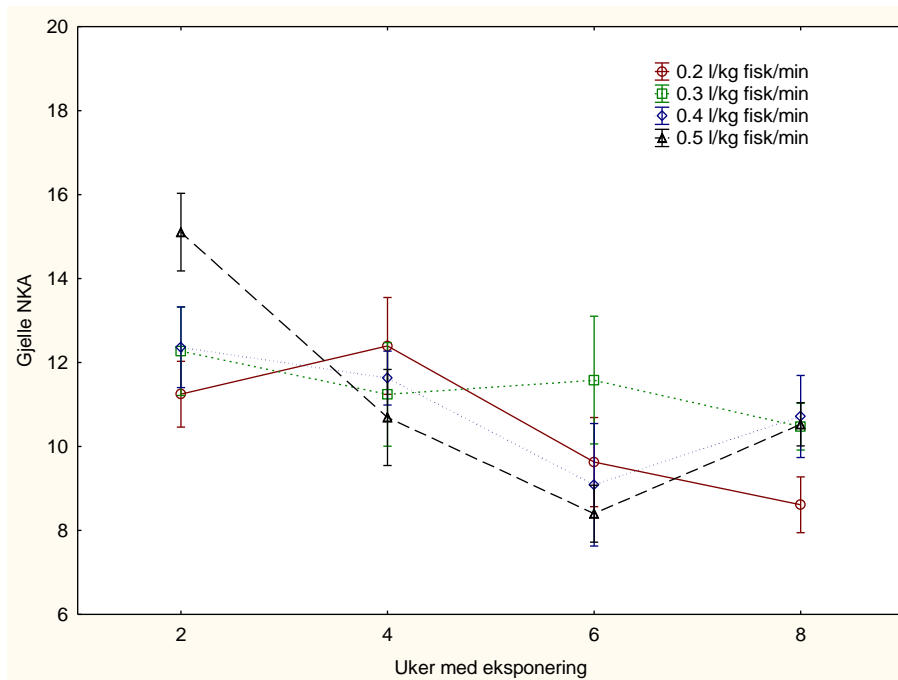
NKA resultatene viste kun mindre endringer i total NKA nivå de første to dagene etter tilvenning til brakkvann (Fig 18). Vannkvaliteten ble endret fra 0 til 17 promille frem mot dag 1 og deretter fra 17 til 25 promille frem mot dag 2. I perioden fra dag 2 til dag 10 økte saliniteten fra 25 til 34 ppt. Parallelt med denne økningen ble det registrert en signifikant økning i total NKA aktivitet ($p < 0.01$).



Figur 18. Endring i total NKA aktivitet ($\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1}\text{h}^{-1}$) under sjøvannstilvenning. Ved dag 0 gikk fiskene i ferskvann. Vannkvaliteten ble deretter endret til henholdsvis 17 promille frem mot dag 1, 25 promille frem mot dag 2 og 34 promille frem mot dag 4. Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Total gjelle NKA

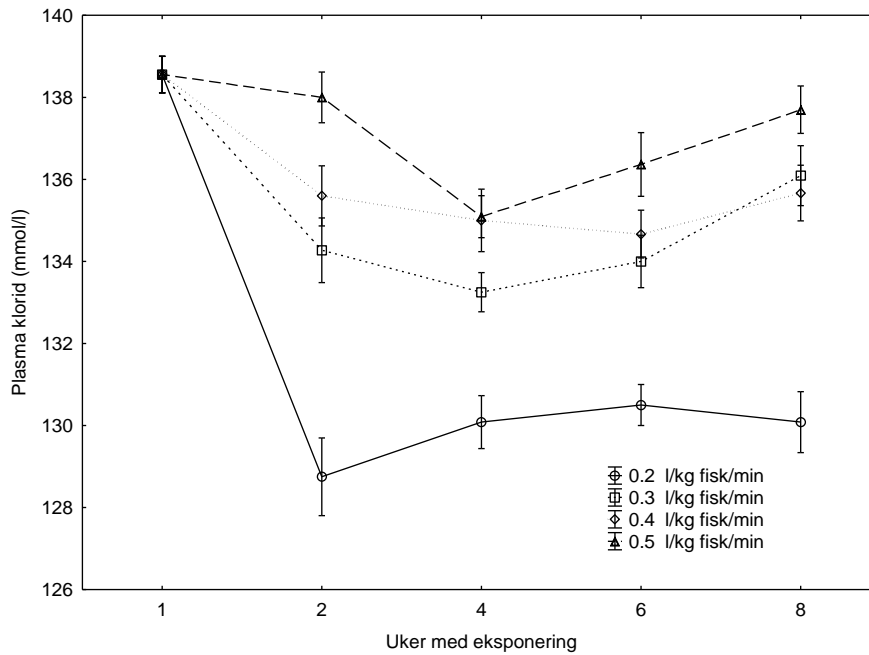
Resultatene fra total NKA analysen viste jevnt stabile verdier i alle gruppene under hele forsøksperioden (uke 2-8, Fig 19). Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i total NKA nivå mellom gruppene.



Figur 19. Endring i total gjelle NKA ($\mu\text{mol ADP mg protein}^{-1}\text{h}^{-1}$) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Plasmaklorid

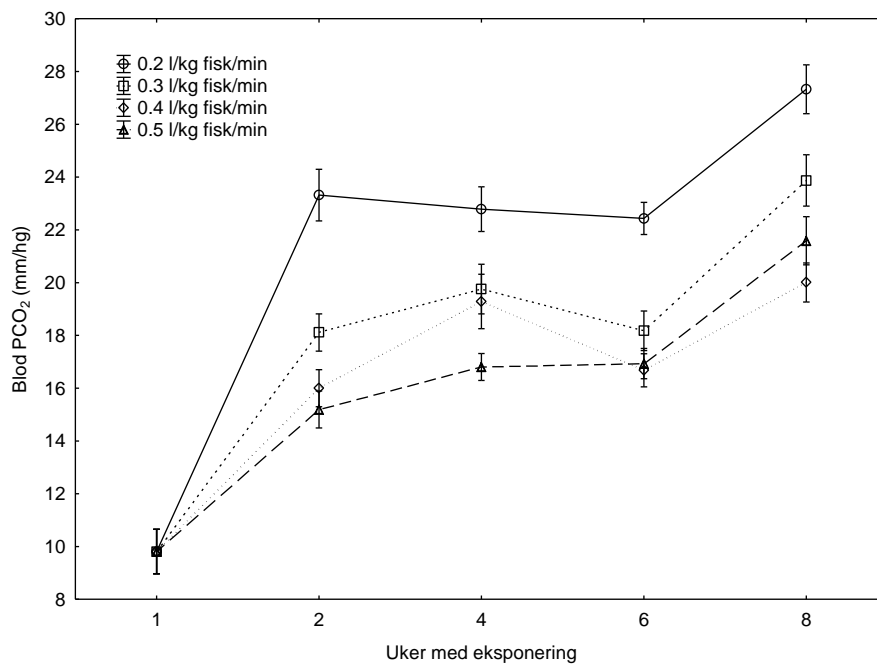
Resultatene fra vannforbruksforsøket viste at fiskenes plasmakloridnivå var signifikant avhengig av både eksponeringstid og spesifikt vannforbruk ($p < 0.001$, Fig 20). I alle forsøksgrupper ble det registrert en signifikant reduksjon i plasmaklorid nivå mellom første prøveuttak og uke 4 ($p < 0.01$). Fra uke 2 og frem til forsøkslutt var plasmakloridnivået i 0.2 l/kg fisk/min gruppen signifikant under de andre gruppene ($p < 0.01$).



