



HØGSKOLEN
I BERGEN

BERGEN UNIVERSITY COLLEGE

Sluttrapport for Postsmolt D: Grenseverdier for karbondioksid for postsmolt (FHF-prosjekt 900895)

Forfattere: Sveinung Fivelstad, Camilla Hosfeld, Sigurd Handeland, Bendik Fyhn Terjesen, Kristin Kvamme

Kortnavn: PostSmolt D

Ansvarlig FoU-institusjon: Høgskolen i Bergen (HiB)


Samarbeidende FoU-partnere: NOFIMA og UNI-miljø

Aktivitetsperiode: 1.07.2013 – 31.12.2014

Versjonsdato: 06.02.2015

Finansiert av FHF og i noen grad NFR

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

	Rapport nr. 01-2015
	Tilgjengelighet Åpen
Høgskolen i Bergen, PB 7030, 5020 BERGEN (+47) 55 587630 eller 92867648	
e-mail: Sfi@hib.no	
Tittel Sluttrapport for Postsmolt D: Grenseverdier for karbondioksid for postsmolt (FHF-prosjekt 900895)	Dato 06.02.15
	Antall sider og bilag 34
Forfatter(e) Sveinung Fivelstad, Camilla Hosfeld, Sigurd Handeland, Bendik Fyhn Terjesen, Kristin Kvamme	Prosjektleder S. Fivelstad Prosjektnummer 01-2015

Oppdragsgiver FHF	Oppdragsgivers ref. FHF 900895
<p>Sammendrag</p> <p>Postsmolt av Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i>) ble eksponert for 6 ulike CO₂ nivåer (2 mg/L (kontroll), 7 mg/L, 16 mg/L, 23 mg/L, 28 (mg/L) og 34 mg/L) i 12 uker. Resultater fra vekstmålingene tatt av individmerket fisk (n = 40) viste ingen signifikante effekter på 7 mg/L gruppen på noe tidspunkt. Vekten på 16 mg/L gruppen var signifikant lavere ved avslutning av forsøket (p < 0,05), men utgangsvekten for denne gruppen var også noe lavere enn for de andre gruppene. Spesifikk veksthastighet (SGR) var signifikant redusert i gruppen på 23 mg/L i første del av forsøket. Senere i forsøket var det en periode der SGR var høy for alle grupper (høgste konsentrasjon i denne perioden var 30 mg/L), noe som kan tyde på akklimering til karbondioksid. For hele forsøksperioden så forklarte en andre ordens polynom modell forholdet mellom karbondioksid konsentrasjon og spesifikk veksthastighet. Basert på denne formelen ble spesifikk veksthastighet redusert for konsentrasjoner over 18.6 mg/L. Videre viste resultatene fra blodprøvene at nivået av plasmaklorid ble gradvis og lineært redusert med økende CO₂ konsentrasjon. Nivået av PCO₂, pH og HCO₃⁻ økte med økende CO₂ konsentrasjon. Disse påvirkningene på blodplasmaet sin sammensetning vedvarte hele forsøket. Velferdsindikatorer målt midtveis i forsøket viste ingen signifikant påvirkning av karbondioksid.</p>	

<p>Øvrig informasjon</p> <p>Jeg vil hermed takke mye for den gode støtten fra FHF som gjorde dette forsøket mulig. Styringsgruppen for prosjektet bestod av: Frode Mathisen, Grieg Seafood ASA, Harald Sveier, Lerøy Seafood Group, Rolv Haugarvoll, Lingalaks AS, Svein Martinsen, Smøla Klekkeri og settefisk, Ørjan Tveiten, Marine Harvest Norway AS. Merete Bjørgan Schrøder fulgte opp prosjektet på vegne av FHF.</p>
--

<p>Emneord</p> <p>Atlantisk laks</p> <p>Lukka oppdrettsanlegg for postsmolt</p> <p>Grenseverdier for karbondioksid</p> <p>Fysiologiske sammenhenger</p> <p>Vekstmodeller</p>
--

Forord

I intensivt oppdrett så er alltid karbondioksid en viktig begrensende vannkvalitetsfaktor. Likevel er det utført få forsøk på grenseverdier for postsmolt. Resultatene fra forsøket vil kunne være med på å gi oppdrettsnæringen en grenseverdi for konsentrasjonen av karbondioksid i vannet. Prosjektleder vil hermed takke mye for den gode støtten fra FHF som gjorde dette forsøket mulig. Styringsgruppen for prosjektet bestod av: Frode Mathisen, Grieg Seafood ASA, Harald Sveier, Lerøy Seafood Group, Rolv Haugarvoll, Lingalaks AS, Svein Martinsen, Smøla Klekkeri og settefisk, Ørjan Tveiten, Marine Harvest Norway AS.

Merete Bjørgan Schrøder fulgte opp prosjektet på vegne av FHF. Takk til dere alle!

	Innholdsfortegnelse	
Sammendrag		5
Engelsk sammendrag (Abstract)		6
Innledning		7
Målsettinger		9
Materiale og metode		9
Gjennomføring av CO ₂ forsøk		9
Statistikk		11
Resultater		13
Velferdsindikatorer		13
Blodparametre		15
Vekstmodeller		23
Oversikt over vekstresultater		26
Diskusjon		29
Referanser		31

Sammendrag

Postsmolt av Atlantisk laks (*Salmo salar*) ble eksponert for 6 ulike CO₂ nivåer (2 mg/L (kontroll), 7 mg/L, 16 mg/L, 23 mg/L, 28 (mg/L) og 34 mg/L) i 12 uker. Resultater fra vekstmålingene tatt av individmerket fisk (n = 40) viste ingen signifikante effekter på 7 mg/L gruppen på noe tidspunkt. Vekten på 16 mg/L gruppen var signifikant lavere ved avslutning av forsøket (p < 0,05), men utgangsvekten for denne gruppen var også noe lavere enn for de andre gruppene. Spesifikk veksthastighet (SGR) var signifikant redusert i gruppen på 23 mg/L i første del av forsøket. Senere i forsøket var det en periode der SGR var høg for alle grupper (høgste konsentrasjon i denne perioden var 30 mg/L), noe som kan tyde på akklimering til karbondioksid. For hele forsøksperioden så forklarte en andre ordens polynom modell forholdet mellom karbondioksid konsentrasjon og spesifikk veksthastighet. Basert på denne formelen ble spesifikk veksthastighet redusert for konsentrasjoner over 18,6 mg/L. Videre viste resultatene fra blodprøvene at nivået av plasmaklorid ble gradvis og lineært redusert med økende CO₂ konsentrasjon. Nivået av PCO₂, pH og HCO₃⁻ økte med økende CO₂ konsentrasjon. Disse påvirkningene på blodplasmaet sin sammensetning vedvarte hele forsøket. Velferdsindikatorer målt midtveis i forsøket viste ingen signifikant påvirkning av karbondioksid.

Abstract

Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) postsmolt were reared at 6 different levels of water CO₂ levels (2(control), 7, 16, 23, 28 and 34 mg L⁻¹) in duplicate 500 L tanks for 12 weeks in sea water. Specific growth rates (SGR) of individually tagged fish (n = 40) showed no significant effects of 7 mg/L and 16 mg/L at any time. The SGR for the 23 mg L⁻¹ group was significantly reduced during the first part of the experiment. During the last part of the experiment there was a period where SGR was good for all groups (the highest concentration in this period was 30 mg L⁻¹), which do indicate acclimation to carbon dioxide. For the whole 12 weeks period the relationship between carbon dioxide concentration and SGR could be described using a second order polynomial model (p < 0.01). Based on this second order polynomial model SGR is 100 % until 18.6 mg L⁻¹ is exceeded. Plasma chloride concentration decreased linearly with increasing carbon dioxide concentration (p < 0.05). The level of PCO₂, pH and HCO₃⁻ increased with increasing carbon dioxide concentration and these changes lasted during the 12 weeks.

Key words: Carbon dioxide, Atlantic salmon parr, growth and physiological models, fish welfare, safe levels.

Innledning

Mellom 1988 og 1993 var det stor forskningsaktivitet på landbaserte oppdrettsanlegg i Norge (Kjartanson mfl., 1988; Bergheim mfl., 1993). I første del av denne perioden så ble ammoniakk sett på som en begrensende faktor i gjennomstrømningsanlegg, når oksygen ble tilsatt innløpsvannet. På slutten av perioden så ble det laget modeller som viste at det er karbondioksid som kan være en begrensende faktor i disse anleggene (Sanni og Forsberg, 1996). Forskningen på landbaserte anlegg for postsmolt opphørte etter dette og grenseverdier for karbondioksid ble derfor ikke grundig undersøkt. Denne forskningen er nå blitt reetablert og revitalisert gjennom innovasjonsprosjektet «Optimalisert postsmolt-produksjon» (kortnavn: OPP, nr. 217502/E40), finansiert av NFR over Havbruks-programmet.

Både landbaserte anlegg og semi-lukkede anlegg i sjø er aktuelle produksjonsformer (Rosten, mfl. 2011; Thorarensen og Farell, 2011), og det er stor interesse i oppdrettsnæringen for å prøve ut slike anlegg. Produksjon av postsmolt har tradisjonelt foregått i merder i sjø, og OPP prosjektet dekker både semi-lukkede anlegg i sjø for produksjon av postsmolt og resirkulering på land. I begge disse anleggstypene må vann pumpes for å skaffe fisken oksygen og for å fjerne avfallsstoffer. Kunstig fremstilt oksygen vil bli tilsatt innløpsvannet, og da vil karbondioksid bli neste begrensende faktor etter oksygen. Imidlertid er det slik at det er begrenset kunnskap om grenseverdien for karbondioksid for postsmolt da bare et forsøk er blitt publisert (Fivelstad mfl., 1998). Konsentrasjonen av karbondioksid vil kunne være høy i intensive perioder i gjennomstrømningsanlegg, ved gjenbruk av vann og i resirkuleringsanlegg.

Generelt sett så er oksygen den første begrensende faktoren for vanngjennomstrømning i lukkede anlegg i sjøen og landbaserte oppdrettsanlegg. Når vannet blir oksygenert så blir karbondioksid den neste begrensende faktoren. Sammenhengen mellom vanngjennomstrømning og oksygenering beskrives av følgende formel (Fivelstad, 1988):

$$q_0 = \frac{M}{DO_{in} - DO_{out}} \quad (1)$$

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

q_0 er den spesifikke vanngjennomstrømningen ($L\ kg^{-1}\ min^{-1}$), M er fiskens oksygenforbruk ($mg\ kg^{-1}\ min^{-1}$) og DO_{in} og DO_{ut} er oksygenkonsentrasjonen ($mg\ L^{-1}$) i innløpsvannet og i utløpsvannet. Formelen kan også beskrives slik:

$$q_0 = \frac{M}{d} \quad (2)$$

d er forskjellen i oksygenkonsentrasjon mellom innløp og avløp ($DO_{in}-DO_{ut}$). Formelen kan omformes til:

$$d = \frac{M}{q_0} \quad (3)$$

Differansen d er et mål på produksjons-intensiteten i et oppdrettsanlegg og er tilnærmet lik konsentrasjonen av karbondioksid i et gjennomstrømningsanlegg. Verdien av d øker når oksygenforbruket til fisken øker og når vanngjennomstrømningen minker. Når d -verdien øker så øker konsentrasjonen av karbondioksid.

