

Stress og stressreduksjon ved trenging av atlantisk laks i merd

Trenging av laks i merd utløser en stressrespons hos fisken. Forsøket belyser stressrespons og skader på fisken under en slik operasjon, og effekten av sedasjon med isoeugenol (AQUI-S® vet., Scan Aqua AS) under trengingen.

Innledning

Trenging

Trenging av laks i merd er en nødvendig del av mange operasjoner som gjøres i løpet av oppdrettslaksens produksjons-syklus. Lasting av brønnbåt i forbindelse med levering av slaktefisk, medikamentell badebehandling i brønn eller ikke-medikamentell avlusing innledes alltid med trenging av fisken, etterfulgt av pumping.

Det er godt kjent at trenging medfører betydelig stress hos fisken. Nivåene av laktat og kortisol i plasma stiger, mens pH i muskulatur faller (1). Utmattelse etter slikt stress kan medføre økt risiko for tap i påfølgende prosedyrer og redusert kvalitet på slaktefisken (2).

Sedasjon

Sedasjon er en beroligende effekt som kan oppnås ved å gi lave doser av et anestesimiddel. Bevissthet og likevekt beholdes, men reaksjonen på sensoriske inntrykk reduseres og dermed innvirkningen på fiskens adferd og fysiologi. Fisken svømmer roligere og ventilerer mindre (3).

Aqui-S® vet. er et legemiddel med norsk markedsføringstillatelse for bruk til sedasjon av laks og regnbueørret ved håndtering. Det aktive virkestoffet er isoeugenol (540 mg/mL). Anbefalt dose for sedasjon er 2-5 mg isoeugenol/L (4), tilsvarende 4-10 ml Aqui-S pr. m³ vann.

For å undersøke fiskens stressrespons under trenging, og hvorvidt reaksjonen kunne reduseres ved sedasjon, ble det i januar 2018 gjennomført et kontrollert forsøk ved Letsea, Avdeling Forsøksstasjonen på Solfjellsjøen, Dønna i Nordland.

Materiale og metoder

Anlegg og miljø

Det ble brukt fire kvadratiske småmerder (5 x 5 meter) til forsøket. Enhetene - heretter kalt merd A, B, C og D - lå ved siden av hverandre på samme side av hovedgangveien, slik det fremgår av Figur 1.

Vanntemperaturen var 5,5 °C og saliniteten 34 ‰. Oksygennivåer ble kontinuerlig overvåket i alle merder igjennom forsøket. Disse ble holdt på en metningsgrad mellom 90 og 100 %.

FORFATTERE:

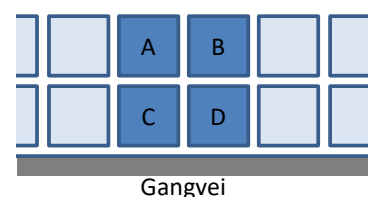
- Lars A. Speilberg
Scanvacc AS
Postboks 233, 2151 Årnes
E-post: lars.speilberg@scanvacc.com
- Kristian Nordøy
Letsea AS
- Ole Kristian Kaurstad
Scanvacc AS
- Jon Inge Erdal
Scanvacc AS

KEY WORDS:

Atlantic salmon *Salmo salar* L., crowding, stress, sedation, isoeugenol

Fisk

I merdene var det atlantisk laks (*Salmo salar* L.) med snittvekt på ca. 4,2 kilo. Antall og dermed biomasse varierte mellom merdene (Tabell 1). Snittvekt og biomasse i tabellen er beregnet ut fra vekten av de 48 fisk fra hver merd som ble samlet. Fisken ble sultet i 3 døgn før forsøksstart.



Figur 1. Oversikt over merdplassering

Tabell 1. Antall laks i hver merd ved forsøksstart

Merd	Antall laks	Snittvekt (g)	Biomasse (kg)
A	212	4389	930
B	101	4264	443
C	97	4181	426
D	99	4140	435

Forsøksdesign

Forsøket ble gjennomført i to omganger, med én dags opphold mellom forsøksdagene. Begge dager ble alle merdene trent i samme rekkefølge; A, B, C, D. På Dag 1 ble fisken i merd B og D sedert for trenging, mens merd A og C ble trent uten sedasjon. På Dag 2 ble fisken i merd A og C sedert for trenging, mens B og D ikke ble sedert. Alle merdene ble trent både med og uten sedasjon. Forsøksdesignet ble valgt for å redusere merdeeffekten.