Figur 20. Plasma klorid (mmol/l) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0.5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Blod PCO₂

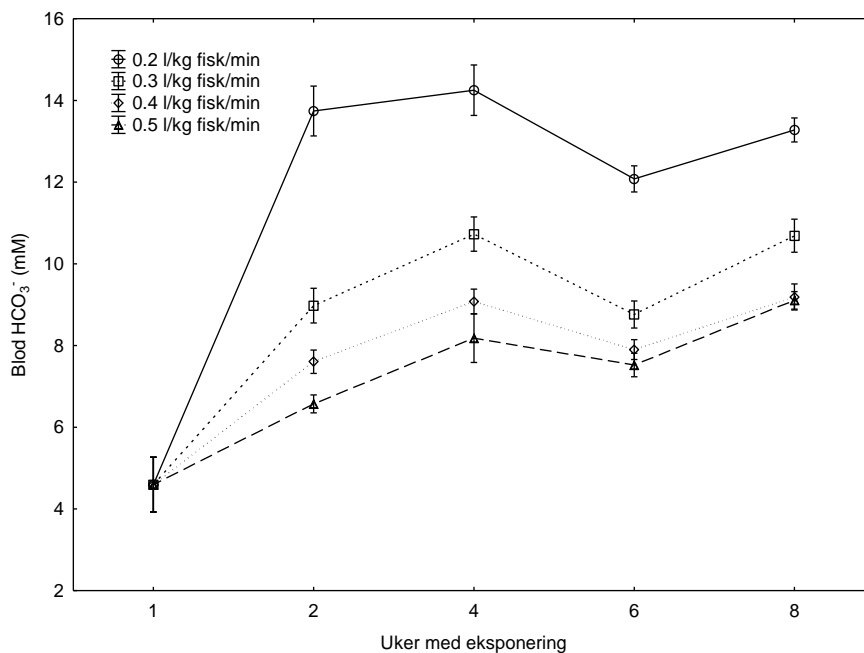
Blod PCO₂ nivå, her målt som mm/Hg, var signifikant påvirket av både spesifikt vannforbruk og antall uker med eksponering ($p < 0.001$, Fig 21). Generelt ble det i alle grupper observert en økning i PCO₂ nivå med økende tid ($p < 0.001$). Denne økningen var imidlertid mest fremtredende i 0.2 l/kg fisk/min gruppen som viste ett signifikant høyere PCO₂ nivå enn de andre gruppene f.o.m uke 2 og utover i forsøket ($p < 0.01$). Etter 8 uker i forsøket viste både 0.2 og 0.3 l/kg fisk/min gruppene ett høyere PCO₂ nivå enn 0.4 l/kg fisk/min gruppen ($p < 0.05$).



Figur 21. Blod PCO₂ (mm/Hg) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0.5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Blod HCO_3^-

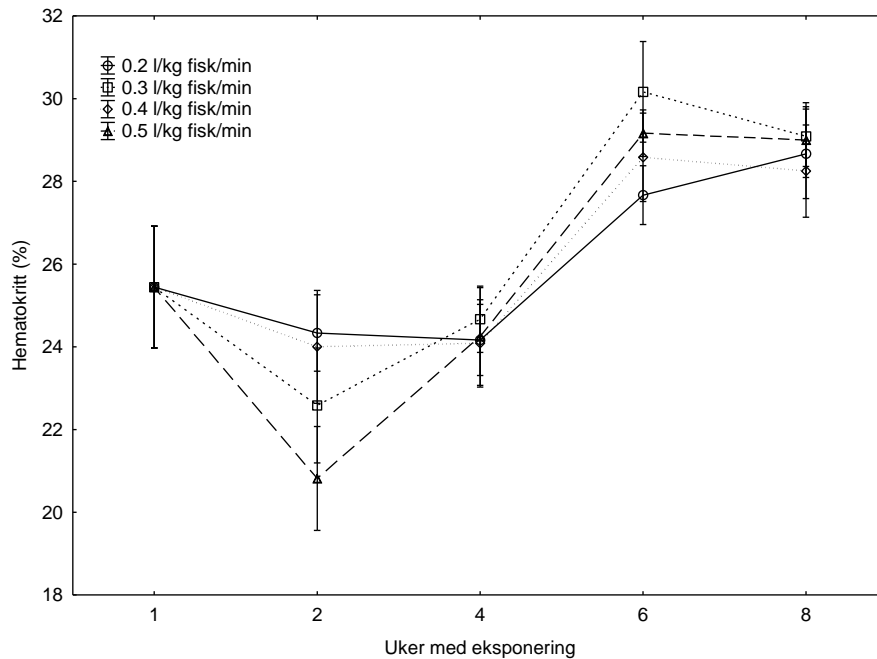
Utvikling av Blod HCO_3^- fulgte samme mønster som registrert for PCO_2 (Fig 22). I alle grupper ble det registrert en signifikant økning i HCO_3^- de første to ukene av forsøket ($p < 0.001$), etterfulgt av en periode med stabilisering. F.o.m. uke 2 og frem til forsøksavslutning var HCO_3^- nivået i 0.2 l/kg fisk/min gruppen signifikant høyere enn de andre gruppene ($p < 0.01$).



Figur 22. Blod HCO_3^- (mM) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0.5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Hematokritt

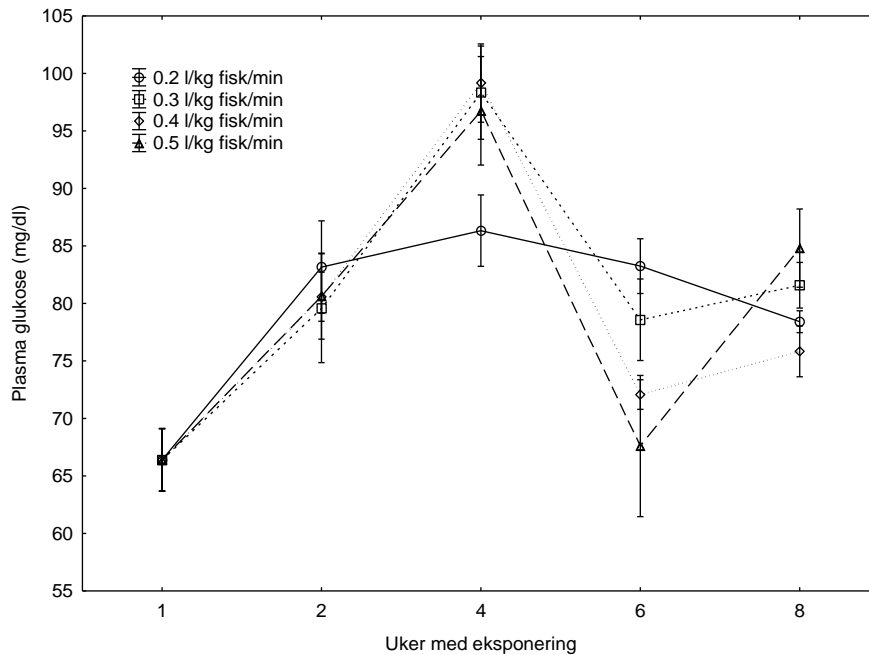
I vannforbrukforsøket ble det ikke registrert noen signifikant forskjell i hematokrittverdi mellom de ulike forsøksgruppene (Fig 23). Imidlertid ble det registrert en generell og signifikant økning i hematokrittverdi i alle grupper i perioden mellom uke 4 og uke 8 ($p < 0.05$).