Der finnes mye informasjon om effekter av karbondioksid på fisk. De fleste forsøkene har vært korttidsforsøk og er gjennomført i ferskvann. Generelt sett så øker partialtrykket av CO_2 (PCO_2) i blodplasma med økende partialtrykket i vannet. Ifølge Ultsch (1996) er plasma PCO_2 1-3 mm Hg over vannets PCO_2 så lenge partialtrykket ikke blir påvirket av hyperoxia (overmetning av O_2). Fiskens syre-base respons til en forhøyet plasma PCO_2 er først en reduksjon i plasma pH, som kan redusere fiskens oksygenopptak. Etter noen timer så er pH i plasmaet noe kompensert som et resultat av økt opptak av bikarbonat fra miljøet, og pH i plasmaet er ofte helt kompensert etter 2-7 dager (Eddy mfl.,1977; Heisler, 1984; Heisler, 1986). Andre fysiologiske effekter som er funnet er forhøyet respirasjonsfrekvens (Janson and Randall, 1975; Smith and Jones, 1982; Fivelstad mfl., 1999; Hosfeld mfl., 2008) og redusert plasma klorid, som følge av elektronøytral utskiftning med bikarbonat (Lloyd og White, 1967; Eddy mfl.,1977; Fivelstad mfl., 1999; Fivelstad mfl., 2003ab). Under akutt CO_2 -eksponering er forhøya nivåer av kortisol blitt påvist (Petoichi mfl., 2011).

Selv om de fysiologiske forandringene er mange er dødeligheten normalt lav selv i konsentrasjonsområdet 30-40 mg/L. Det som likevel har stor betydning for oppdrettsnæringen er redusert vekst, redusert forfaktor og nefrokalsinose som ofte blir observert i ferskvannsfisk eksponert for karbondioksid (Smart mfl. 1979; Smart, 1981; Fivelstad mfl.,1999; Fivelstad mfl., 2003ab; Fivelstad mfl., 2007; Hosfeld mfl., 2008). Det er bare utført ett tidligere forsøk

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

om omhandler toleranse av karbondioksid for postsmolt (Fivelstad mfl., 1998). I dette forsøket ble det observert ca. 10 % reduksjon i spesifikk veksthastighet ved en konsentrasjon på 26 mg/L. Ved 10 mg/L ble ingen effekt påvist. Postsmolten ble imidlertid ikke eksponert for konsentrasjoner mellom 10 og 26 mg/L.

Forsøk på laksesmolt har vist at miljøbetingelser som temperatur og alkalitet har betydning for CO₂-toleransengrensen (Fivelstad mfl., 2007; Davidson et al., 2011; Fivelstad, 2012). For postsmolt så vil alkaliteten generelt være høy, på grunn av sjøvannet, og dette kan bety at toleransengrensen for postsmolt kan være høyere enn toleransengrensen for smolt. Dette kan ha stor betydning for økonomien i lukka anlegg for postsmolt. Når det gjelder salinitet så er der ingen informasjon om hvordan salinitet påvirker toleransen av karbondioksid.

For parr er det utviklet en vekstmodell som beskriver veksttap som funksjon av karbondioksid konsentrasjon (Fivelstad mfl., 2015). I dette prosjektet tar en sikte på å utvikle tilsvarende modell for postsmolt. Dette er en av grunnene til at en høy konsentrasjonsgruppe er tatt med. Dersom en bare oppnår en svak vekstreduksjon så vil mange modeller kunne passe med dataene, og en høy konsentrasjonsgruppe er derfor nødvendig i forsøket.

For parr er det også utviklet fysiologiske modeller, f. eks. hvordan plasma klorid kan forklares nøyaktig av karbondioksid-konsentrasjonen i vannet. Tilsvarende modeller ønskes utviklet for postsmolt med hensyn til flere fysiologiske parametre. I tillegg så vil en studere kroniske stress-effekter av forhøya CO₂ nivå ved å måle plasma kortisol.

Målsettinger for Postsmolt D:

En vil bestemme CO₂ toleransen for postsmolt samt utvikle en modell som beskriver veksttap som funksjon av CO₂ konsentrasjonen i vannet. Det vil bli undersøkt om en kan påvise signifikante sammenhenger mellom fysiologiske parametre og tilvekst hos postsmolt eksponert til karbondioksid.

Materiale og metoder

Gjennomføring av CO₂ forsøk

Forsøket ble gjennomført på Høyteknologisenteret i Bergen og ledet av HiB v/Sveinung Fivelstad. Vanngjennomstrømningen var 2 L/kg/min, temperaturen 10 °C og vannets

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

oksygenmetning over 80 %. Totalt inngjekk det 6 grupper i forsøket, hver med to replikater (se tabell 1).

Tabell 1. Planlagde konsentrasjoner av karbondioksid i de seks forsøksgruppene.

Kontrollgr.	Lav gruppe	Medium gruppe	Noe høg gruppe	Høg gruppe	Svært høg gruppe
2 mg/L CO ₂	7 mg/L CO ₂	15mg/L CO ₂	23 mg/L CO ₂	30 mg/L CO ₂	38 mg/L CO ₂

Hver forsøksgruppe bestod av to replikater (totalt 12 fiskekar a 0.5m³). Fisken gikk under kontinuerlig belysning. En underpopulasjon fisk i hvert kar ble merket med PIT-tags (ansvar UNI), for studier av individuelt vekstmønster. Oksygenkonsentrasjon, temperatur og pH ble målt hver dag i alle kar, og karbondioksid ble målt 1-2 ganger ukentlig i alle karene ved hjelp av en Orion karbondioksid sensitiv elektrode (ansvar HiB). Forsøket hadde en varighet på 12 uker og skulle kartlegge effekter av CO₂ nivå på vekst, fôrutnyttelse, fysiologisk tilstand, samt biomarkører for bedømmelse av fiskevelferd i gjennomstrømningsanlegg, likt det en kan finne i semi-lukkede anlegg i sjø.

Smolten kom til ILAB den 15. oktober og ble likt fordelt i de 12 karene. Neste dag (16.oktober) ble fisken merket og det ble tatt individuell vekt og lengde på de 20 fiskene som ble merket. Fisken ble deretter akklimert til sjøvann. Fra mandag 4. november (dag 0) ble det tilsatt ca. 7-10 mg/L karbondioksid til de eksperimentelle gruppene slik at fisken kunne bli akklimert til en noe høyere karbondioksid konsentrasjon. Den laveste karbondioksid gruppen ble eksponert til dette nivået gjennom hele forsøket. Så ble vekten målt på 10 merka fisker i alle kar den 11. november for å få et startpunkt. Karbondioksid konsentrasjonen ble deretter økt i de fire høyeste gruppene den 12. november. Vekten og lengden ble så målt på merka fisk den 2. desember, 19. desember, 17. januar og 29. januar.

Det ble utført en stress mestringstest underveis i forsøket. Den bestod i at 6 fisk fra 3 av behandlingene (kontroll, 16 mg/L og 29 mg/L) ble hentet ut av hovedtanken med hov hvoretter fiskene ble oppbevart i hoven (10 min) i en 300 l ekstra tank (akutt stressfase). Vannkvaliteten i denne tanken var den samme som i fiskekaret der fisken kom ifra. Etter

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

avsluttet akuttstressfase ble fiskene overført til samme ekstratank og de fikk en 30 min hvile fase. Etter at hvilefasen var over ble fisken bedøvet med dødelig dose MS222. Fra hver fisk ble det hentet inn blod og organprøver.

Blodet ifra fisken ble analysert med iSTAT for glukose, ione nivå (Na^+ , K^+ , Cl^- , pH, PCO_2 og HCO_3^- (ansvar HiB). Antallet fisk i hvert kar var i området 3-6 avhengig av type blodprøvetaking. Tidlig i prosjektet fant en ut at blodprøver tatt ved kar kanten ga svært forskjellig resultat i enkelte blodparametre sammenlignet med resultater tatt etter bedøvelse. Særlig gjaldt dette for partial trykket for karbondioksid, men også for andre parametre. Ved denne type prøvetaking ble det lagt vekt på riktige målinger for et lite antall fisk. For andre parametre så er bedøvelse viktig. Bedøvelse ble brukt blant annet ved stressmestrings testen, og for å få gode resultater ved analyse av plasma kortisol.

For analyse av kortisol ble blodprøvene sentrifugert i 5 minutt ved 4°C og 500 rpm. Etter sentrifugering ble plasma pipettert ut og frosset i duplikater for videre analyse (0.5 ml eppendorf rør, -80°C). Nivået av plasmakortisol ble analysert ved bruk av validert protokoll for enzym immunoassay (EIA) beskrevet av Carey og McCormick (1998).

Dag 37 ble fiskene undersøkt m.h.p velferdsindikatorer; ytre morfologi; finneslitasje, gjellelokk, sår, deformiteter og indre morfologi hjerte, gjelle, lever, milt, nyre, etc., etter et standardisert system (ansvar Nofima; Kolarevic et al., 2012). Ved avslutning av forsøket ble fisken undersøkt med hensyn på ytre morfologi; finneslitasje, gjellelokkskade, skinnlesjoner, og katarakt basert på metoder utviklet av Hoyle et al. (2007) og Kolarevic et al. (2012). Evalueringen av katarakt ble gjort ved visuell observasjon av øyet, men uten bruk av en spaltelampe. Hver av de observerte velferdsindikatorerne ble gitt en heltalls-verdi mellom 0 og 5 (0-2 for gjellelokk, katarakt og skinnlesjoner). En score på null indikerer ingen lesjoner mens en score på 5 (eller 2) indikerer et klart velferdsproblem. Alle verdiene i de ulike figurene er gitt med standardfeil (\pm SE) eller \pm observasjonsområde (velferds data).

Statistikk

Fiskekar ble anvendt som den statistiske enheten. Velferdsresultatene ble testet ved hjelp av GLM for multivariate datasett på arc-sin transformerte data, og dersom signifikant, ble GLM etterfulgt av Tukey's post-hoc test. For alle de statistiske analysene ble signifikans-nivået satt til 0,05. Data fra blodanalysene og tilvekts (vekt, lengde, K-faktor, SGR) ble i hovedsak

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

undersøkt ved hjelp av lineær og ikke lineær regresjon (individuelle målinger for blodverdier ble testet mot karbondioksid konsentrasjonen i enkelt kar på prøvedato; utført ved Statgraphics Centurion 16 (Statpoint technologies Inc., Virginia). Det er blitt vist at regresjonsanalyse gir et mer nøyaktig estimat for dose-respons forhold enn enveis ANOVA (Shearer, 2000). Tilvekst data for enkeltfisk og blodparametre for enkeltfisk ble testet mot gjennomsnittlig kar konsentrasjon i de fire forskjellige perioder som forsøket varte. Enveis nøsta ANOVA ble også benyttet etterfulgt av Tukeys HSD *post hoc* test (Statistica version 12, Statsoft Inc., Tulsa, OK, 1993). Individuelle fisk ble nøstet i deres respektive kar.

Resultater

Tabell 2 viser gjennomsnittlig konsentrasjon av karbondioksid i forskjellige perioder i forsøket. De fem laveste konsentrasjonene er forholdsvis stabile gjennom forsøket, mens den svært høge gruppen varierer noe.

