

**Nofima AS**

Postboks 6122, NO-9291 Tromsø

Besøksadr.: Muninbakken 9–13,

Tlf.: 77 62 90 00

Faks: 77 62 91 00

nofima@nofima.nowww.nofima.no

Organisasjonsnr.:

NO 989 278 835 MVA

Arbeidsnotat

Dette arbeidsnotatet inneholder prosjektinformasjon og foreløpige resultater, som internt og uformelt underlag for endelig prosjektrapport fra Nofima Marin. Nofima Marin hefter ikke for notatets innhold, og resultater/data vil i den godkjente prosjektrapport kunne avvike fra notatets opplysninger uten spesiell varsel eller henvisning til dette. For åpne prosjekter tas forbehold mot gjengivelse av innholdet, idet det eventuelt vil bli søkt utnyttet i forbindelse med patentering, publikasjoner o.l.

	<i>Tilgjengelighet:</i> ÅPEN	<i>Notat nr:</i>
<i>Tittel:</i> Effekt av trengetid på ulike stressvariable og restitusjonstid hos Atlantisk laks smolt – kontrollert forsøk ved Nofima Sunndalsøra 30-31. mai 2012	<i>Dato:</i> 17. august 2012	
	<i>Antall sider og bilag:</i>	
<i>Forfatter(e):</i> Åsa Maria Espmark	<i>Prosjektnr.:</i> 21298	
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 900660	
<i>Tre stikkord:</i> Trengetid, restitusjonstid, molt	<i>Går til:</i>	
<i>Sammendrag:</i>		

Innhold

1	Bakgrunn	1
2	Metode	2
2.1	Informasjon om fisk	2
2.2	Forsøksoppsett og trengeprosedyre	2
2.3	Prøveuttak	3
2.4	Kvantifisering av skjelltap	4
2.5	Statistikk	4
3	Resultat og diskusjon	5
3.1	Fysiologisk stress	5
3.2	Kvantifisering av skjelltap	6
4	Konklusjon	8
5	Litteratur	9

1 Bakgrunn

I prosjektet «pumping og håndtering av smolt» skal effekter av trenging av smolt undersøkes. På oppstartmøtet for prosjektet 8. desember 2011 ytret styringsgruppa et ønske om at prosjektet undersøker effekter av ulik trengetid, og hvordan dette påvirker restitusjon etter en stresspåvirkning. Smolt trenges oftest når den skal vaksineres eller uttransporteres til sjø. Dette skjer da ved at vannivået i karene senkes og fisken tømmes ut. Næringen har selv et inntrykk av at lang trengetid stresser fisken, men også at trenging ikke må bli så kort og intens at tettheten blir for stor. Denne antakelsen er ikke dokumentert. Næringen er også opptatt av å vite hvor lang tid etter en stresspåvirkning fisken har forhøyede nivåer av stressvariable i blodet. Også for forsøksuttak er det viktig å vite hvor lang tid det tar etter en stresspåvirkning før responsen kommer. Dersom formålet med prøveuttaket er å følge en prosess (slakting eller utsett) er det vesentlig å kjenne latenstiden før en respons inntreffer slik at det er kjent hva som faktisk blir målt. Restitusjonstid er også lite dokumentert, med unntak av Iversen et al. (2009) som har sett på utvilkingen av flere stressvariable over tid etter kommersiell transport.

2 Metode

2.1 Informasjon om fisk

Fisken som ble brukt i dette forsøket var fra AquaGen stammen. Gjennomsnittstørrelsen ved prøveuttaket var $177,7 \pm 20,3$ g.

Fisken ble flyttet til de aktuelle karene 24. mai, dvs en uke før forsøket. Denne flyttingen innebar samtidig flytting fra fersk til salt vann. Fisken var satt på mørke (12:12) 24. februar 2012, og på 24 timer kontinuerlig lys 19. april. Ved flytting til salt vann var fisken 376 døgngrader (smoltvindu ligger på 360 – 420 døgngrader). Vanntemperaturen de to siste ukene før flytting var $10,2 - 10,8$ °C, mens under forsøkene lå vanntemperaturen stabilt på $8,2$ °C.