Figur 23. Hematokritt hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Plasma glukose

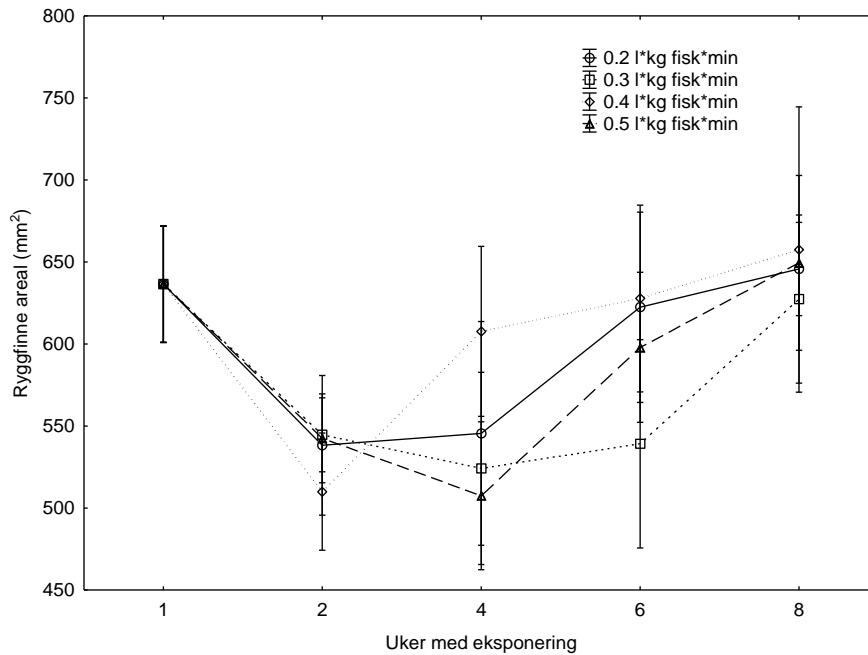
Det ikke registrert noen signifikant forskjell i plasma glukose verdi mellom de ulike forsøksgruppene (Fig 24). Det ble imidlertid målt en signifikant økning i plasma glukose nivå i alle grupper fra forsøks start og frem mot uke 4 ($p < 0.01$), etterfulgt av ett fall i glukose frem til uke 8.



Figur 24. Plasma glukose (mg/dl) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Ryggfinneareal

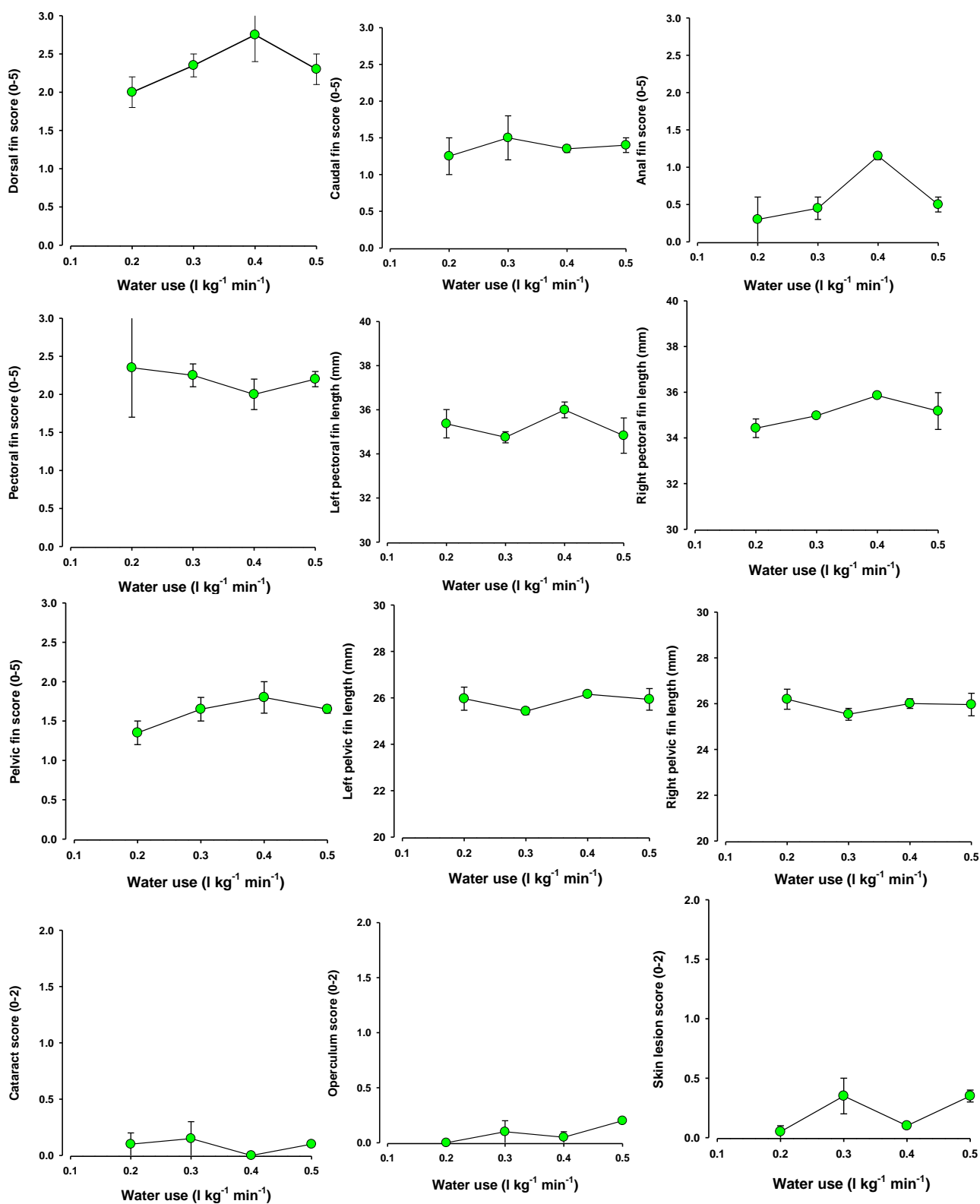
Vannforbruk forsøket viste ingen signifikant forskjell i ryggfinneareal mellom de ulike forsøksgruppene (Fig 25). Det ble imidlertid målt en generell og signifikant reduksjon i ryggfinneareal frem mot uke 2 ($p < 0.05$). Etter uke 2 ble det ikke registrert noen endring i ryggfinneareal.



Figur 25. Ryggfinneareal (mm^2) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Velferdsindikatorer

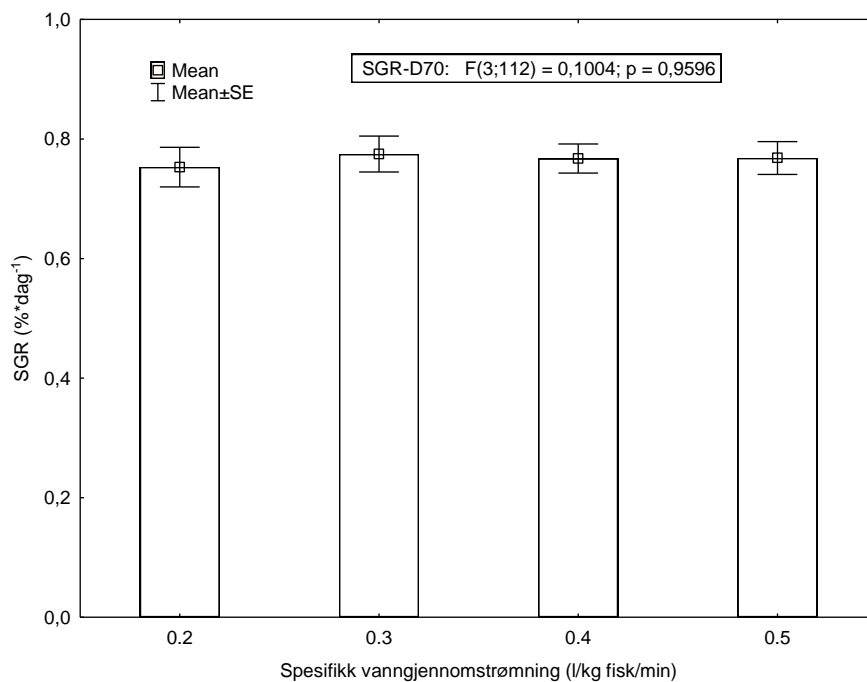
Resultatene fra velferdsindikator analysen viste ingen forskjeller mellom gruppene (Fig 26).