Fremgangsmåte for trenging - sedert merd

Merden ble forsiktig linet opp til ca. 2 meters dybde, og det ble satt en spesielt heldekkende presenning med volum på 100 m³ utenpå noten. Deretter ble 12 fisk fanget med håv og overført til et bedøvelseskar med metomidat hydro-

klorid (Aquacalm vet., Syndel) i konsentrasjon 10 mg/L for nullprøver. Karet ble straks fraktet til laboratorium for velferdsscoreing og blodprøveuttak. Det ble så tilsatt en stamløsning av isoeugenol i vann (AQUI-S® vet., Scan Aqua AS), og gitt 15 minutter for at sedasjonen skulle få tid til å inntre. Deretter ble fisken trent ved videre opplining for å imitere driftsmessig trenging i merd for pumping. Etter 60 minutters trenging ble nye 12 fisk fanget med lang håv og overført til bedøvelse for velferdsscoreing og blodprøveuttak.

På forsøksdag 1 ble det benyttet 5 ml AQUI-S® vet. (Scan Aqua AS) pr. m³. Dette ga en noe dyp sedasjon i en av merdene der enkelte fisk hvilte mot bunnen av nota. Ufullstendig fylling av presenningen, slik at volumet reelt var mindre enn 100 m³, har antagelig

Tabell 2: Oversikt og beskrivelse av trengingsgrad

Nivå	Vurdering av velferd	Beskrivelse
1	Svært bra	<ul style="list-style-type: none"> • Lavt stressnivå, ingen panikkaktivitet • Isolert fisk som svømmer sakte • Normal svømmeatferd, ikke nødvendigvis i samme retning • Ingen ryggfinner bryter vannoverflaten, ingen hvite sider å se
2	Akseptabelt	<ul style="list-style-type: none"> • Få ryggfinner bryter vannoverflaten og ingen hvite sider å se • Normal svømmeatferd ved inntak til pumpen • Lavt nivå av stress
3	Uønsket	<ul style="list-style-type: none"> • Oppjaget atferd med hektisk svømming i forskjellige retninger • Mer enn 20 ryggfinner bryter vannflaten, og noen hvite sider synlig mesteparten av tiden
4	Uakseptabelt	<ul style="list-style-type: none"> • Svært høy aktivitet med svømming i alle retninger og noen fisker med nedsatt aktivitet • Ikke mulig å holde en konstant pumperate • Mye fisk fast i trengingsnota • Mange ryggfinner og hvite sider å se i overflaten • Noen få veldig «sløve» fisker
5	Ekstremt uakseptabelt	<ul style="list-style-type: none"> • Ekstrem trenging og panikk i populasjonen, fisken er utmattet • Fisk vil dø fort hvis ikke trengingen opphører umiddelbart • Mange fisker flyter på siden

forsterket effekten. På forsøksdag 1 ble dosen redusert til 4 mL AQUI-S® vet. (Scan Aqua AS) pr. m³ for å ta høyde for dette.

Fremgangsmåte for trenging - usedert merd

Merden ble forsiktig linet opp til ca. 2 meters dybde. Deretter ble 12 fisk fanget med håv og overført til et bedøvelseskar med metomidat hydroklorid (Aquacalm vet., Syndel) i konsentrasjonen 10 mg/L for nullprøver. Karet ble straks fraktet til laboratorium for velferdsscoreing og blodprøveuttak. Deretter ble fisken trent ved videre opplining for å imitere driftsmessig trenging i merd for pumping. Etter 60 minutters trenging ble nye 12 fisk fanget med lang håv og overført til bedøvelse for velferdsscoreing og blodprøveuttak.