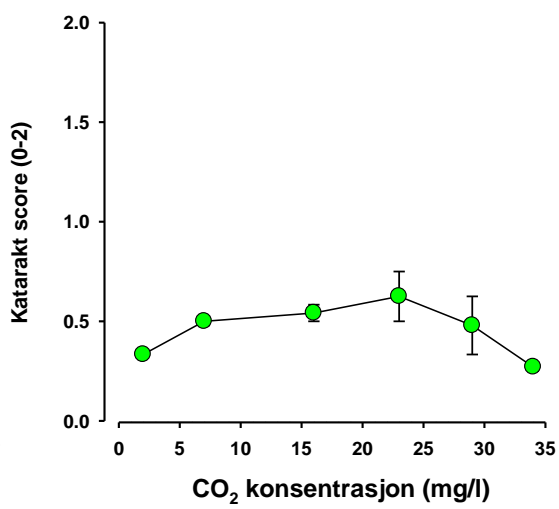
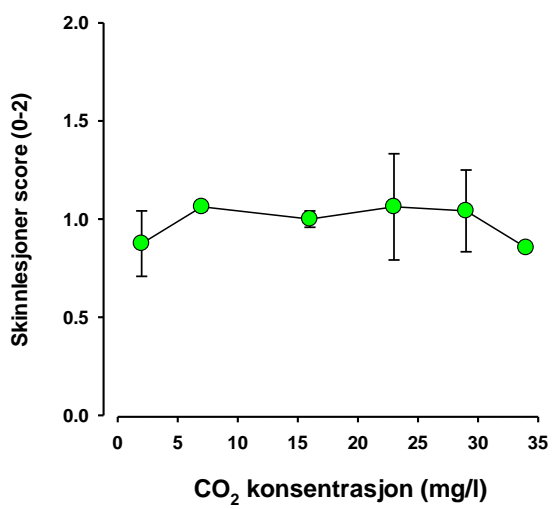
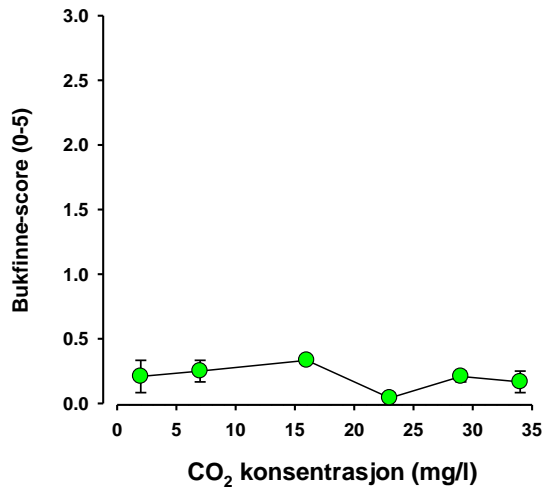
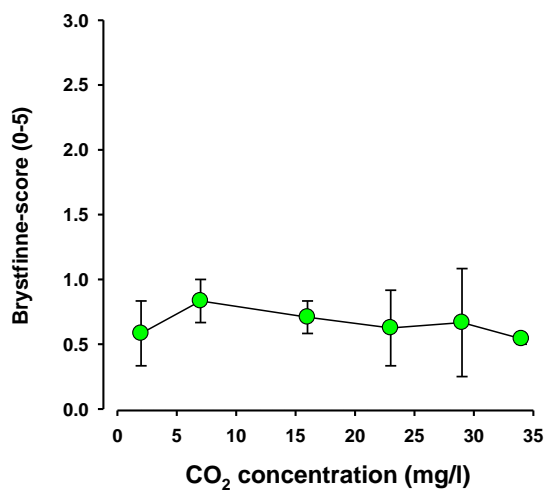
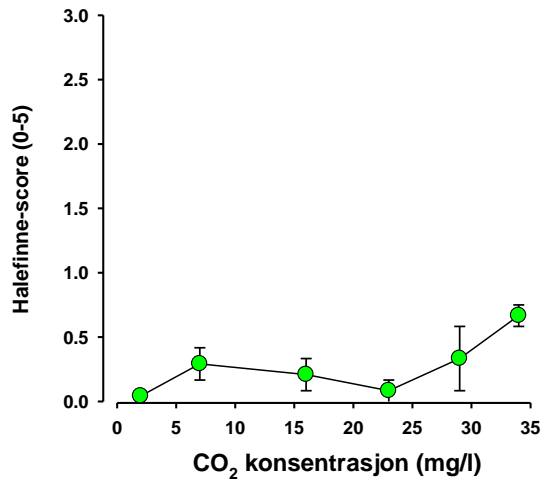
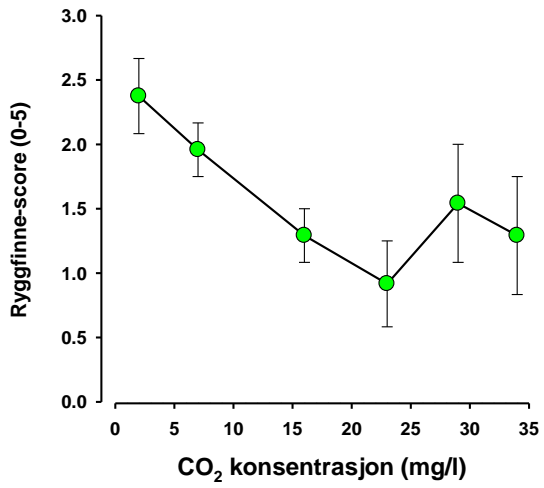
Tabell 2. Gjennomsnittlig konsentrasjon av karbondioksid i forskjellige perioder i forsøket.

Periode	Kontrollgr.	Lav gruppe	Medium gruppe	Noe høg gruppe	Høg gruppe	Svært høg gruppe
12.11.13- 02.12.13	2 mg/L CO ₂	7 mg/L CO ₂	16 mg/L CO ₂	24 mg/L CO ₂	30 mg/L CO ₂	30 mg/L CO ₂
02.12.13- 19.12.13	2 mg/L CO ₂	7 mg/L CO ₂	16mg/L CO ₂	22 mg/L CO ₂	27 mg/L CO ₂	39 mg/L CO ₂
20.12.13- 17.1.14 CO ₂	2 mg/L CO ₂	8 mg/L CO ₂	16mg/L CO ₂	23 mg/L CO ₂	27 mg/L CO ₂	31 mg/L CO ₂
17.1.14- 29.1.14	2 mg/L CO ₂	6 mg/L CO ₂	15mg/L CO ₂	20 mg/L CO ₂	30 mg/L CO ₂	38 mg/L CO ₂
Gjennomsnitt fram til 19.12.13	2 mg/L CO ₂	7 mg/L CO ₂	16mg/L CO ₂	23 mg/L CO ₂	29 mg/L CO ₂	34 mg/L CO ₂
Gjennomsnitt for hele forsøket	2 mg/L CO ₂	7 mg/L CO ₂	16mg/L CO ₂	23 mg/L CO ₂	28 mg/L CO ₂	34 mg/L CO ₂

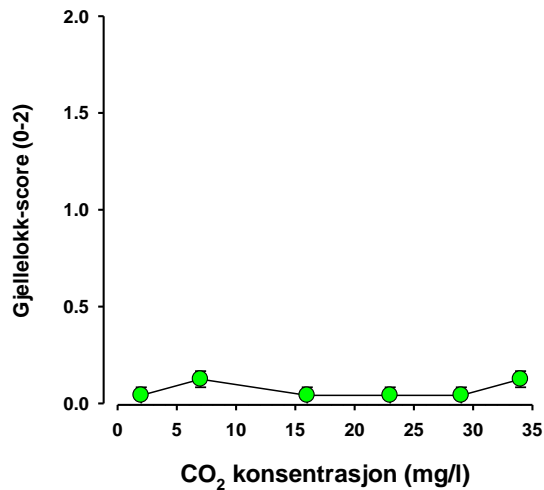
Velferdsindikatorer.

Analyser av de ytre velferdsindikatorerne dag 37 (16.12.2013) viste at noen lesjoner var tilstede hos fisk fra alle forsøksbehandlinger, slik som ryggfineslitasje og skinnlesjoner (Fig. 1; se under). En lav forekomst av gjellelokk-, halefinne-, brystfinne- og gattfineslitasje ble funnet, uavhengig av forsøksbehandling. Statistiske analyser av resultatene indikerte ingen påviselig effekt av CO₂ eksponering på de eksterne velferdsindikatorerne, siden ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom de eksperimentelle behandlingene (0,13 < p < 0,95).

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt



Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt



Figur 1. Ytre velferdsindikatorer målt hos postsmolt eksponert for økende CO₂. 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 i de registrerte indikatorene ($p < 0.05$; ingen her).

Blodparametre

Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i gjennomsnittlig plasma kortisol i de forskjellige karbondioksid gruppene (Fig. 2; baseline; blå), men resultatene viste en firedobling av nivået av plasmakortisol i kontrollgruppen etter gjennomført stressmestrings test. En noe mindre økning i plasmakortisol nivået (ca 3X) ble registrert i de to behandlingsgruppene, 16 mg/L og 29 mg/L.

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

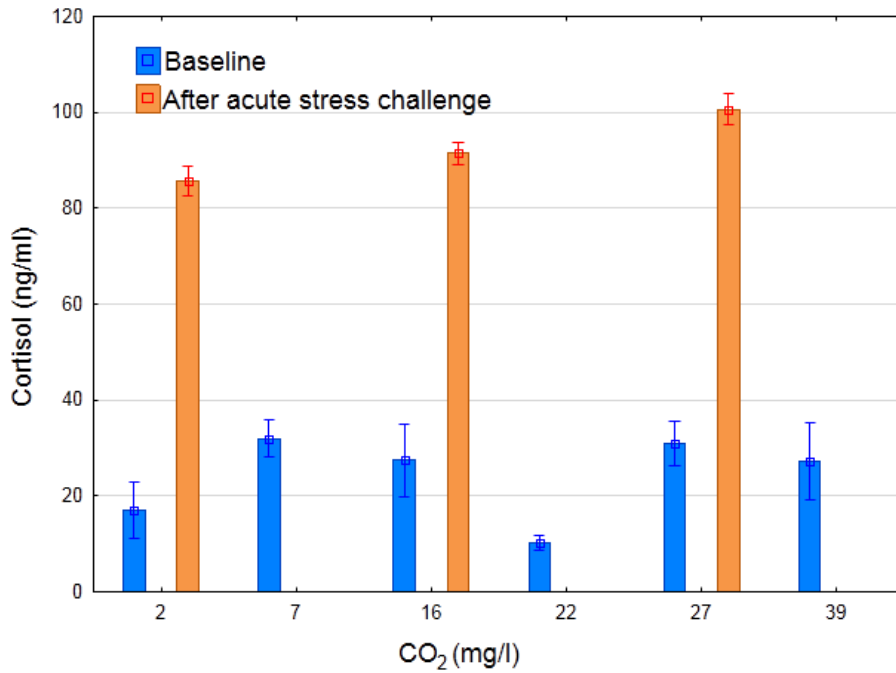


Fig. 2. Plasma kortisol i stressmestrings testen (orange) og kontrollnivåer (blått) for hver gruppe (målt dag 37).

Det gjennomsnittlige partialtrykket for karbondioksid for de eksperimentelle gruppene var signifikant høyere enn for kontrollgruppen på alle tidspunkter (Fig.3). Partialtrykket i plasmaet økte med økende konsentrasjon (partialtrykk) av karbondioksid i vannet.