2.2 Forsøksoppsett og trengeprosedyre

To-tusen-og-syttifem smolt ble fordelt på tyve kar (400 L). Før trening var tettheten i karene $45 \pm 0,8$ kg/m³, mens etter trening var tettheten i karene $311 \pm 5,8$ kg/m³ (Fig. 1).

Duplikate kar utgjorde en behandling. Fiskene i forsøket med utsatt for kort (1 time) eller lang (3 timer) trengetid, og prøvetaking av individer ble foretatt ved fire tidspunkt etter trening for å måle restitusjon. For å unngå repetitivt stress i hvert kar ble hvert kar tatt prøver fra kun en gang. Prøveuttaksdesign er vist i tabell 1.



Figur 1. Forsøkskar før trening (til venstre, $45 \pm 0,8$ kg/m³) og etter trening (til høyre, $311 \pm 5,8$ kg/m³)

Tabell 1. Prøveuttakdesign. Fra hvert av de tyve karene ble det tatt prøver av fisk kun en gang.

Trengetid	Restitusjonstid (prøvetakingstid)	Gjentak (kar)	Kortnavn
Kort (1 time)	Rett før trengestart	2	Kontroll
Kort (1 time)	Ved ferdig trening, dvs 1 time etter	2	T1 kort

	trengestart		
Kort (1 time)	To timer etter trengeslutt	2	T2 kort
Kort (1 time)	Seks timer etter trengeslutt	2	T3 kort
Kort (1 time)	Tyve timer etter trengeslutt	2	T4 kort
Lang (3 timer)	Rett før trengestart	2	Kontroll
Lang (3 timer)	Ved ferdig trenging, dvs 3 timer etter trengestart	2	T1 lang
Lang (3 timer)	To timer etter trengeslutt	2	T2 lang
Lang (3 timer)	Seks timer etter trengeslutt	2	T3 lang
Lang (3 timer)	Tyve timer etter trengeslutt	2	T4 lang

Trenging ble utført på mest mulig kommersiell lik måte, ved at vannet ble tappet fra karene. Tappingen foregikk med jevn hastighet, og trengetid ble målt etter at nedtappingen var fullført. Nedtapping fra 275 liter til ca 40 liter tok ca 2 minutter. I løpet av hele nedtappingsperioden og trengeperioden ble det tilført kontinuerlig vann for å sikre vannkvaliteten. Etter avsluttet trenging (1 eller 3 timer) ble vannet igjen hevet til 275 liter. Oksygenivåene i vann ble registrert før og 30 minutter etter start trenging.

2.3 Prøveuttak

Ved prøvetaking til de definerte tidspunktene (Tab. 1) ble det tatt ut femten individer fra hvert av de tyve karene. Hvert individ ble håvet fra karet og umiddelbart avlivet med slag mot hodet. For hvert individ ble det tatt målinger av vekt og lengde. I tillegg ble pH i muskel målt på fisken sin venstre side over laterallinjen med pH meter (WTW pH 330/SET-1) utstyrt med pH elektode (Hamilton model 238400/06) og temperatur probe (WTW TFK 325). pH blod, pCO₂, pO₂, HCO₃, TCO₂, O₂ metning og Ca ble målt med i-STAT® transportable analysator (i-STAT, Abbott, Princeton, NY, USA) sammen med CG8+ engangskassetter, ved 20 °C. Glukose ble målt med FreeStyle-måler utstyrt med FreeStyle-lite strips, og laktat ble målt med Arkray LactatePro testmeter (Shiga, Japan) sammen med LactatePro strips. I tillegg ble blod sentrifugert ved 3000 omr i 10 minutter og plasma frøset ved -20 °C for kortisolanalyser. Kortisolanalyserne ble utført med Spectria® Cortisol RIA (Cat. No. 06119) (grensenivå = 2.0 ng/ml).

Blodprøver ble tatt fra haleregionen med sprøyte (22G x 1; 0.7 mm x 25 mm) og heparinisertevakutainers rett etter avliving.