Det ble etterstrebet å ha så lik grad av trenging som mulig i alle enhetene (Figur 2). Ved start av trengingen ble det forsøkt å trenge til nivå 2 slik det er beskrevet i Fishwell-rapporten (6). Nivåene er gjengitt i Tabell 2.

Prøveuttak og analyser (inkl. statistikk)

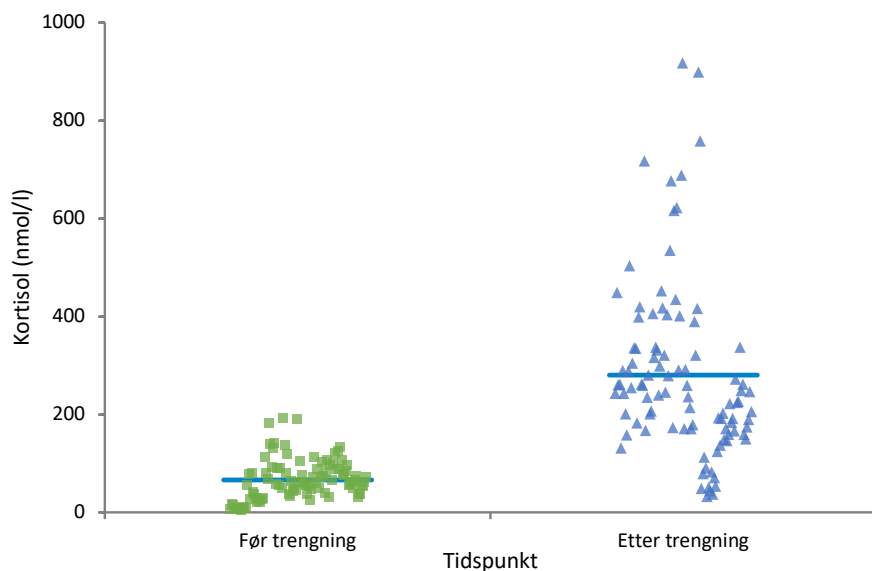
Det ble tatt blodprøver fra halevenen med «BD Vacutainer® Glukose» blodprøveglass tilsatt NaFluorid og Kalium Oxalat (Becton, Dickinson and Company, Switzerland) for å hemme glykolyse og hindre koagulasjon. Blodet ble sentrifugert direkte i puljer på 12 i en Sigma sentrifuge modell 101 ved 447 g. Plasma ble overført til Eppendorfrør og umiddelbart satt på is før nedfrysning til -20 °C. Plasma-prøvene ble sendt til analyse ved NTNU, Fakultet for naturvitenskap, Institutt for biologiske fag Ålesund. Kortisol ble målt i duplikater med DetectX® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays™) i henhold til produsentens prosedyre (5) og lest av fotometrisk ved 450 nm ved bruk av Multiskan™ FC (Thermo Scientific™).

Laktat ble målt med analyseinstrument ABX Pentra C400 (Horiba Medical) og laktatregenset A11A01721 (Lactic Acid, Horiba Medical).

Etter blodprøveuttakene ble fisken scoret for hudblødninger, sår og skjelltap i henhold til Veterinærinstituttets standardiserte skjema for velferdsregistrering, akutte ytre skader, på en skala fra 0 til 3 (6).



Figur 2: Typisk trengingsgrad



Figur 3. Individuelle kortisolmålinger før og etter trenging; begge grupper samlet. Horisontal strek angir gjennomsnitt. (n=96 på hvert tidspunkt)

Analyseresultatene ble statistisk behandlet i programmet Analyse-it™ for Microsoft Excel (Analyse-it Software, Ltd.). Students t-test ble benyttet for sammenlikning av kortisol og laktat-

nivåer ($p = 0,05$). Wilcoxon-Mann-Witney test ble benyttet for sammenlikning av hudblødninger, sår og skjelltap ($p = 0,05$).