Figur 26. Ytre velferdsindikatorer målt hos postsmolt eksponert for ulike spesifikke vanngjennomstrømninger. Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av ti fisk per kar, ± observasjonsområde. Med unntak av finne lengde er dataene gitt som score (0-2, or 0-5) hvor høy verdi representerer økende alvorlighet av skade.

Spesifikk vekstrate

Gjennomsnittstørrelsen på all fisk ved merking (11.10.12) var ca 113 gram og det ble ikke registrert noen forskjeller i vekt mellom de ulike gruppene denne datoen. Ved avsluttende registrering (20.12.12) var tilsvarende gjennomsnittsvekt økt til ca 195 gram og det ble ikke registrert noen signifikant forskjell i størrelse og SGR mellom de gruppene (Fig 27). Start og sluttvekt på fiskene er gitt i tabell 9. En regresjonsanalyse av SGR viser ingen signifikant forskjell mellom noen tetthetsgrupper ($SGR = 0.7513 + 0.0407 * X$, $r^2 = 0.02$, $p = 0.72$).



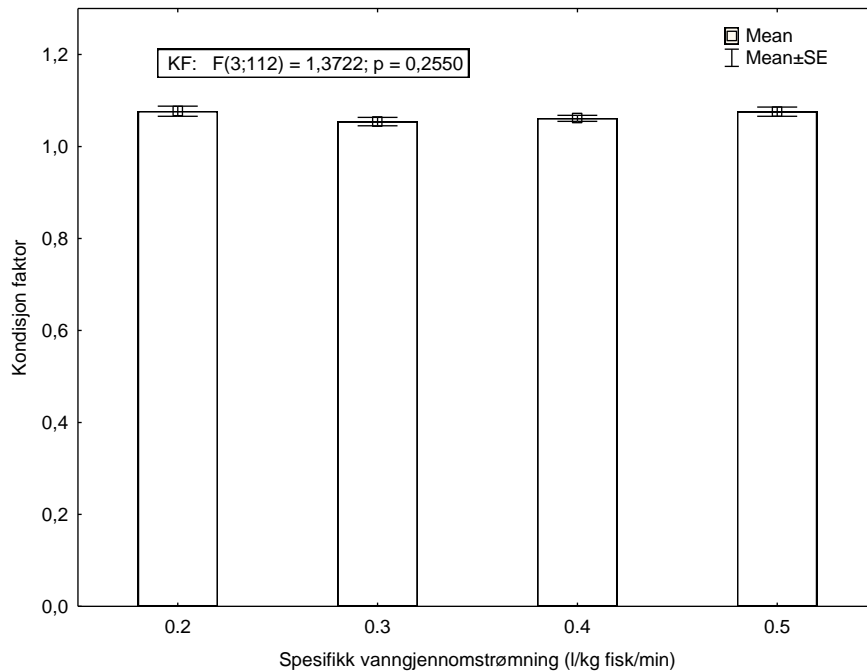
Figur 27. Spesifikk vekstrate (%*dag⁻¹) hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Resultat fra ANOVA analyse er gitt i rammen SGR-D70 (fra dag 0 til dag 70). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, ± S.E.

Tabell 9. Start og sluttvekt på forsøksfiskene i tetthetsforsøket.

| | 0.5 l/kg fisk/min | | 0.4 l/kg fisk/min | | 0.3 l/kg fisk/min | | 0.2 l/kg fisk/min | |
|-------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) | V (gr) | L (cm) |
| Start punkt | 108,7 | 21,7 | 110,7 | 21,8 | 113,8 | 22,0 | 121,1 | 22,7 |
| SD | 9,4 | 0,9 | 12,4 | 1,0 | 8,0 | 0,6 | 13,4 | 1,1 |
| Stopp punkt | 187,2 | 25,9 | 190,7 | 26,1 | 195,0 | 26,4 | 207,4 | 26,7 |
| SD | 26,3 | 1,2 | 30,1 | 1,4 | 25,8 | 1,0 | 39,2 | 1,8 |

Kondisjon

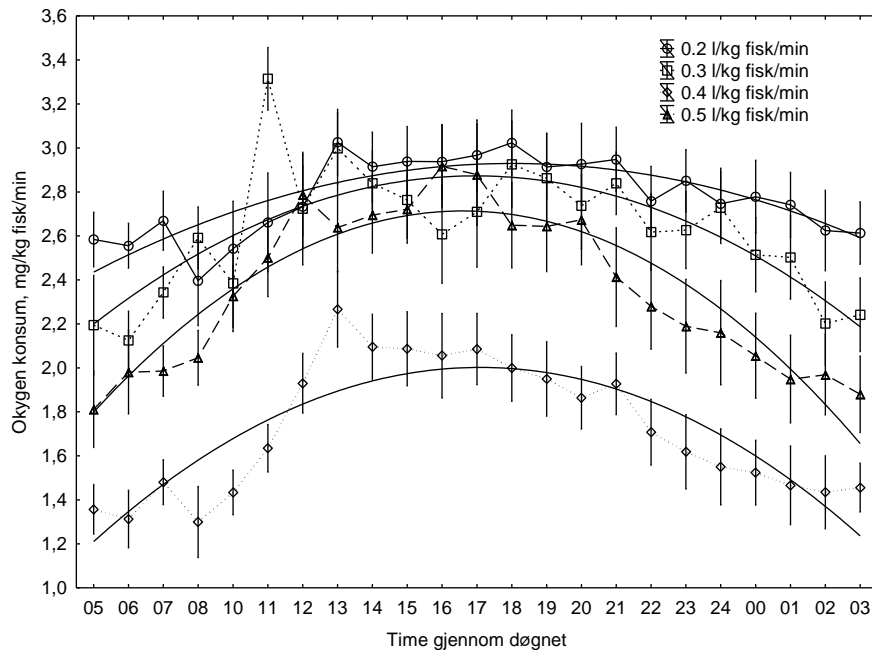
Utvikling av kondisjon viste samme mønster som for SGR. Ved forsøksavslutning var gjennomsnittlig kondisjon 1.07 (SD=0.06) og det ble ikke funnet noen signifikant forskjell mellom noen av tetthetsgruppene (Fig 28).



Figur 28. Utvikling av kondisjon hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0.5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, innhentet gjennom målinger av seks fisk per kar, \pm S.E.

Vannkvalitet; Døgnvariasjon i oksygenkonsum

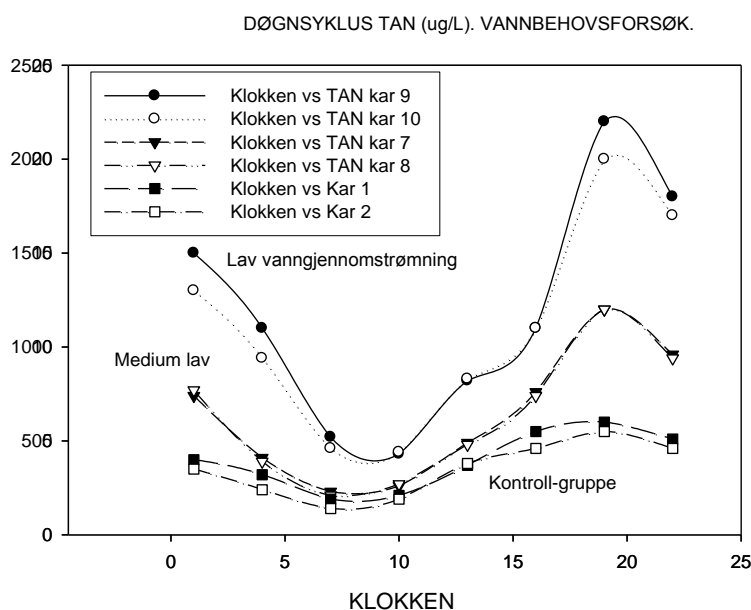
Resultatene fra vannforbruksforsøket viste en klar økning i oksygenforbruk utover dagen (Fig 29). Høyeste oksygenforbruk ble registrert i perioden 16.00 til 18.00 i alle grupper. Mellom gruppene ble høyest oksygenforbruk registrert i 0.2 l/kg fisk/min gruppen, tett fulgt av 0.3, 0.5 og 0.4 l/kg fisk/min gruppene.