2.4 Kvantifisering av skjelltap

For kvantifisering av skjelltap fra karene ble en håv plassert under avløp på hvert kar (Fig. 2).



Figur 2. Oppsamling av rist fra hvert kar gjennom avløp

Håvene ble stående under utløp i trengekarene i en time etter trengestart (en time etter avsluttet nedtapping), mens for kontrollene ble håvene stående en time under utløp. Det var da ingen forskjell på oppsamlingstid mellom kort og lang trengetid. Resultatene viser kun forskjell på trengt og ikke trengt fisk.

Innholdet i håvene ble ført over til forhåndsveide gasskluter (20 x 20 cm). Gassklutene med innhold fikk så tørke over natten før de igjen ble veid. Veiing ble utført med analysevekt med 4 desimaler.

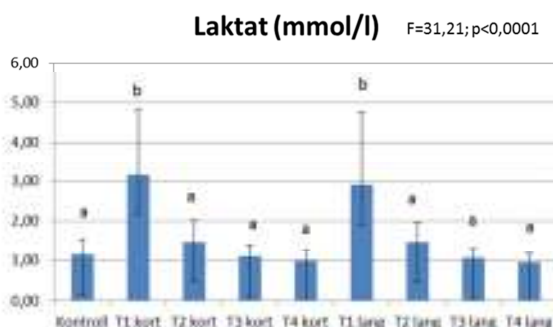
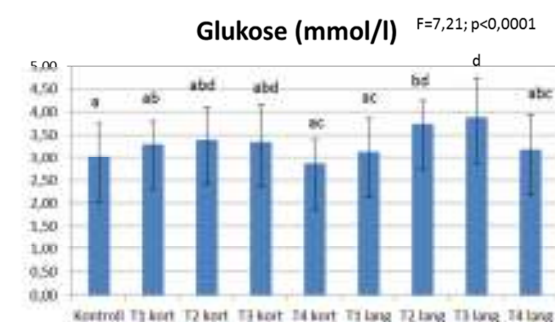
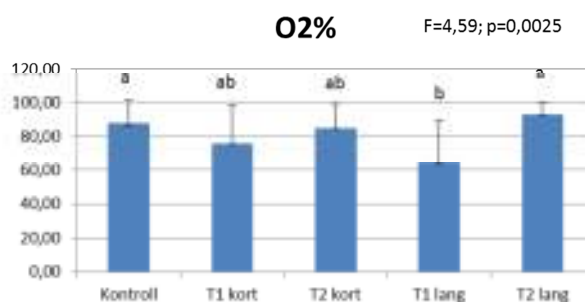
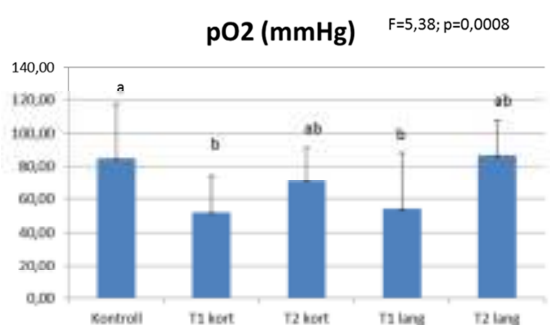
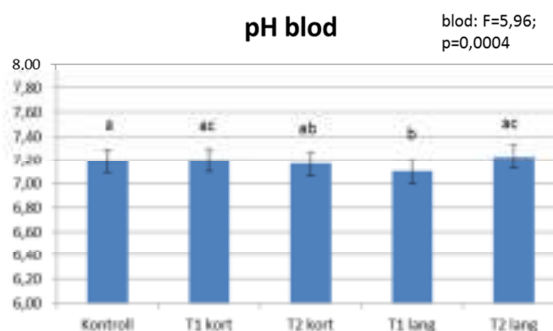
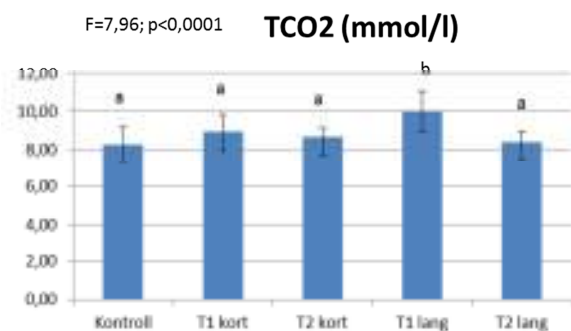
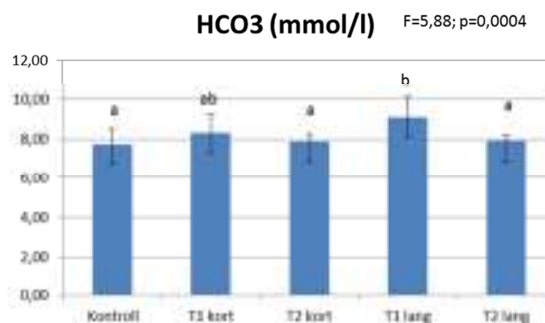
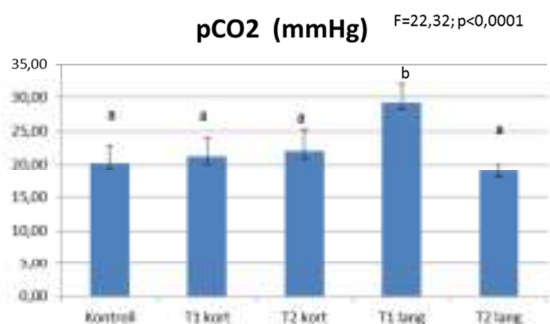
2.5 Statistikk