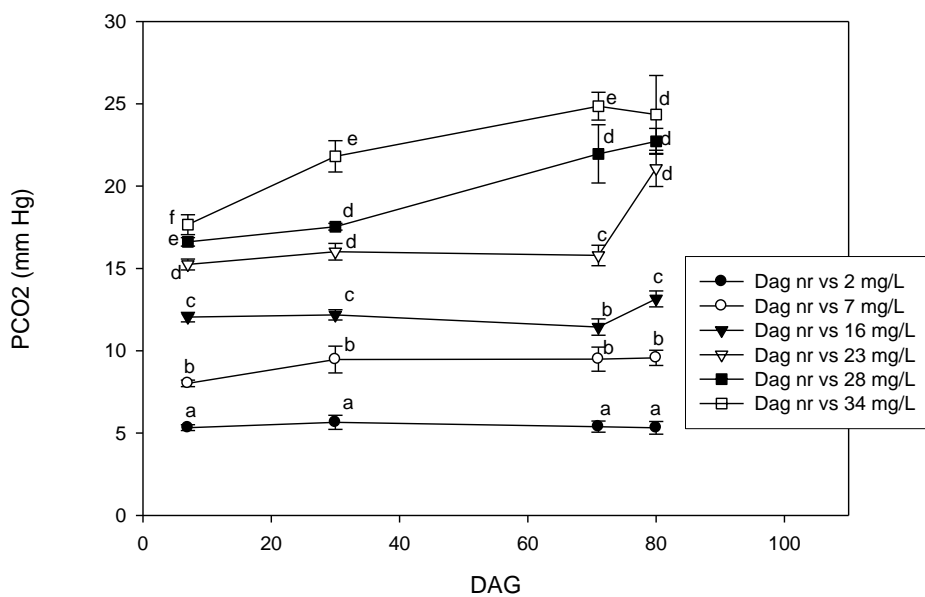


Fig. 3. Gjennomsnittlig partialtrykk (mmHg) og standardfeil for karbondioksid i plasmaet for kontrollgruppen og de fem eksperimentelle gruppene i forsøksperioden. Forskjellige bokstaver viser til at gjennomsnittsverdien er signifikant forskjellig ($p < 0,05$).

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

Figur 4 til figur 7 viser typiske sammenhenger mellom vannets innhold av karbondioksid og hva som skjer inne i fiskens blodplasma. Det var en positiv lineær sammenheng mellom partialtrykket av karbondioksid i vannet og i blodplasmaet (Fig. 4a (11-11-13), 4b(5-12-13), og en negativ lineær sammenheng mellom konsentrasjonen av plasma bikarbonat og konsentrasjonen av plasma klorid (Fig. 5a, b).

Gjennomsnittlig plasmaklorid for fiskegruppene ble redusert med økende konsentrasjon (partialtrykk) av karbondioksid i vannet (Fig. 6a). Det ble observer en signifikant negativ lineær sammenheng mellom konsentrasjonen av karbondioksid i vannet og konsentrasjonen av klorid i blodplasma (Fig. 6b, 6c, 6d). PH i plasmaet økte med økende konsentrasjon av karbondioksid (Fig. 7a,b).

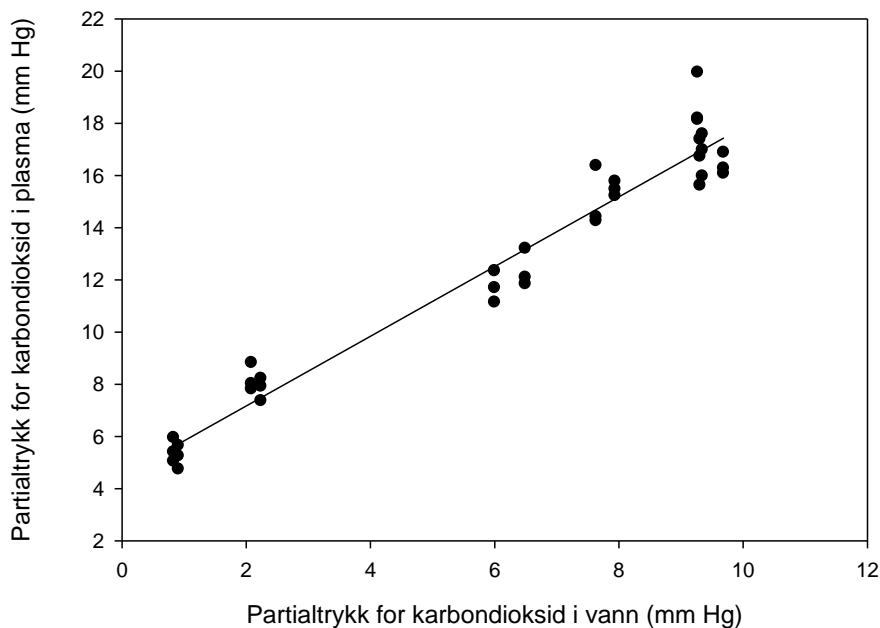


Fig. 4a. Partialtrykk for karbondioksid i plasma som funksjon av partialtrykk av karbondioksid i vann. (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten. $PCO_{2(Plasma)} = 1.34 PCO_{2(Vann)} + 4.5$ ($r^2 = 0.92$; Dato: 14-11-13).

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

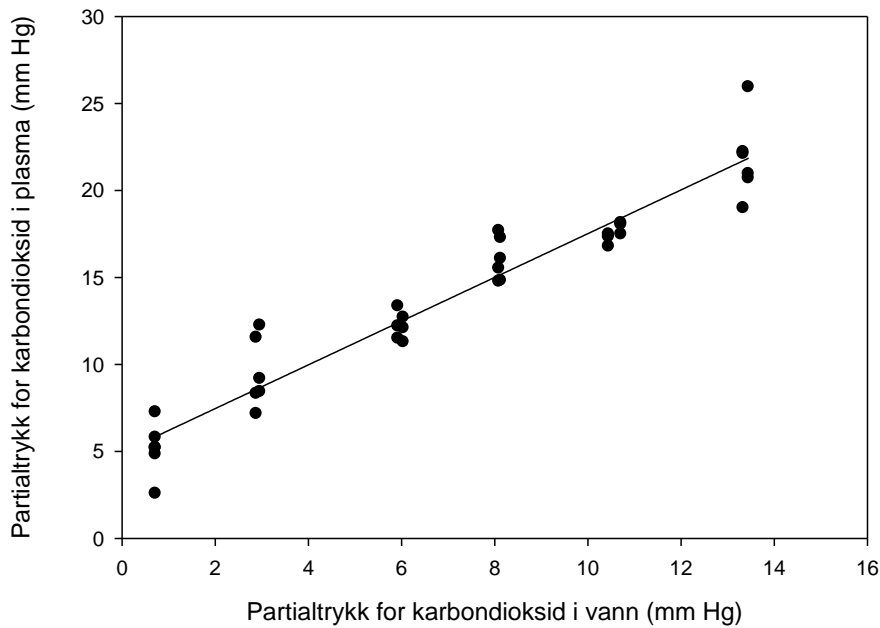


Fig. 4b. Partialtrykk for karbondioksid i vannet og i plasmaet den 5-12-13. (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten. $PCO_{2(Plasma)} = 1.25 PCO_{2(Vann)} + 4.9$ ($r^2 = 0.92$; Dato: 5-12-13).

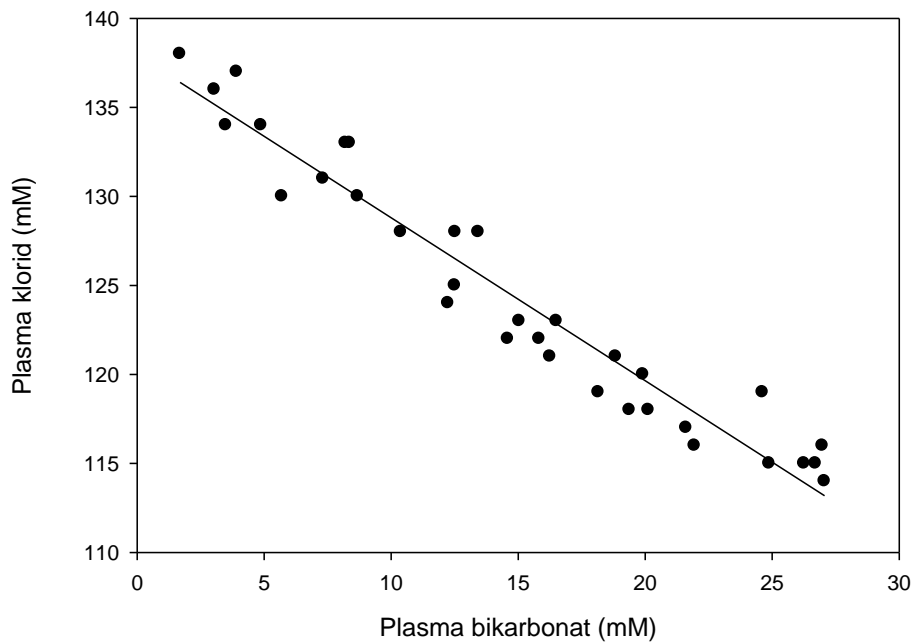


Fig. 5a. Plasma bikarbonat og plasma klorid 5-12-13 (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten.

$$[Cl^-] \text{ (mM)} = 138 - 0.92 [HCO_3^-] \text{ (mM)} \quad (r^2 = 0.94; 5-12-13).$$

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

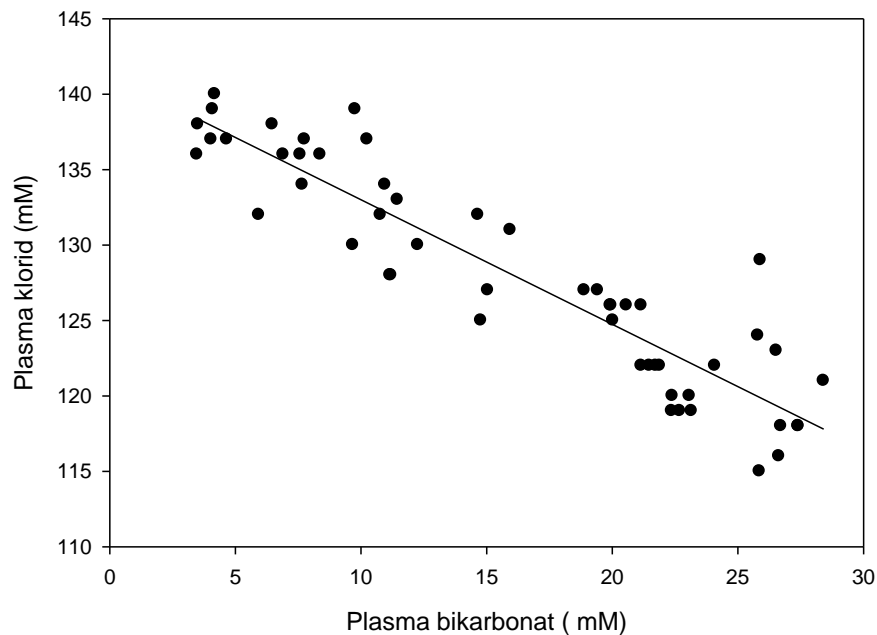


Fig. 5b. Plasma bikarbonat og plasma klorid 24-1-14 (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten.

$$[\text{Cl}^-] \text{ (mM)} = 141.3 - 0.83 [\text{HCO}_3^-] \text{ mM} \quad (r^2 = 0,84; 24-11-14)$$