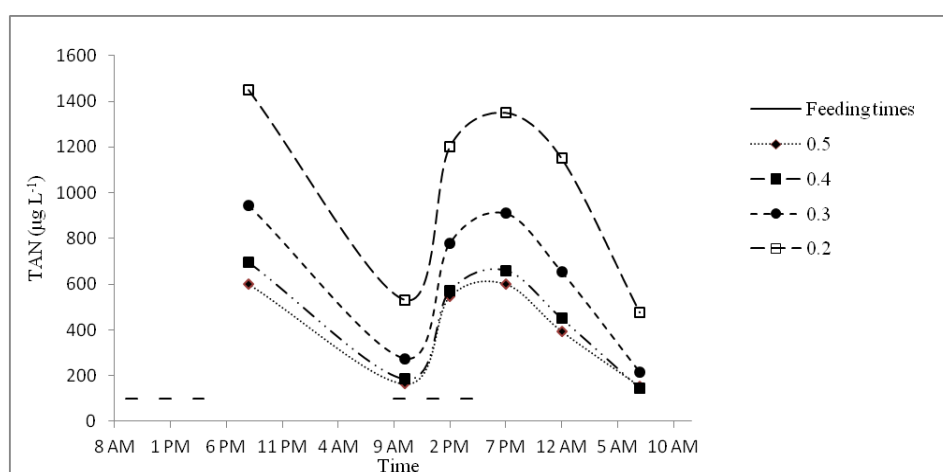
Figur 29. Oksygenforbruk gjennom døgnet hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Data representerer gjennomsnitt av duplikate kar per behandling, \pm S.E.

Vannkvalitet: døgnvariasjon i TAN og CO₂

I den første døgnsyklusen var TAN konsentrasjon i karene med 0.4 og 0.5 l/kg fisk/min gruppene tilnærmet lik (Fig 30). De høyeste konsentrasjonene av TAN ble påvist kl. 19 om ettermiddagen i alle grupper og var betydelig høyere i 0.2 l/kg fisk/min gruppen. I dette forsøket var det også døgnvariasjon på 4-5 ganger fra laveste til høyeste måling. Tilsvarende resultat for andre døgnsyklus TAN er gitt i Figur 31.

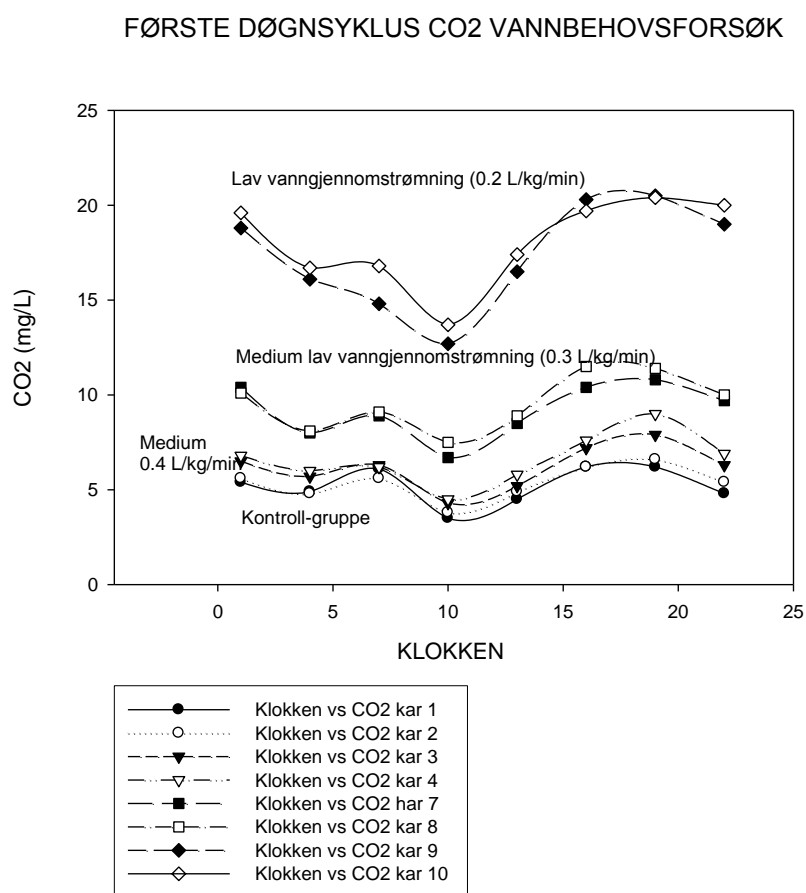


Figur 30. Første døgnsyklus for TAN hos grupper av postsmolt laks under tre nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (Kar 9 og 10=0.2 l/kg fisk/min, Kar 7 og 8=0.3 l/kg fisk/min og Kar 1 og 2=0,5 l/kg fisk/min).

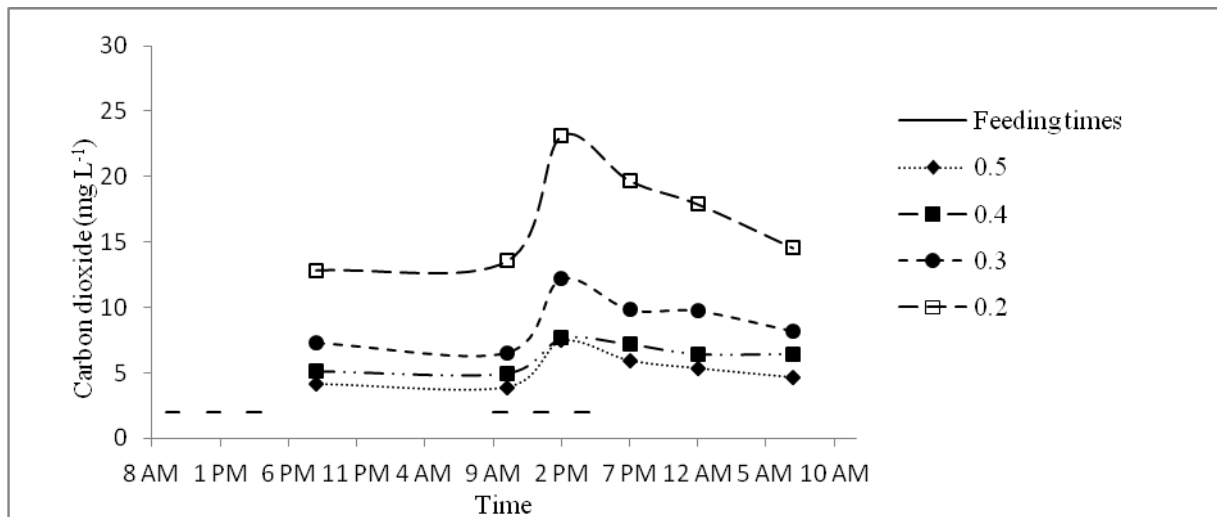


Figur 31. Andre døgnsyklus for TAN hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0.5 l/kg fisk/min).