Resultater

Adferd under trenging

Alle merdene ble linet opp til enkelte ryggfinner begynte å bryte overflaten, men uten at fisken virket stresset (Nivå 2 i Tabell 2). Denne oppliningen ble beholdt uendret i 60 minutter. I usederte merder utviklet adferden seg ofte til nivå 3 under trengingen, med mer hektisk svømming og flere finner og snuter i overflaten. I sederte merder så man ikke en tilsvarende utvikling i trengingsperioden. I stedet svømte fisken rolig og tilfeldig i merden. Imidlertid var det en del hvite sider å se; fisk som langsomt la seg over mot én side for så å rette seg opp igjen. Dette er en vanlig observasjon på sedert fisk. I merd D på dag 1 var det i tillegg enkelte individer som hvilte lengre perioder mot notbunn og sider. På dag 2, da dosen Aqui-S var redusert fra 5 til 4 ml/m³, så man ikke slik hvilende fisk.

Kortisol

Tabell 3 viser gjennomsnittlige kortisolverdier i hver merd før og etter trenging, hhv. med og uten sedasjon (n=12), samt snitt for alle merdene. Samlet steg kortisolverdiene kraftig under trengingen (Figur 3). Stigningen var statistisk signifikant.

Før trenging var det gjennomsnittlige kortisolnivået noe høyere i merdene som skulle sederes; 78 nmol/L mot kontrollmerdene 54 nmol/L (Figur 4). Forskjellen var statistisk signifikant.

Etter trenging var det gjennomsnittlige kortisolnivået langt lavere i merdene med laks som var sedert enn hos laks i kontrollmerdene; 221 nmol/L mot 340 nmol/L (Figur 4). Forskjellen var statistisk signifikant.

Laktat

Før trenging var gjennomsnittlig laktatnivå ikke statistisk signifikant forskjellig mellom gruppene. Etter

Tabell 3. Gjennomsnittlige kortisolkonsentrasjoner i plasma (nmol/L) før og etter trenging

Merd	A		B		C		D		Samlet gjennomsnitt
	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	
Sedasjon	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	N=96
Antall laks	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=96
Før trenging	40	10	104	87	72	64	97	55	66
Etter trenging	324	273	314	503	69	359	176	224	280

Tabell 4. Gjennomsnittlig score for velferdsindikatoren «Skjelltap» før og etter trenging av sedert laks og usedert kontrollaks (n=48)

Gruppe	n	Sedert laks	n	Usedert laks
Før trenging	12	1,63	12	1,46
Etter trenging	12	1,67	12	2,04

trenging var imidlertid nivået kraftig forhøyet blant usedert kontrollfisk, mens det ikke steg når fisken var sedert under trenging (Figur 5). Forskjellen i laktatnivået etter trenging var statistisk signifikant.

Velferdsindikatorer

Trengingene medførte tap av skjell. Samlet steg indikatoren «Skjelltap» fra score 1,54 til 1,89 (Tabell 4). Stigningen var statistisk signifikant.

Skjelltapet var imidlertid lavere blant sedert fisk. Forskjellen i score mellom gruppene etter trenging var statistisk signifikant.

I forsøket ble det ikke påvist statistisk signifikant økning for indikatorene «Hudblødninger» og «Sår» under trengingene, hverken for sedert eller usedert fisk.

Diskusjon

Resultatene fra forsøket bekrefter at trenging i merd medfører et betydelig stress på fisken. Både kortisol- og laktatnivåene steg betydelig, selv ved

den relativt skånsomme trengingen som ble gjort. Dette er i tråd med tidligere studier hvor man har studert effekt av økt tetthet på fisken, enten i form av senkning av vannstand i kar (8, 9), eller trenging i ventemerd før innpumping til slakt (1, 2). Trengingen medførte dessuten tap av skjell på fisken.