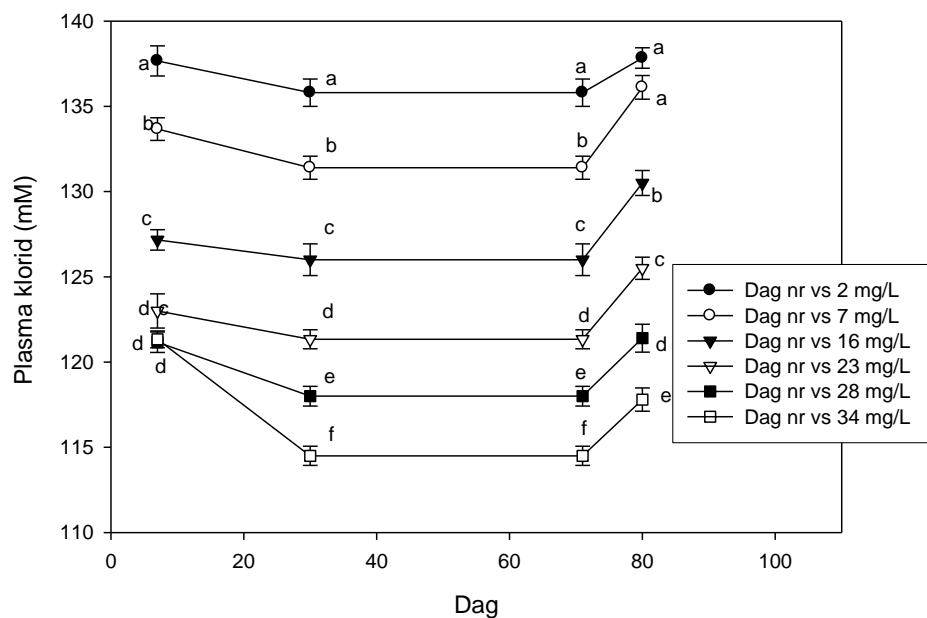


Fig 6a. Gjennomsnittlig plasma klorid (og standardfeil) i forsøksperioden. Forskjellige bokstaver viser til at gjennomsnittsverdien er signifikant forskjellig ($p < 0,05$).

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

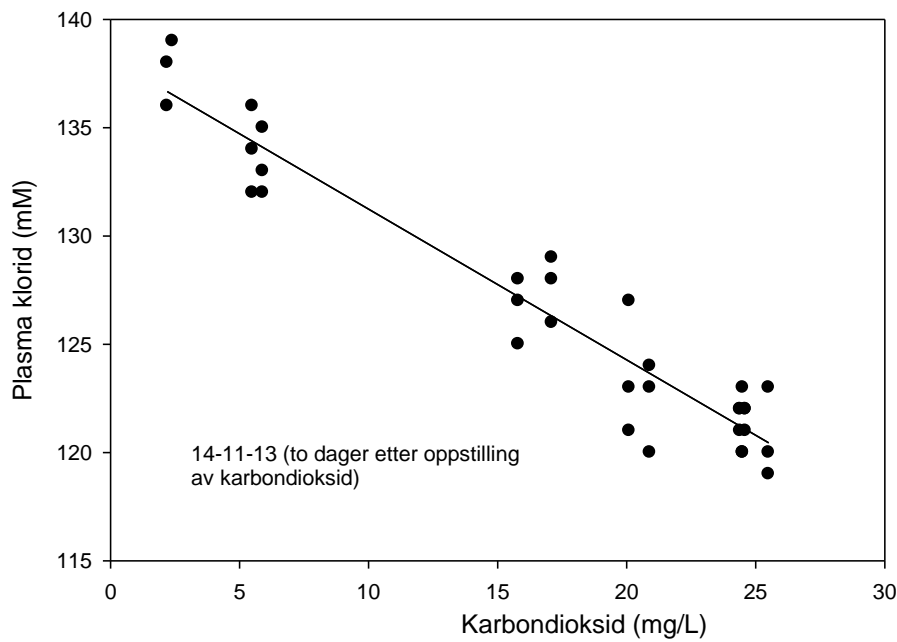
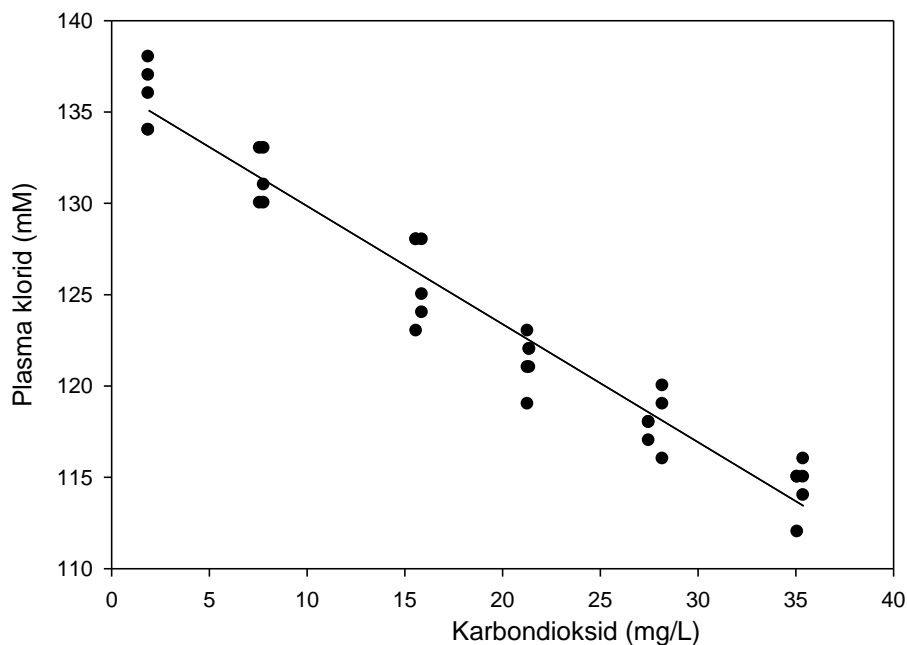


Fig. 6b. Plasma klorid 14-11-13. (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kant.

$$\text{Plasma klorid (mM)} = 138.2 - 0.696 * \text{CO}_2 (\text{mg/L}) \quad (r^2 = 0.92)$$



Figur 6c. Plasmaklorid 5-12-13. (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten.

$$\text{Plasma klorid (mM)} = 136.3 - 0.646 * \text{CO}_2 (\text{mg/L}) \quad (r^2 = 0.95)$$

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

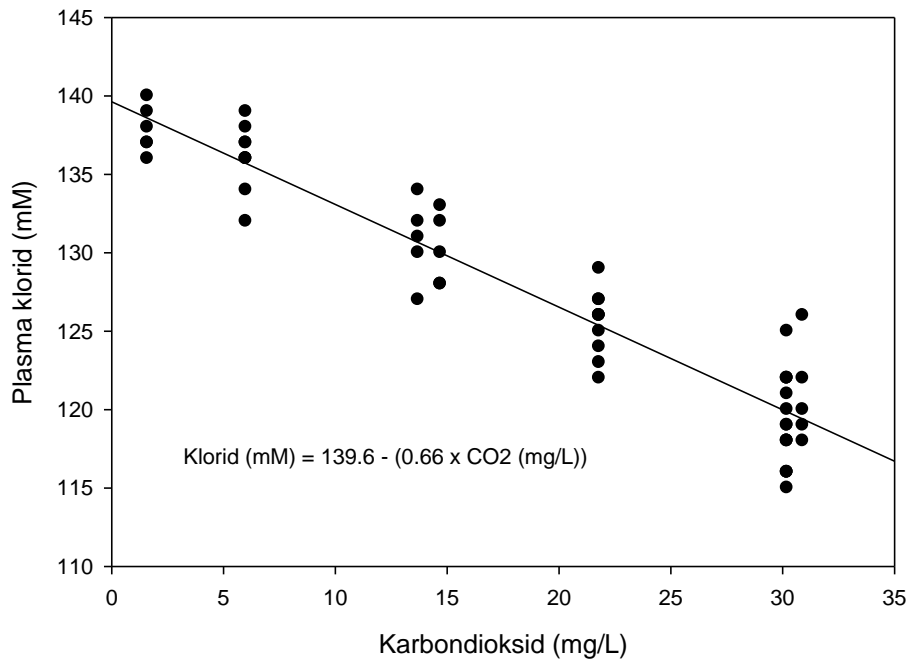


Fig. 6d. Plasma klorid 24-1-14 (nær avslutning av forsøket) (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten.

$$\text{Plasma klorid (mM)} = 139.6 - 0.655 * \text{CO}_2 \text{ (mg/L)} \quad (r^2 = 0.90)$$

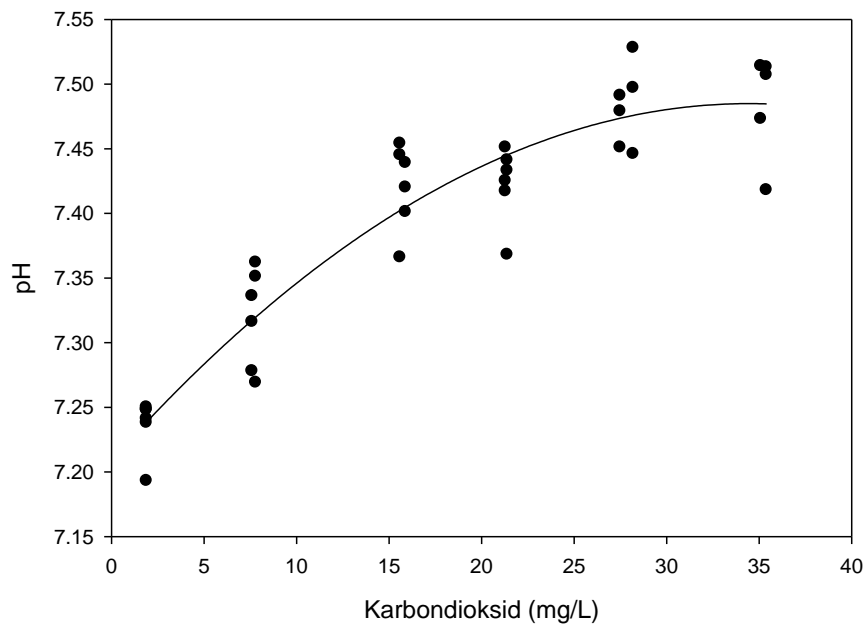


Fig.7a. Plasma pH 5-12-13. (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten.

$$\text{pH} = 7.21 + 0.016 * \text{CO}_2 - 0.0002 * (\text{CO}_2)^2 \quad r^2 = 0.88; p < 0.0001$$

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

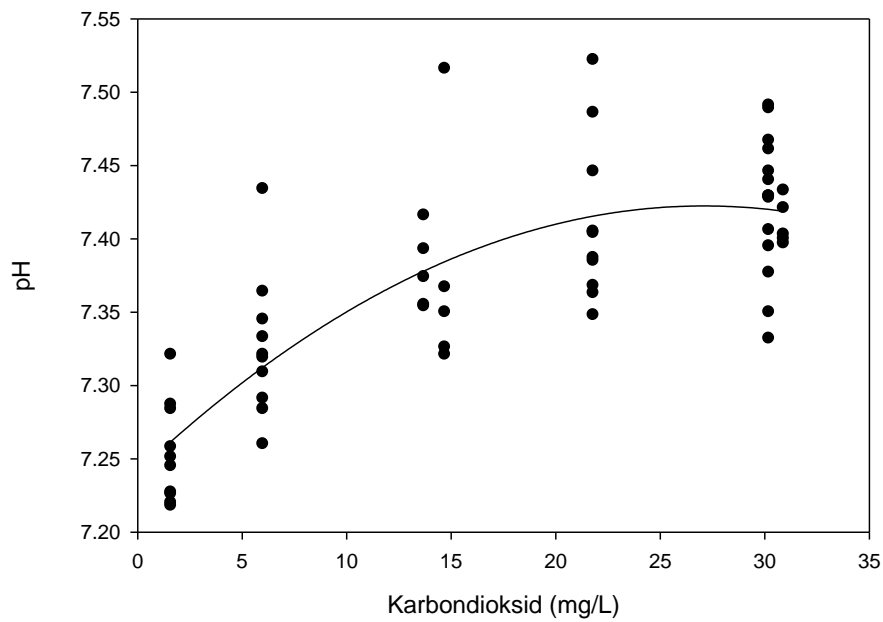


Fig. 7b. Plasma pH 24-1-14. (Verdien for blodplasma er for enkelt fisk mens verdien for vann er det enkelte fiske kar). Blodprøvene er tatt ved kar kanten.

$$\text{pH} = 7.24 + 0.0134 * \text{CO}_2 - 0.0002 * (\text{CO}_2)^2 \quad r^2 = 0.63; p < 0.0001$$

Vekstmodeller.