All statistikk er testet med statistikkprogrammet StatsDirect, versjon 2, 7, 8 (2011). Alle data er testet med variansanalyse med påfølgende multippel sammenlikning (Tukey). ANOVA ble brukt for flere enn to utvalg, mens to sidig t-test ble brukt for to utvalg (kontroll vs. trengt for kvantifisering av skjelltap).

3 Resultat og diskusjon

3.1 Fysiologisk stress

I denne rapporten blir kun resultatene som viser forskjell mellom gruppene vist. Grunnet svært store problemer med å anskaffe i-STAT test kassetter var det ikke tilstrekkelig antall kassetter til å dekke alle blodprøver. Dette er årsaken til at noen presenterte figurer ikke viser alle grupper.



Figur. 3. Fysiologiske stressvariable forårsaket av trenging

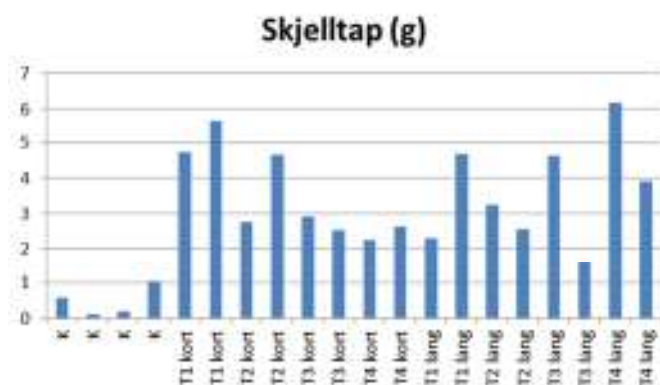
Resultatene fra dette forsøket viser at trengetid på tre timer er mer stressende enn trengetid på en time (Fig. 3). For variablene pCO_2 , HCO_3 , TCO_2 , pH blod og O_2 metning er T1lang signifikant avvikende fra de andre gruppene. Dette betyr at i tillegg til at lang trengetid er mer stressende er nivåene for disse variablene høyest tre timer etter trengestart, og avtar etter dette. Disse resultatene sier ikke noe om den akutte effekter av trenging ettersom de første målingene ble tatt rett etter trenging (tre timer). Avviket i de ovenfornevnte variablene indikerer en forsurening av blodet etter lang trenging som kan komme av dårlig vannkvalitet eller stress. Før trenging var oksygenivået i vannet $90 \pm 2,6\%$, mens 30 minutter etter trengestart var nivået $83 \pm 4,2\%$. Tilsvarende forsurening av blod grunnet økt tetthet er ikke grundig belyst i litteraturen, men lavere pH hos laks ble påvist av Veiseth et al. (2006). Forsuring ble også funnet i havabbor *Dicentrarchus labrax* ved økte tettheter (Sammouth et al. 2009).