I den første døgnsyklus for karbondioksid var konsentrasjonen høyest om ettermiddagen ifra kl. 15 til kl. 22 i alle grupper (Fig 32). I den andre døgnsyklusen ble de høyeste nivåene av karbondioksid målt kl. 14.00 (Fig 33). De høyeste konsentrasjonene av karbondioksid ble målt i 0.2 l/kg fisk/min gruppen og var mellom 20 og 25 mg/L. De fleste målingene i denne gruppen var likevel mellom 13 og 20 mg/L. I 0.3 l/kg fisk/min gruppen var alle målinger under 13 mg/L, mens i kontrollgruppen (0.5 l/kg fisk/min gruppen) så var de høyeste konsentrasjonene 6-7 mg/L.



Figur 32. Første døgnsyklus for CO₂ hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min).



Figur 33. Andre døgnsyklus for CO₂ hos grupper av postsmolt laks under fire nivå med spesifikk vanngjennomstrømning (0.2, 0.3, 0.4 og 0,5 l/kg fisk/min). Antall timer er over 24, siden undersøkelsen ble startet med en måling kl 19 dagen før det mer hyppige prøveuttaket ble startet.

6. Diskusjon og konklusjon

Kvalitet på forsøksfisk

Hos laksefisk er etablering av sjøvannstoleranse knyttet til økt syntese av gjelleenzymet Na-K-ATPase (NKA) som er lokalisert i spesialiserte saltregulerende celler i gjellene, såkalte kloridceller. En fisk med god sjøvannstoleranse kjennetegnes ved å ha en høyere NKA aktivitet etter fullført smoltifisering. Dokumentasjon av NKA aktivitet under smoltifisering (ATPase test) inngår derfor som et viktig kriterium for bedømmelse av smoltkvalitet i moderne settefiskproduksjon og benyttes som støtte i beslutninger knyttet til timing av utsett. NKA-enzymet som inngår i ATPase analysen består av to isoformer, en alfa- (α) og en beta- (β) enhet. Av disse isoformene er det α -enheten som innehar de viktige katalytiske egenskapene til NKA-enzymet, dvs. står for pumping av salter. Hos laksefisk har en flere varianter av α -enheten herunder, $\alpha 1a$ og $\alpha 1b$, og som igjen uttrykkes forskjellig under smoltifisering. Generelt vil $\alpha 1a$ varianten av NKA foreligge hos fisk som er tilpasset et liv i ferskvann, eks parr, mens $\alpha 1b$ varianten av NKA er fremtredende hos fisk som har utviklet sjøvannstoleranse, eks smolt. En laksesmolt med godt utviklet sjøvannstoleranse vil derfor ha høy NKA aktivitet, hvilket er i samsvar med resultatene fra dette studiet. Under tilvenning til sjøvann viste våre analyser en signifikant reduksjon i genuttrykk for NKA $\alpha 1a$ og en tilsvarende oppregulering av $\alpha 1b$, etterfulgt av en økende total NKA aktivitet. Disse resultatene viser at forsøksfisken hadde god smoltkvalitet ved oppstart med tilhørende godt vekst potensiale i sjø.

Effekter av økende fisketetthet på fiskevelferd

Målbare biologiske effekter på fisk som følge av høy tetthet (kg/m^3) vil avhenge av vannutskifting, vannkvalitet, tilstrekkelig tilgang på fôr og eventuell grad av sosiale interaksjoner mellom individene (Ellis, et al., 2002). I en studie med lakseparr, røktet frem i kar på land under ulike tettheter (21 til 86 kg/m^3) etterfulgt av periode i sjø, ble det ikke funnet noen negative effekter av høy tetthet (Hosfeld, et al., 2009). Videre har forsøk i kommersiell skala vist minimale forskjeller i tilvekst hos grupper av laks ved 20 og 40 kg/m^3 (Handeland, et al., 2008). Tilsvarende forsøk gjennomført av Kjartansson et al. (1988) påviste ingen negative effekter i intervallet $30\text{-}125 \text{ kg/m}^3$ hos stor Atlantisk laks. Resultatene fra den individ merkede fisken i vårt forsøk viste en tendens til at økende tetthet gradvis resulterte i redusert vekst hos postsmolt. Ett interessant funn var at nedgangen i vekst avtok med en prosentmessig reduksjon i SGR på 9, 15 og 9 % mellom henholdsvis 25-50, 50-75 og 75-100 kg/m^3 gruppene. Mellom 100 og 125 kg/m^3 gruppene ble det observert en reduksjon på 42 %.

Tilsvarende tall fra biomasse tilvekst viste imidlertid stabil SGR i intervallet fra 25 til 75 kg/m³ (+1.4 og -6.9 % forskjell mellom henholdsvis 25-50 og 50-75 kg/m³), etterfulgt av et 50 % fall i SGR mellom 100 og 125 kg/m³ gruppene. Resultatene fra biomassemålingene kan således indikere en tilvenning i SGR til økende tetthet i nedre intervall, dvs grupper under 100 kg/m³ samtidig som både individ- og biomasse tilvekst dataene klart synliggjør ett knekkpunkt i SGR mellom 100 og 125 kg/m³. I høytetthetsgruppen ble det videre registrert lavere glukosenivå i blodet. Denne observasjonen er i overensstemmelse med den observerte reduksjon i fôrintak og fôrutnyttelse samt økende fôrfaktor i samme gruppe.

Vekstforløpet mellom gruppene i dette forsøket er i samsvar med erfaringer fra kommersielle settefiskanlegg og indikerer at det er vanskeligere å fôre optimalt ved økende tetthet (Frode Mathisen, *pers com*). Ved sub-optimal fôrdistribusjon opplever oppdretter at karet 'overføres' uten at fisken mettes fullstendig. Med mindre en overfører betydelig for å kompensere for dette, blir det i realiteten en underfôring av fisken som igjen resulterer i redusert vekst og økt aggresjon herunder; økt finneslitasje, forkortete gjellelokk etc. Problemet synes å øke dersom en tildeler fôret i konsentrerte perioder, f.eks. ved lysstyring og/eller måltidsfôring, som i dette forsøket. Som ett ledd i en plan å optimalisere fôrdistribusjonen i vårt forsøk ble fiskene gitt ferskvannsfôr (Skretting Optiline, 3mm) med høyere flyteegenskaper under hele den eksperimentelle perioden. Innledende tester viste at denne fôrkvaliteten i større grad enn saltvannsfôr svedde i vannsøylen og således var mer tilgjengelig for fisken under, og etter, utfôring. I tillegg ble alle grupper overfôret med ca 10 % for ytterligere å sikre nok fôr til den enkelte fisk. Det kan imidlertid ikke utelukkes at kontinuerlig fôring gjennom lysperioden, som erstatning til måltidsfôring, ville resultert i ett noe høyere fôropptak i høytetthetsgruppene.

Under tetthetsforsøket ble det registrert at gjennomsnittlig oksygenivå i avløp i gruppene 25, 50, 75, 100 og 125 kg/m³ varierte fra henholdsvis 92, 86, 89, 87 og 85 %. Videre viste andre døgnsyklus klare tegn på en SDA effekt med økende oksygenforbruk og tilhørende reduksjon i oksygenivå i avløp utover ettermiddagen. Redusert oksygenkonsentrasjon i vann er vist å påvirke vekst i sjø hos Atlantisk laks. En co-variansanalysene gjennomført på data fra begge døgnsprofiler viste imidlertid ingen sammenheng mellom SGR og oksygenivå for gruppene 50, 75, 100 og 125 kg/m³. Analysen avdekket imidlertid en sammenheng mellom oksygenivå og SGR i prøven hentet inn kl 2400, men denne effekten var utelukkende knyttet til, og således styrt av, oksygenivået i 25 kg/m³. I litteraturen er det ulike resultat for når

reduisert oksygennivå blir hemmende for vekst hos laks, bl.a.har det blitt vist reduksjon i veksthastighet når metning faller under 100% (review av Thorarensen og Farrell, 2011). Imidlertid er resultatene fra vårt forsøk i overensstemmelse med observasjonene til Remen (2012), som viste ingen klare effekter på SGR som følge av redusert O₂ i sjø, ned mot 70 % metning.