Vekstmodellene var forskjellige i de forskjellige periodene. I perioden 11. desember til 2. desember så ble forholdet mellom karbondioksid konsentrasjon og spesifikk veksthastighet forklart av en 2. ordens polynom modell ($p < 0,05$; Fig. 8a):

$$\text{SGR (2.12.13)} = 1.2605 + 0.014 * \text{CO}_2 \text{ (mg/L)} - 0.00075 * (\text{CO}_2 \text{ (mg/L)})^2 \quad (1)$$

I perioden 2. desember til 19. desember så forklarte en 2. ordens polynom modell sammenhengen mellom karbondioksid konsentrasjon og spesifikk veksthastighet ($p < 0,05$; Fig. 8b):

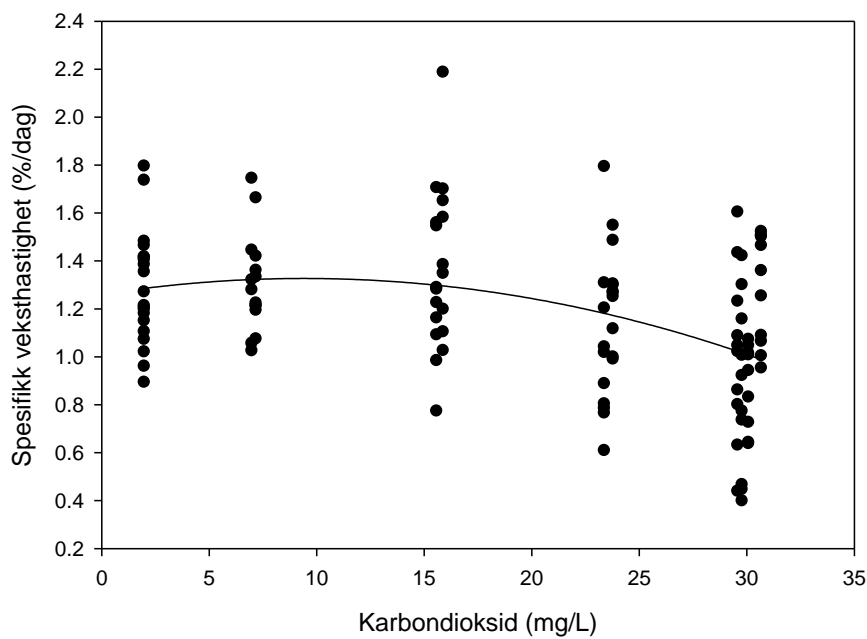
$$\text{SGR (19.12. 13)} = 1.246 + 0.0060 * \text{CO}_2 \text{ (mg/L)} - 0.00044 * (\text{CO}_2 \text{ (mg/L)})^2 \quad (2)$$

I perioden 19. desember til 17. januar var det ingen tydelig sammenheng mellom karbondioksid og spesifikk veksthastighet, og den spesifikke veksthastigheten var høy i alle grupper (Fig. 8c). Den høyeste konsentrasjonen var her 30 mg/L.

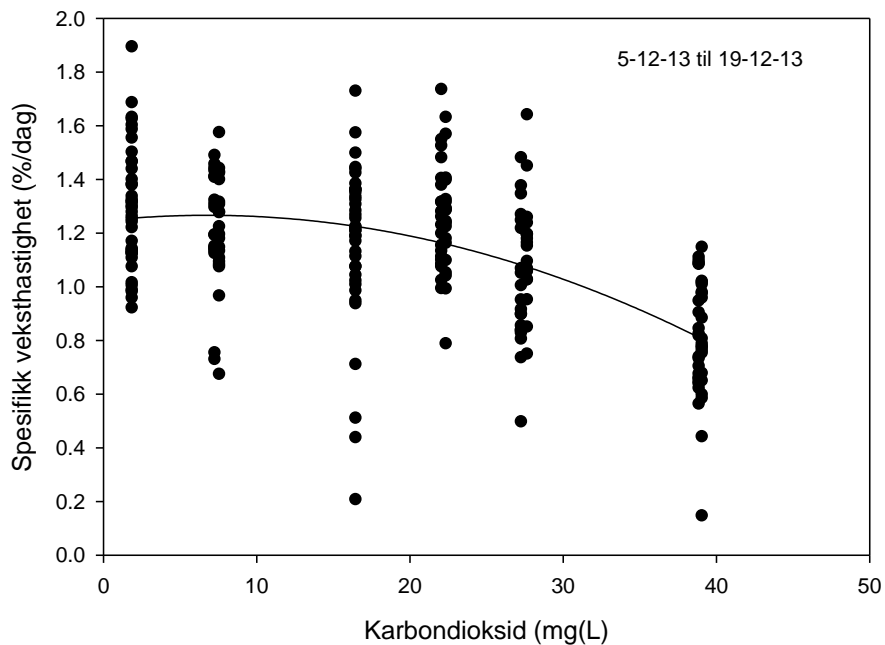
I siste perioden (17. januar til 29. januar) var det igjen en signifikant sammenheng mellom karbondioksid og spesifikk veksthastighet, men i denne perioden så er det lineær regresjon som gir best sammenheng ($p < 0,05$; Fig. 8d):

$$\text{SGR (19-1-29-1-14)} = 1.19227 - 0.0059 * \text{CO}_2 \text{ (mg/L)} \quad (3)$$

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

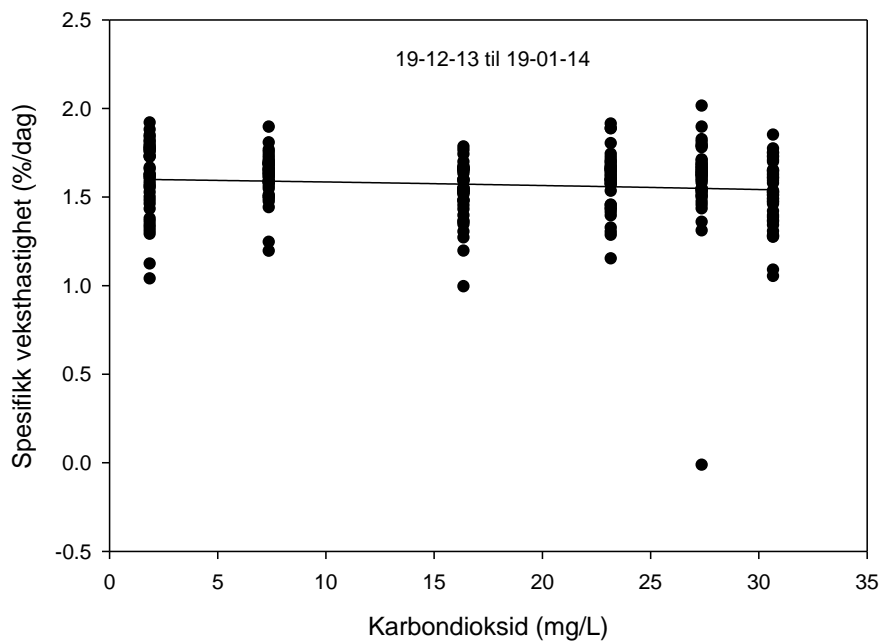


Figur 8a. Spesifikk veksthastighet i perioden 11. desember til 02. desember 2013. Punkta representerer en fisk, og gjennomsnittskonsentrasjonen i de enkelte replikate kar er brukt langs x-aksen.

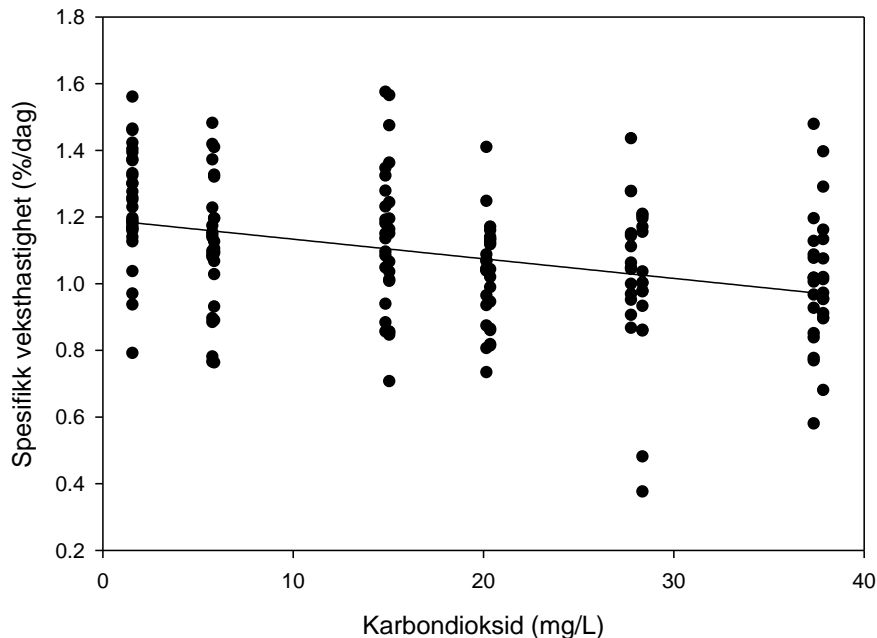


Figur 8b. Spesifikk veksthastighet i perioden 2. desember til 19. desember 2013. Punkta representerer en fisk, og gjennomsnittskonsentrasjonen i de enkelte replikate kar er brukt langs x-aksen.

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt



Figur 8c. Spesifikk veksthastighet i perioden 19. desember 2013 til 17. januar 2014. Punktene representerer en fisk, og gjennomsnittskonsentrasjonen i de enkelte replikate kar er brukt langs x-aksen.