Laktat og pO_2 nivåene viser at både T1kort og T1lang avviker fra de andre gruppene. Det er imidlertid kun laktat som er signifikant avvikende, mens for pO_2 gjelder dette for kontrollene (Fig. 3). Dette tyder på at nivåene er høyest rett etter avslutning av 1 og 3 timer trenging og avtar i timene etter dette. For laktat er det synkende men ikke signifikant nedgang med ved prøvetaking henholdsvis 2, 6 og 20 timer etter trenging (Fig. 3).

Glukose er kjent for å virke etter en viss tids aerob aktivitet. I dette forsøket øker glukoseverdiene fra T1lang (tre timer etter trenging) til T2lang (fem timer etter trenging) og til dels til T3lang (9 timer etter trenging) og avtar så etter 20 timer (T4lang) (Fig. 3).

Beklageligvis viser ikke dette forsøket de akutte verdiene. Vi vet således ennå ikke hvor tidlig responsen treffer inn. Dette hadde vært interessant informasjon selv om formålet med studien var å se på forskjeller mellom lagn og kort trenging og restitusjon. Tidligere publikasjoner viser også forløpet av stressvariable over tid, uten at startpunktet for forhøyede nivåer er påvist (eks. Sandodden et al. 2001; Iversen et al. 2009). Acerete et al. (2004) viste på abbor *Perca fluviatilis* at nivåer av kortisol økte signifikant 0,5 timer etter håndtering, mens både glukose og laktat økte men ikke signifikant, også etter 0,5 time. Laktat avtok etter 1 time mens glukose avtok etter 24 timer.

3.2 Kvantifisering av skjelltap



Figur 4. Oppsamling, tørking og veiing (gram) av skjell fra hvert kar. Håvene var plassert under utløp i en time etter avsluttet nedtapping av vann

Oppsamling av skjell fra hvert av karene viste en klar forskjell mellom kontrollfisk og trengt fisk (Fig. 4) ($t = 4,5$; $p = 0,0003$). Det ble dessverre ikke gjort forskjell på kort og lang trengetid da håvene var plassert i utløp i en time etter avsluttet nedtaping, for alle kar. Det er dermed ukjent om det er forskjell på skjelltap for fisk som er trengt lenge eller kort. Det er ikke funnet litteratur som kan støtte opp om dette funnet.

4 Konklusjon

Næringsaktører som har daglig direkte oppfølging av fisk vil etter hvert oppnå et subjektivt bilde av status og tilstand. Som regel er dette ikke vitenskapelig dokumentert. Effekter av lang vs kort trenging og lang restitusjonstid er et eksempel på dette. I denne studien ble det påvist avvikende nivåer av flere fysiologiske stressmarkører forårsaket av lang (tre timer) trengetid i motsetning til kort (1 time) trengetid. De fleste målte stress variabler var mest avvikende rett etter tre timers trenging, men laktat og pO_2 var mest avvikende rett etter både kort og lang trengetid. Som forventet responderte glukose med å øke jevnt inntil seks timer etter trengeslutt før det igjen avtok. Også som forventet var skjelltapet større hos trengt fisk.

5 Litteratur

Acerete L., Balach J.C., Espinosa E., Josa A., Tort L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237, 167-178.

Iversen M., Eliassen R.A., Finstad B. 2009. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. *Aquaculture Research* 40, 233-241.

Sammouth S., d Orbcastel MR., Gasset E., Lamarie G., Breuil G., Marino G., Coeurdacier J., Fivelstad S., Blancheton J. 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquaculture Engineering* 40, 72-78.

Sandodden R., Finstad B., Iversen M. 2001. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Anaesthesia and recovery. *Aquaculture research* 32, 87-90.

Veiseth E., Fjæra S.O., Bjerkeng B., Skjervold P.O., 2006. Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology, B.* 144, 351-358.