I tillegg til redusert SGR ble det observert en markert økning i plasma natrium nivå i 125 kg/m³ gruppen den siste del av forsøksperioden. I denne gruppen (125 kg/m³) økte plasma natriumnivået fra 152 til 162 mmol/l, og en slik økning er en klar indikasjon på osmoregulatorisk ubalanse. Videre viste de registrerte velferdsindikatorer en klar økning i andel fisk med forekomst av katarakt og sårdannelse på brystfinner ved tettheter over 75 kg/m³. Velferdsresultatene er i samsvar med de individuelle stressmålingene som viste ett forhøyet nivå av plasmakortisol i både 100 og 125 kg/m³ gruppene etter 8 uker i forsøk. Resultatene fra individuelle blodgassanalyser, PCO₂ og HCO₃⁻, samt genuttrykk for NKA α 1a og α 1b og total NKA aktivitet, viste ingen forskjeller mellom forsøksgruppene. Disse resultatene, sammen med vannanalysene som viste lave verdier av TAN og CO₂, synliggjør således ett godt vannmiljø og god kvalitet på fisken under forsøket.

Effekt av redusert spesifikk vanngjennomstrømning på fiskevelferd

Er vannutskiftingen høy, d.v.s. at O₂, CO₂ og NH₃ er innenfor akseptable grenser og fisken gis tilstrekkelig med fôr, så kan en operere med tettheter som langt overgår dagens grenser (Hosfeld, 2010). Uten tilfredsstillende vannutskiftning vil derimot effekten av redusert vannkvalitet og fôrtildeling bidra til økende aggresjon, lav tilvekst og manglende velferd. Med vannforbruk i dette forsøket menes altså vekt-spesifikk tilførsel av nytt vann til fiskekaret, og dette må ikke blandes sammen med utskiftning av vann på systemnivå i et resirkuleringsanlegg (RAS).

I vanngjennomstrømningsforsøket varierte utskiftningstiden fra 26, 33, 44 og 66 min i henholdsvis 0.5, 0.4, 0.3 og 0.2 l/kg fisk/min gruppene. Bakgrunnen for å standardisere spesifikk vanngjennomstrømning, og ikke utskiftningstid, var ønsket om å etablere lik metabolsk intensitet i alle kar under forsøksperioden. I store landbaserte kar har observasjoner vist at kort vannutskiftningstid (< 45 min) kan resultere i økt stress på fisken, dersom en ikke forhindrer at det genereres høy vannhastighet og/eller sug ved karavløp pga høy energi i tilført mengde vann. Slike tilfeller kan imidlertid forhindres ved hjelp av god hydraulisk

planlegging, og bruk av sideutløp. I småskala-kar er for høy vannhastighet sjelden et problem. Videre ble effekten av vannhastighet minimalisert gjennom å justere strålevinkelen slik at vannhastigheten ble lik i alle kar (samme forhold gjelder også i tetthetsforsøket).

I dette forsøket har vi undersøkt kravene hos fisken ved bruk av kar i gjennomstrømmingsmodus, slik det vil bli kjørt i semi-lukkede anlegg i sjø. Kravene til optimal vannkvalitet i semi-lukkede anlegg i sjø, herunder nødvendig vannkvalitet, tilstrekkelig vannmengde samt vannets oppholdstid og selvrensingsevne, vil være styrende for en rekke forhold knyttet til drift og kostnadsnivå. I vannforbruksforsøket ble grupper av laks røktet frem i to måneder under fire ulike nivå spesifikt vannforbruk; 0.2, 0.3, 0.4 og 0.5 l/kg/min. En interessant observasjon fra forsøket er at til tross for en klart økende CO_2 gradient mellom gruppene (0.2: 13-24 mg/l, 0.3: 7-13 mg/l, 0.4: 4-8 mg/l og 0.5: 3-7 mg/l) ble det ikke registrert noen signifikant forskjell i SGR mellom noen forsøksgrupper. Tilsvarende resultat ble også funnet for fiskens kondisjon. Dette til tross så viste de fysiologiske målingene at fisken som gikk på 0.2 l/kg/min hadde et klart lavere plasma klorid nivå, høyere pH (data ikke vist), PCO_2 og HCO_3^- nivå gjennom hele den eksperimentelle perioden. Dette er en vanlig adaptiv respons på økende CO_2 -nivå hos laksefisk (Eddy et al., 1977). For alle grupper ble det registrert ett økende PCO_2 nivå utover i forsøket. Nyere analyser av PCO_2 fra fisk har vist at tidsbruk fra prøveinnhenting til analyse kan bidra til ett noe forhøyet PCO_2 nivå. I dette forsøket er imidlertid alle prøver hentet inn etter samme standardiserte protokoll og analysert innen maksimalt 5 min. Basert på bruken av standardisert protokoll kan en ikke utelukke at de presenterte verdiene generelt er noe forhøyet utover forventet basalnivå. Det antas likevel at effekten av eventuelle feilkilder under innsamling av prøver har lik påvirkning i alle grupper. Øvrige velferdsindikatorer viste ingen forskjeller mellom de ulike gruppene.

Den registrerte CO_2 -døgnsyklus viste et klart økende nivå utover dagen sammenliknet med tilsvarende målinger om morgenen. Årsaken til dette er trolig økende oksygenforbruk som følge av økt metabolsk aktivitet koblet til fôring om morgenen (SDA-effekt). Som tidligere diskutert kan man anta at kontinuerlig utfôring ville ha utjevnet denne trenden.

Tidligere arbeider har vist at faktorer som påvirker fiskens homeostase (stabilitet gjennom konstante forhold) er viktige for å beskrive respons på akutt stress, mens forhold knyttet til allostase (stabilitet gjennom forandring) synes sentrale m.h.p dokumentasjon av velferd over tid (Korte, et al., 2007). En stress-allostatisk kontroll kan lede til en ny-innstilling av

eksempelvis plasma kortisol nivå for å motstå ytre stress, som f.eks. økende CO₂ nivå. Når slike mekanismer er aktiverte vil organismen ha god håndteringsevne og overleve. Hvis de allostatisk mekanismene derimot blir overstimulerte (langvarig og/eller repeterende stress) vil en overbelastning skje og lede til negative effekter på overlevelse og ytelse (McEwen and Stellar, 1993). Dette kan være en mulig forklaring på det økende plasmakortisol nivået som ble observert i 100 og 125 kg/m³ gruppene, mens fisken på tettheter under 100 kg/m³ i større grad virket å håndtere denne belastning. Resultatene fra vannforbruksforsøket viste at laksefisk har en evne til å tilpasse seg moderate suboptimale forhold uten at dette går på bekostning av vekst. Samtidig viser studiet at en slik situasjon har en reell kostnad, her målt som redusert plasma klorid nivå, og økende PCO₂ og HCO₃⁻. I hvilken grad denne kostnaden innebærer en svekkelse av fiskens evne til å håndtere eventuelle nye belastninger er usikkert.

I tillegg til ovenfor nevnte analyser har Nofima gjennomført en serie analyser av immunstatus og skinnhelse, i forbindelse med NFR-OPP prosjektet. Resultatene fra analysene indikerer at postsmolt ikke bør eksponeres for tettheter over 100 kg/m³ samt at spesifikk vanngjennomstrømning ikke bør være under 0.4 l/kg fisk/min (75 kg/m³) hvis målsetning er å unngå redusert skinnkvalitet. Resultatene fra skinnanalysene vil publiseres gjennom internasjonale journaler.