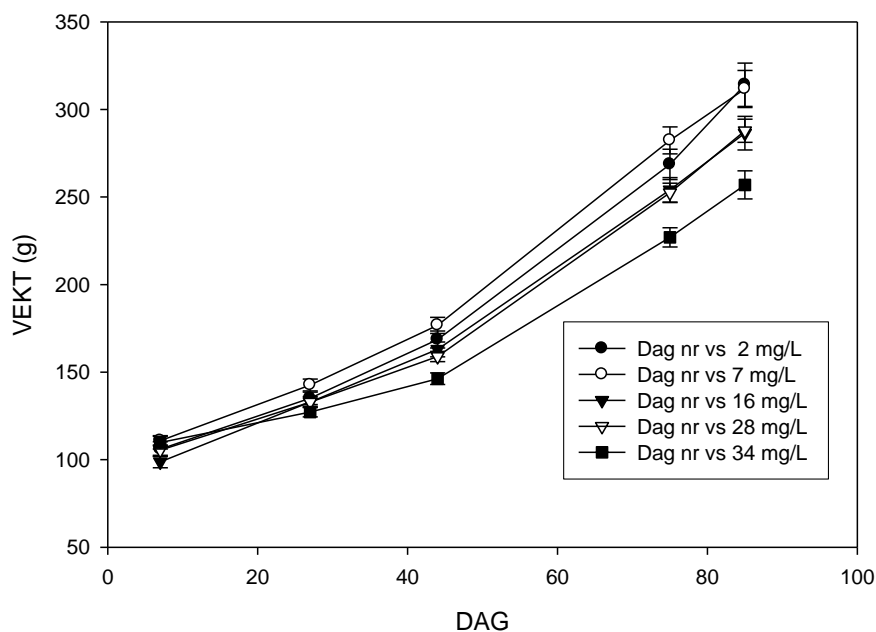
Figur 8d. Spesifikk veksthastighet i perioden 17. januar til 29. januar 2014.. Punktene representerer en fisk, og gjennomsnittskonsentrasjonen i de enkelte replikate kar er brukt langs x-aksen.

Oversikt over vekstresultater.

Det var bare en fisk som døde i forsøket (i høg gruppen med høgest konsentrasjon av karbondioksid). Tabell 3 gir en oversikt over vekstresultatene i forsøket. Gjennomsnittsvekten for gruppen på 7 mg/L er ikke signifikant forskjellig ifra kontrollgruppen på noe tidspunkt. Tabellen viser at gjennomsnittsvekten til postsmolten er signifikant redusert ved avslutningen av forsøket ($p < 0.05$) for de tre gruppene som har gjennomsnitt på 16-28 mg/L. Disse gruppene er ikke signifikant forskjellige. Gruppen på 34 mg/L har signifikant lavere vekt enn alle de andre gruppene ifra 19. desember til 29. januar. Den gjennomsnittlige fiskelengden til denne gruppen var også signifikant redusert ved avslutningen. Vektresultatene er også gitt i figur 9a. Gruppen på 23 mg/L er utelatt i figuren da den ikke er forskjellig ifra gruppen på 16 og 28 mg/L.

Tabell 3. Oppsummering av vekstresultater (gjennomsnitt og standardfeil for vekt og K-faktor). Tilsetningen av karbondioksid startet den 4. november, men var under 10 mg/L i alle grupper frem til 12. november. N er 16-20 den 11. november, 38-40 den 2. desember, 19. desember og 17. januar. den 29. januar og 29-30 (grunnet blodprøveuttak tre dager før).

Dato	Kontrollgruppe	7 mg/L	16 mg/L	23 mg/L	28 mg/L	34 mg/L
11-11-13	106.0±4.23ab	110.8±2.95a	98.7±3.32b	103.0±3.22ab	105.5±2.96ab	109.8±3.66a
2-12-13	135.1±3.57ab	142.6±3.39a	132.9±3.12b	129.9±2.63b	132.8±2.35b	127.2±2.75b
19-12-13	168.6±4.88ab	176.7±4.58a	163.0±4.22b	161.7±3.70b	158.9±2.95b	146.3±3.30c
17-1-14	268±8.65ab	282.3±7.74a	254.1±6.98b	256.2±6.43	252.4±5.51b	227.0±5.51c
29-1-14	314.1±12.36a	311.7±10.60ab	286.4±9.61b	291.1±8.88b	287.8±6.62b	256.9±8.01c
11-11-13	1.060±0.0136a	1.070±0.0171a	1.045±0.0134a	1.072±0.0174a	1.064±0.0121a	1.061±0.0138a
2-12-13	1.136±0.0099a	1.106±0.0072bc	1.127±0.0153ab	1.083±0.0078cd	1.063±0.0080d	1.077±0.0076d
19-12-13	1.162±0.0103a	1.150±0.0101ab	1.138±0.0103ab	1.129±0.0099bc	1.108±0.0075c	1.105±0.0072c
17-1-14	1.245±0.0122	1.239±0.0101	1.222±0.0118	1.215±0.0098	1.199±0.0125	1.226±0.0114
29-1-14	1.261±0.0114a	1.247±0.0134ab	1.223±0.0142bc	1.202±0.0121c	1.202±0.0099c	1.206±0.0110c



Figur 9a. Vektutvikling hos fem av gruppene (gjennomsnittsverdier og standardfeil). Tallene på figuren er gjennomsnittlig konsentrasjon av karbondioksid i hele forsøket. Signifikante forskjeller er gitt i tabell 3.

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

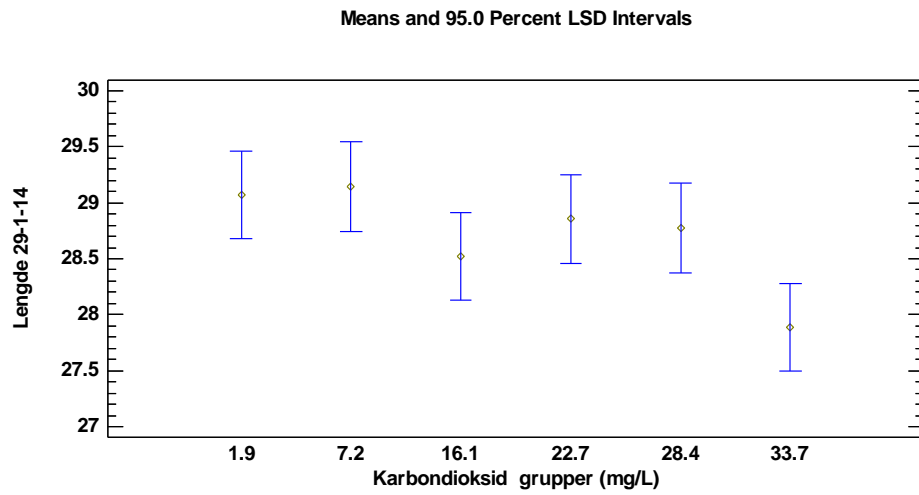


Fig. 9b. Lengden ved avslutningen av forsøket.

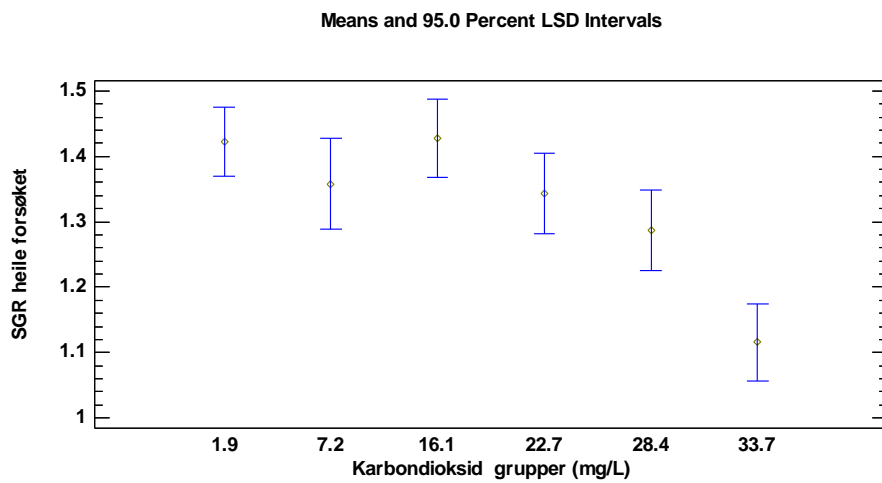


Fig. 9c. SGR for hele forsøket (gjennomsnitt og konfidensintervaller).

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

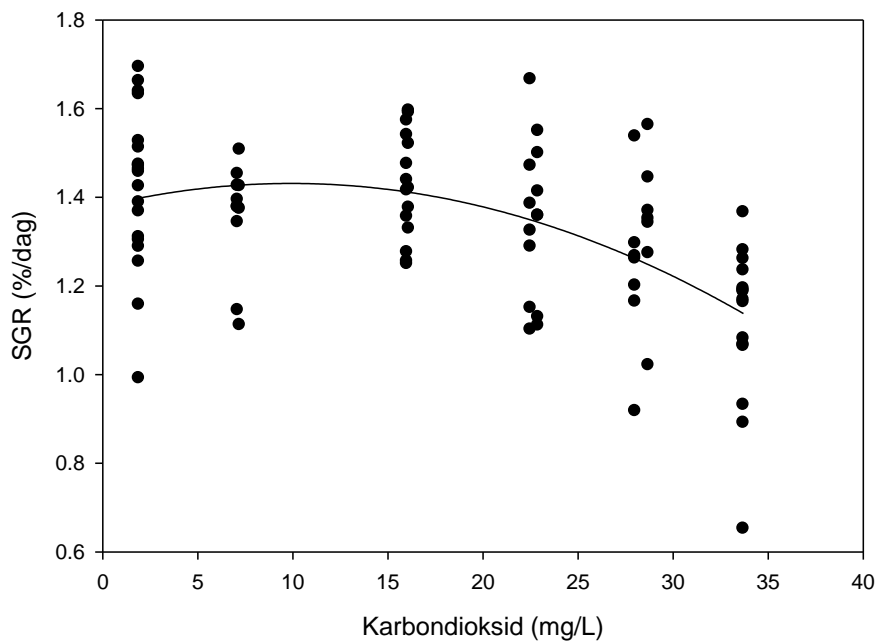


Fig. 9 d. Spesifikk veksthastighet (enkeltverdier) i hele forsøket som funksjon av gjennomsnittlig konsentrasjon i de enkelte fiskekar i hele forsøket.

$$\text{SGR} = 1.3802 + 0.0103 \cdot \text{CO}_2 \text{ (mg/L)} - 0.0005 \cdot (\text{CO}_2 \text{ (mg/L)})^2$$

(R = 0.54; Rsqr = 0.289 Adj Rsqr = 0.272)

Diskusjon

Analysene av de eksterne velferdsindikatorerne, for eksempel finneslitasje og skinnlesjoner, kunne ikke avsløre noen effekt av CO₂ eksponering. Dette skiller seg i fra funn i en nylig studie på postsmolt som brukte samme metode for eksterne velferdsindikatorer (Handeland mfl. 2014). Økende fisketetthet ga i det forsøket negative og signifikante effekter på brystfinneslitasje og katarakt. I den studien ble vanntilførsel justert samtidig med økende tetthet, for å holde CO₂-konsentrasjon og andre vannkvalitets komponenter på samme nivå, og slik at en dermed kunne isolere effekter av tetthet alene. I et parallelt forsøk til tetthetsforsøket, ble vannmengden redusert (forsøksbehandling), men ved en konstant fisketetthet (Handeland mfl., 2014). Da økte CO₂ til omtrent samme konsentrasjons område som her. I dette tilfellet ble det ikke funnet vesentlige endringer i eksterne velferdsindikatorer. Dette støtter funnene i studiet her på effekter av CO₂-eksponering. Person-Le Ruyet et al. (2008) fant at redusert vannkvalitet resulterte i mindre finneslitasje hos regnbueørret og forfatterne forklarte funnet med at redusert vannkvalitet senket aktivitetsnivået hos fisken. Med unntak av en ikke-signifikant trend i ryggfinneslitasje (Fig. 1), ble det i denne studien

ikke gjort tilsvarende observasjoner på postsmolt av laks. Konklusjonen er at selv om CO₂-eksponering kan ha betydelige virkninger på fysiologiske systemer som for eksempel syre-base balanse, ione regulering, og forekomst av nefrokalsinose, virker ikke CO₂-eksponering til 34 mg/l å gi endringer i eksterne velferdsindikatorer hos postsmolt.