Risikoen forbundet med trenging er godt kjent i oppdrettsnæringen. Flere selskap har utarbeidet retningslinjer for å unngå for lang eller for hard trenging i merd (Pers. meddelelser; Berit Seljestokken, Grieg Seafood; Marianne Halse, SalMar). Slik optimalisering av rutinene er selvsagt det viktigste virkemiddelet for å redusere påkjenningene på fisken. Erfaring har imidlertid vist at man allikevel kan oppleve dramatiske skader og tap i etterkant av trenging. Dette gjelder spesielt der fisken er påkjent på forhånd, for eksempel på grunn av hjerte og skjelettmuskel betennelse (HSMB)(10), eller der trengingen umiddelbart etterfølges av en ny hard stressbelastning. Mekanisk avlusning er et typisk eksempel på dette. I følge spørreundersøkelser gjennomført av

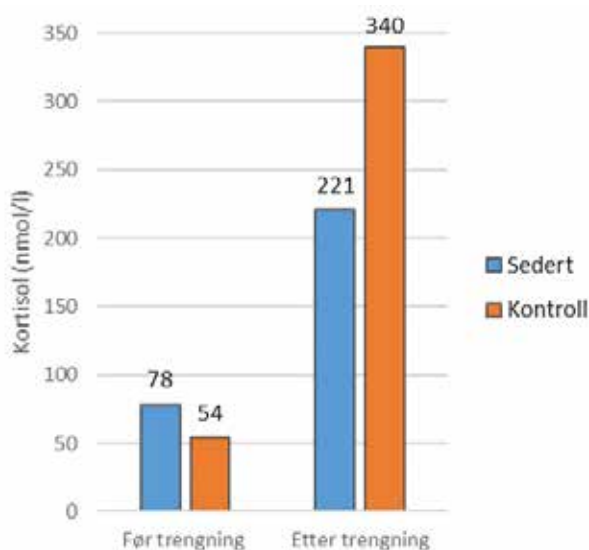
Veterinærinstituttet opplyser 93 % av fiskehelsepersonell at de har opplevd «betydelig dødelighet» ved ikke-medikamentelle metoder (IMM) mens 65 % rapporterer at de har opplevd «betydelig dødelighet» ved medikamentell avlusning (10). Man anser trengingen i seg selv som det største risikomomentet knyttet til mekanisk avlusning (10).

Tallene fra dette forsøket viser at sedasjon med isoeugenol kan redusere de negative effektene av trenging i merd. Liknende effekt under trenging i kar er dokumentert for smolt av atlantisk laks (9), og for kanalmerd (11). Forfatterne av denne studien er ikke kjent med andre tilsvarende studier med stor laks.

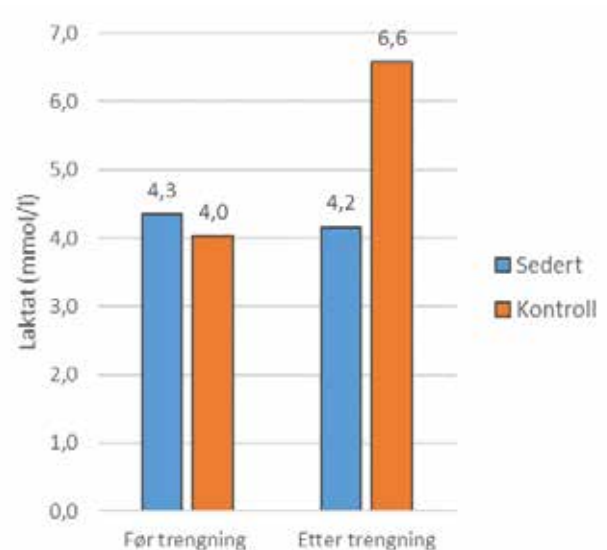
I det rapporterte forsøket hadde sedert fisk signifikant lavere nivåer av kortisol og laktat enn kontrollfisken, samt lavere score for ristetap etter 60 minutters trenging i merd.

Effektene av kortisol hos fisk er godt dokumentert (12, 13). Mellom annet mobiliseres glykogen fra fiskens lagre i lever og muskulatur og gir mer tilgjengelig glukose som energikilde for fiskens stressadferd. Dersom tilbudet av glukose øker raskere enn oksygentilgangen resulterer dette i en ufullstendig forbrenning og opphopning av laktat i blodet. Øket nivåer av laktat og glukose i blodet benyttes derfor ofte som stressindikatorer ved siden av kortisol.