Foreløpige konklusjoner:

Nye anbefalinger om fisketetthet og vannforbruk må tilfredsstillende myndighetenes krav til god fiskevelferd. For å etablere gode kriterier for velferd i oppdrett er det viktig å benytte indikatorer som effektivt skiller mellom ulike miljøforhold. Resultatene fra disse forsøkene viser responser på grunnleggende fysiologiske og biologiske mekanismer som vil kunne benyttes i en diskusjon om grenseverdier. Resultatene fra forsøkene er således gjeldende for postsmolt av laks i gjennomstrømningsanlegg, altså ikke i RAS.

For tetthetsforsøket kan følgende resultat legges til grunn:

1. SGR viste kun mindre endringer i vekst mellom 25 og 75 kg/m³ gruppene. Imidlertid oppfatter vi nedgangen i SGR mellom 100 og 125 kg/m³ gruppene som spesielt bekymringsfull.
2. Gruppen på 125 kg/m³ viste klare tegn på redusert plasma glukosenivå, lav fôrutnyttelse, forhøyet plasma natrium og kortisol nivå.

3. Registrerte velferdsindikatorer viste en klar økning i andel fisk med forekomst av katarakt og sårdannelse på brystfinner ved tettheter over 75 kg/m³.

For vannforbruksforsøket kan følgende resultat legges til grunn:

1. Det ble ikke funnet forskjeller i vekst og kondisjon mellom de ulike forsøksgruppene
2. Gruppen som ble eksponert for 0.2 l/kg fisk/min viste et lavere plasma klorid nivå, høyere PCO₂ og HCO₃⁻ nivå sammenliknet med de andre gruppene.
3. Det ble ikke funnet noen forskjeller i velferdsindikatorer for noen av forsøksgruppene.
4. Bruk av 0.2 l/kg fisk/min gav et CO₂ nivå i karet på mellom 13 og 24 mg/l i motsetning til de andre gruppene som alle viste verdier under 15 mg/l.

I sum indikerer resultatene at oppdrett av postsmolt ved relativt høy tetthet er mulig men at for høy tetthet har velferdsmessige kostnader. Resultatene fra disse forsøkene indikerer imidlertid god fiskevelferd for postsmolt av laks ved økende tetthet inntil 75 kg/m³ og ved bruk av en spesifikk vanngjennomstrømning på minimum 0.3 l/kg fisk/min i gjennomstrømmingsanlegg.

I dette forsøket har vi benyttet samme temperatur-profil som vil bli benyttet under uttesting av Marine Harvest sitt semi-lukkede postsmolt anlegg i Skånevik, i NFR-OPP prosjektet. I dette anlegget vil MH etablere en testproduksjon for postsmolt i størrelsesintervallet 100 til 1000 gram. Anbefalingene er ikke nødvendigvis gjeldende for resirkuleringsanlegg, som kan ha et avvikende miljø fra her. Størrelsesintervallet i vårt forsøk var 100 til 250 gram, hvilket også er styrende for vår anbefalinger. Herunder er det viktig å være oppmerksom på at fiskens metabolske tilstand er klart påvirket av både temperatur og størrelse, hvilket igjen kan innbefatte behov for justerte grenseverdier hos større fisk, eller ved forskjellig temperaturprofil. Under forsøket ble fiskene eksponert for definerte og stabile belastninger over en periode på 2 måneder. I praktisk oppdrett vil eks. både tetthet og flow være kontinuerlige variabler som øker/endrer seg med tiden. For begge parametre inntreffer høyeste belastning den siste uken. I hvilken grad en max belastning på mer enn 75 kg/m³ over kortere tid (endepunkt) representerer ett velferdsmessig problem for fisken er usikkert. Denne type problemstillinger bør utredes ytterligere før endelige grenseverdier for postsmolt blir fastsatt.

7. Referanser

- Eddy, F., Lomholt, J., Weber, R., Johansen, K., 1977. Blood respiratory properties of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) kept in water of high CO₂ tension. *J Exp Biol.* 67, 37-47.
- Ellis, T., North, B., Scott, A., Bromage, N., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationship between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish. Biol.* 61, 493-531.
- Gebauer, R., 1992. Vannkvalitet og vannbehandling i lukkede oppdrettsanlegg . R. Gebauer, G. Eggen, E. Hansen, B. Eikebrokk (Eds.), *Oppdrettsteknologi*. Tapir Forlag, Trondheim, 63-96.
- Handeland, S.O., Kristensen, T., Rosten, T., Urke, H., Damsgård, B., Noble, C., Mikkelsen, H., Toften, H., Evensen, T., Rosseland, B.O., Salbu, B., Christisan, H.C., Stefansson, S.O., 2008. Påvirker vannkvalitet og produksjonsintensitet risiko for utvikling av vintersår hos postsmolt; Resultater fra en storskala feltstudie. *Fiskehelse.* 10.
- Helland, S.J., Grisdale-Helland, B., Nerland, S., 1996. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture.* 139, 157-163.
- Henriksen, K., Rosten, T., Terjesen, B.F., Ulgenes, Y., Winther, U., 2013. Overgang til lukkede oppdrettsanlegg i sjø – teoretisk beregning av endret arealbehov. Closed-containment systems in sea – theoretical considerations on changed area need. In Norwegian, English abstract. . VANN. 47, 535-544.
- Hosfeld, C., Hammer, J., Handeland, S., Fivelstad, S., Stefansson, S., 2009. Effects of fish density on growth and smoltification in intensive production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture.* 294, 236-241.
- Hosfeld, C.D., 2010. Physiological effects of environmental hyperoxia on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). University of Bergen, pp. 152
- Hoyle, I., Oidtmann, B., Ellis, T., Turnbull, J., North, B., Nikolaidis, J., Knowles, T.G., 2007. A validated macroscopic key to assess fin damage in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 270, 142-148.
- Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thomassen, J.M., Smith, M.J., 1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture.* 73, 261-274.
- Kolarevic, J., Takle, H., Felip, O., Ytteborg, E., Selset, R., Good, C., Baeverfjord, G., Åsgård, T., Terjesen, B., 2012. Molecular and physiological responses to long-term sublethal ammonia exposure in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology.* (submitted).
- Korte, S.M., Olivier, B., Koolhaas, J.M., 2007. A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology & Behavior.* 92, 422-428.
- McCormick, S.D., 1993. Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na⁺, K⁺-ATPase Activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 50, 656-658.
- McEwen, B., Stellar, E., 1993. Stress and the individual. *Archives of Internal Medicine.* 153, 2093-2101.
- Nilsen, T.O., Ebbesson, L.O.E., Madsen, S.S., McCormick, S.D., Andersson, E., Björnsson, B.T., Prunet, P., Stefansson, S.O., 2007. Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase α - and β -subunits, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology.* 210, 2885-2896.
- Remen, M., 2012. The oxygen requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the on-growing phase in sea cages. Dr. Scient thesis, University of Bergen.
- Rosten, T.W., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Terjesen, B.F., Biering, E., Winther, U., 2011. Oppdrett av laks og ørret i lukkede anlegg - forprosjekt. SINTEF, Trondheim, pp. 76
- Terjesen, B., Rosten, T., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Aarhus, I., Winther, U., 2013. Betydning av vannmiljøet ved produksjon av laksefisk i lukkede systemer i sjø. Water quality requirements for efficient farming of Atlantic salmon in closed systems. In Norwegian, English abstract. . VANN. 48, 14-27.
- Thorarensen, H., Farrell, A., 2011. The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture.* 312, 1-14.