Plasma kortisol var heller ikke signifikant forskjellig hos de forskjellige gruppene noe som kan indikere fravær av kronisk stress. Det var en positiv lineær sammenheng mellom partialtrykket av karbondioksid i vannet og i blodplasma. Dette er i overensstemmelse med Ultsch (1996) og Fivelstad (2012). En kunne ha forventet en stigningskoeffisient nærmere 1.0 i stedet for intervallet 1.25-1.34, siden det må antas at det i hovedsak er rent fysiske prosesser som bestemmer denne økningen. Fisken må opprettholde samme differanse mellom partialtrykk i blodplasma og i vannet også når partialtrykket i vannet øker. Reduksjonen i plasma klorid i de eksperimentelle gruppene i det nåverende eksperimentet var sannsynligvis et resultat av elektronøytral ioneutveksling med HCO₃⁻ (Lloyd and White, 1967; Eddy et al., 1977; Fivelstad et al., 2003b; Hosfeld et al., 2008; Petochi et al., 2011). Summen av negative ioner skal være konstant og osmolariteten i plasmaet skal også være konstant (Heisler, 1984). Det var ca. et 1:1 forhold mellom reduksjonen i plasma klorid og økningen av bikarbonat.

Korrelasjonen mellom karbondioksid konsentrasjonen i vannet og plasma klorid konsentrasjonen i blodplasmaet var svært signifikant og det kan være mulig å estimere konsentrasjonen av karbondioksid i vannet utfra konsentrasjonen av plasmaklorid i fisken. Basert på modellen for spesifikk tilvekst for hele forsøksperioden så ble SGR redusert for konsentrasjoner over ca. 19 mg/L. Denne konsentrasjonen tilsvarer en konsentrasjon på ca. 125 mM plasmaklorid inne i fisken (se figurer over karbondioksid plotta mot plasma klorid). I en tilleggsundersøkelse finansiert av Høgskolen i Bergen ble nefrokalsinose også utviklet ved høyere konsentrasjoner enn 16 mg/L, så det kan være en sammenheng mellom plasmaet sin sammensetning og utviklingen av nefrokalsinose. I lukket produksjon av Atlantisk postsmolt vil fisken leve med forhøya karbondioksid konsentrasjon (og partialtrykk) i blodplasma sammenlignet med naturlige økosystemer. Det vil også være høyere enn i merdoppdrett, men det virker som om postsmolten kan leve med denne situasjonen. Likevel vil sammensetningen av kroppsvæskene i lukket oppdrett kunne reise velferdsspørsmål om hvor grensene for forandring i kroppsvæskene skal gå (Huntingford, 2006). I dette forsøket har effekt av økt karbondioksid blitt undersøkt i et gjennomstrømmingsystem likt det en kan

finne i dagens flytende semi-lukkede anlegg i sjø. Når det gjelder landbasert produksjon av postsmolt i RAS, er ikke resultatene fra dette studiet nødvendigvis gjeldende på grunn av et avvikende miljø i RAS (alkalitet, pH, N-fobindelser m.m) i forhold til dette forsøket. CO₂ toleransen må derfor undersøkes spesielt for RAS for postsmolt i brakkvann eller fullstyrke sjøvann, slik det har blitt gjort i ferskvann for større laks (Davidson et al., 2011). I RAS systemer så kan en få samvirkende effekter av flere parametre som vil kunne redusere grenseverdien. På den andre siden så vil en høyere alkalitet kunne motvirke effekten av karbondioksid (Fivelstad, 2012).

Plasma natrium ble redusert i mindre grad enn plasma klorid og det var større spredning mellom enkeltfisker. Forholdet mellom karbondioksid og plasma natrium kan være kompensasjon for redusert plasmaklorid. Stress ville normalt forhøye konsentrasjonen av natrium i sjøvann.

Resultatene i dose respons forsøk er avhengig av varigheten på forsøkene (Colt, 2006). I det nåværende forsøket ble postsmolten i noen grad akklimert til karbondioksid. Det var størst effekter på fisken i første del av forsøket. Fisken tok likevel ikke igjen den tapte tilveksten tidlig i forsøket. Vekstmodellene for de forskjellige periodene ble sannsynligvis påvirket av denne akklimeringen. Dette er særlig tydelig i periode III der også konsentrasjonen for den høyeste gruppen er lavere enn i periode II og IV. Dose respons forholdet i eksperimentelle studier er også avhengig av det aktuelle konsentrasjonsområdet (Shearer, 2000). I det nåværende studiet var oksygenkonsentrasjonen over 80 % som er anbefalt for oppdrett.

Karbondioksid kan være mer toksisk ved lavere oksygenkonsentrasjon (Basu, 1959; Alabaster og Lloyd, 1982), og de trygge nivåene kan derfor ikke brukes ved lavere oksygenmetning.

Referanser

Alabaster, J. S., Lloyd, R., 1982. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Butterworths, 361 pp.

Basu, S. P., 1959. Active respiration of fish in relation to ambient concentrations of oxygen and carbon dioxide. Journal of Research Board of Canada 16, 175-187.

Bergheim, A., Forsberg, O.I., Sanni, S., 1993. Biological basis for land-based farming of Atlantic salmon: oxygen consumption. in: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnerheim, K. (Eds.), Fish Farming Technology. Balkema, Rotterdam, pp. 289-295.

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

Carey, J.B. and McCormick, S.D. 1998. Atlantic salmon smolts are more responsive to handling and confinement stress than parr. *Aquaculture* 168:237-253.

Colt, J., 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacult. Eng.* 34, 143-156.

Davidson, J., Good, C., Terjesen, B.F., Welsh, C., Summerfelt, S., 2011. The effects of high (20 mg/l) and low (10 mg/l) carbon dioxide concentrations on Atlantic salmon *Salmo salar* growout in freshwater closed-containment systems, *Aquaculture America 2011*. World Aquaculture Society, New Orleans, Louisiana, US. <https://www.was.org/WasMeetings/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=21369>

Eddy, F. B., Lomholt, J. B., Weber, J. P., Weber, R. E. and Johanson, K., 1977. Blood respiratory properties of rainbow trout kept in water of high CO₂ tension. *J. Exp. Biol.*,67: 37-47.

Fivelstad, S., 1988. Waterflow requirements for salmonids in single pass and semi-closed landbased seawater and freshwater systems. *Aquacult. Eng.*, 7, 183-200.

Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G., Olsen, A. B., 1998. Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 160, 305-316.

Fivelstad, S., Olsen, A. B., Kløften, H., Ski, H., Stefansson, S., 1999. Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture* 178, 171-177.

Fivelstad, S., Olsen, A.B., Wågbo, R., Zeitz, S., Hosfeld, A.-C.- D., Stefansson, S. 2003. A major water quality problem in smolt farms: Combined effects of carbon dioxide and reduced pH (Al) on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 215, 339-357.

Fivelstad, S., Olsen, A., Åsgård, T., Bæverfjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T., Stefansson, S.O., 2003b. Long-term sub-lethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts: ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture* 215, 301-319.

Fivelstad, S., Wågbo, R., Olsen, A. B., Stefansson, S. 2007. Impacts of elevated water carbon dioxide partial pressure at two temperatures on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and haematology. *Aquaculture* 269, 241-249.

Fivelstad, S. 2012. Long term carbon dioxide experiments with salmonids. Online publication complete: 20-DEC-2012. DOI information: 0.1016/j.aquaeng.2012.11.006

Fivelstad, S., Kvamme, K., Handeland, S., Fivelstad, M., and Olsen, A.B. 2015. Growth and physiological models for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr exposed to elevated carbon dioxide concentrations at high temperature. *Aquaculture* 436, 90-94.

Handeland, S., Fivelstad, S., Terjesen, B. 2014. Effekter på helse, sykdom og velferd ved postsmoltproduksjon i semi-lukkede anlegg - Del A: Tetthetstoleranse og vannforbruk –FHF 900816. Sluttrapport, s. 1-41.

Heisler, N., 1984. Acid-base regulation in fishes. In: W.S. Hoar and D. J Randall (Eds.), *Fish Physiology* XA, Academic Press, New York, pp. 315-399.

Heisler, N., 1986. Mechanisms and limitations of fish acid-base regulation. In: S. Nilsson and S. Holmgren (Editors), *Fish physiology: recent advances*, Croom Helm, London, pp. 24-49.

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.

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

- Hosfeld, C.D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T., Waagbø, R., Olsen, A. B., Breck, O., Stefansson, S., Fivelstad, S., 2008. Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 280 (1-4), 146-153.
- Janson, R. G., Randall, D. J., 1975. The effects of changes in pH and P_{CO_2} in blood and water on breathing in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Respir. Physiol.* 25, 236-245.
- 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, 261-274.10.1016/0044-8486(88)90060-9
- Kolarevic, J., Selset, R., Felip, O., Good, C., Snekvik, K., Takle, H., Ytteborg, E., Bæverfjord, G., Åsgård, T., Terjesen, B., 2012. Influence of long term ammonia exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr growth and welfare. *Aquaculture Research* (doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03170.x).doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03170.x
- Lloyd, R., White, W. R., 1967. Effect of high concentration of carbon dioxide on the ionic composition of rainbow trout blood. *Nature* 216: 1341-1342.
- Person-Le Ruyet, J., Labbé, L., Le Bayon, N., Sévère, A., Le Roux, A., Le Delliou, H., Quémener, 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.
- Petochi, T., Di Marco, P., Priori, A., Finioia, M. G., Mercatali, I., Marino, G. 2011. Coping strategi and stress of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic environmental hypercapnia under hyperoxic conditions. *Aquaculture* 315, 312-320.
- 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.
- Sanni, S., Forsberg, O.I., 1996. Modelling pH and carbon dioxide in single pass sea water aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 15(2), 91-110.
- Shearer, K. D., 2000. Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirements studies for fish: a critical review. *Aquacult. Nutr.* 6, 91-102.
- Smart, G. R., 1981. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: Pickering, A. D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, London, pp. 277-289.
- Smart, G. R., Knox, D., Harrison, J. G., Ralph, J. A., Richards, R. H., Cowey, C. B., 1979. Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO_2 concentration. *J. Fish Diseases* 2, 279-289.
- Smith, F. M., Jones, D. R., 1982. The effect of changes in blood oxygen carrying capacity on ventilation volume in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 97, 325-334.
- Stolte, E.H., de Mazon, A.F., Leon-Koosterziel, K.M., Jesiak, M., Bury, N.R., Sturm, A., Savelkoul, H.F.J., van Kemenade, B.M.L.V., Flik, G., 2008. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Endocrinology*. 198, 403-417.10.1677/joe-08-0100
- Thorarensen, H., Farrell, A., 2011. The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture*. 312, 1-14

Grenseverdi for karbondioksid for postsmolt

Ultsch, G. R., 1996. Gas exchange, hypercarbia, and acid-base balance, palaeoecology, and the evolutionary transition from water-breathing to air-breathing among vertebrates. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 123: 1-27.