Lavere laktatnivåer på fisk sedert med isoeugenol kan forklares av lavere



Figur 4. Gjennomsnittlig kortisolnivå før og etter trenging av sedert fisk og usedert kontrollfisk (n=48 for hver søyle)



Figur 5. Gjennomsnittlig laktatnivå før og etter trenging av sedert fisk og usedert kontrollfisk (n=48 for hver søyle)

kortisol. I tillegg gir sedasjonen lavere fysisk aktivitet, og dermed mindre fare for opphopning av laktat.

Lavere fysisk aktivitet vil dessuten kunne forklare det lavere risttapet på sedert fisk under trengingen.

Sammendrag

Trenging i merd er en prosedyre som inngår i laksens produksjonssyklus. Håndteringen utgjør en betydelig påkjenning for fisken, med fare for stress og fysiske skader. For å kvantifisere disse effektene og undersøke om sedasjon med isoeugenol kan redusere de negative effektene ble det gjennomført

et kontrollert forsøk med trenging av fisk i 4 småmerder med og uten sedasjon. Isoeugenol reduserte nivåene av kortisol og laktat og ga mindre skjelltap på fisken målt etter 60 minutters trenging.

Resultatene indikerer at sedasjon med isoeugenol kan være et aktuelt tiltak for å redusere stress og skader under trenging.

Summary

“Stress and stress mitigation by sedation during crowding of Atlantic salmon in net-pens”

Crowding of fish in net-pens is a standard procedure as part of many

operations during the production cycle of Atlantic salmon. The handling entails considerable stress and risk of trauma to the fish. To measure these effects and study whether isoeugenol sedation can reduce the impact of crowding stress, a controlled trial was performed, in which fish in 4 pens were crowded with and without sedation.

Sedation significantly reduced the levels of cortisol and lactate following 60 minutes crowding, and led to less loss of scales.

The results indicate that sedation with isoeugenol could be a relevant measure to reduce stress and trauma during crowding.

Referanser

- Erikson U, Gansel L, Frank K, Svendsen E, Digre H. Crowding of Atlantic salmon in net-pen before slaughter. *Aquaculture* 2016; 465: 395-400.
- Roth B, Grimsbø E, Slinde E, Foss A, Stien LH, Nortvedt R. Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. *Aquaculture* 2012; 326-329: 178-80.
- Ross LG, Ross B. The nature of anaesthesia, sedation and analgesia. I: *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008: 41-51.
- ScanAqua. Preparatomtale AQUI-S vet. <https://scanvacc.com/wp-content/uploads/2015/05/aqui-s-preparatomtale-2013-05-14.pdf> (4.6.2018)
- Arbor Assays. DetectX® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit. <http://www.arborassays.com/documentation/inserts/K003-H.pdf> (4.6.2018)
- Noble C, Nilsson J, Stien LH, Iversen MH, Kolarevic J, Gismervik K, red. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. Sluttrapport fra FHF prosjekt 901157. Tromsø: Nofima, 2018: 233. <https://nofima.no/wp-content/uploads/2016/06/Velferdsindikatorer-for-oppdrettslaks-2018.pdf>
- Noble C, Nilsson J, Stien LH, Iversen MH, Kolarevic J, Gismervik K, red. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. Sluttrapport fra FHF prosjekt 901157. Tromsø: Nofima, 2018: 206-7. <https://nofima.no/wp-content/uploads/2016/06/Velferdsindikatorer-for-oppdrettslaks-2018.pdf>
- Basrur TV, Longland R, Wilkinson RJ. Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem* 2010; 36: 445-50.
- Iversen M, Eliassen RA. The effect of AQUI-S® sedation on primary, secondary, and tertiary stress responses during salmon smolt, *Salmo salar* L., transport and transfer to sea. *J World Aquac Soc* 2009; 40: 216-25.
- Hjeltnes B, Bornø G, Jansen MD, Haukaas A, Walde C, red. Fiskehelserapporten 2016. Oslo: Veterinærinstituttet, 2017: 29, 52, 88. (Rapport nr 4/2017.) <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/fiskehelserapporten-2016>
- Small BC. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture* 2004; 238: 469-81.
- Barton, BA. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol* 2002; 42: 517-25.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 1999; 9: 211-68.