

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



## **Forord**

Denne hovedoppgaven markerer slutten av min studietid ved UMB i Ås. Dette har vært en flott periode både faglig og sosialt. I forbindelse med masteroppgaven vil jeg ført og fremst takke Odd-Ivar Lekang og Svein Olav Fjæra, for å ha gitt meg anledning til å jobbe med en spennende og lærerik oppgave.

Jeg ønsker også å takke Bremnes Seashore AS for velvilje og finansiering i forbindelse med de utførte forsøkene. I sammenheng med gjennomføring av forsøkene, retter jeg en spesiell takk til Svein Olav Fjæra, for organisering og deltakelse under forsøkene i juli og for utføring av forsøket i november.

Takk til Bjørn-Reidar Hansen, Bjørn-Frode- Eriksen og Harald Støkken for hjelp med å finne nødvendig utstyr i forkant av forsøket i juli. Takk til Lene Sørli Heier for gjennomgang av i-STAT og takk til Jon Asper for hjelp i forbindelse med SS-analysen.

Tilslutt vil takk venner og familie for hjelp og oppmuntring i forbindelse med denne oppgaven. Takk til Janne Randen og Astrid Langmoen Olsen for korrektur og mye oppmuntring underveis.

## Sammendrag

Det stilles stadig strengere krav til fiskevelferd og produktkvalitet ved produksjon av oppdrettsfisk. For å imøtekomme dette er kvaliteten på vannet fisken holdes i av stor betydning og det er viktig at fisken gis god vannkvalitet så lenge den er i livet. I den forbindelse ble vannkvaliteten undersøkt på et lakseslakteri ved fire ulike punkter i slaktelinjen; i ventemerde, i trengt ventemerde, i kjøletank og i ensretterkar. Videre ble det tatt ut fisk for blodprøver, måling av kjernetemperatur og rigorutvikling fra fem ulike punkter i slaktelinjen; fra ventemerde, trengt ventemerde (like ved pumpe), etter levendekjøling, etter ensretterkar og etter elektrisk bedøver.

Resultatene fra vannkvalitetsundersøkelsen viste at vannkvaliteten i ventemerdene var god. Alle de registrerte vannkvalitetsparametrene for ensretterkaret lå innenfor anbefalte grenseverdier for god fiskevelferd. I kjøletanken forringes vannkvaliteten gjennom en produksjonsdag, vist ved økt mengde suspendert stoff (SS) og økt konsentrasjon av karbondioksid. SS konsentrasjonen oversiger anbefalte grenseverdier for laksefisk, mens konsentrasjonen av karbondioksid ble funnet å ligge innenfor «tålbart» nivå for laks. Som følge av økt CO<sub>2</sub> ble pH i kjøletanken redusert, men den falt ikke under anbefalt pH nivå for laksefisk. Videre ble det funnet store variasjoner i oksygenmetningen i kjøletanken som til tider lå svært høyt (259 %). Temperaturen i kjøletanken lå høyere enn anbefalt nivå for levendekjøling av fisk, men var innenfor foretrukket temperaturintervall for Atlantisk laks.

Blodanalysen viste en endring i syrebasebalansen hos laks fra uttakene; etter levendekjøling, etter ensretterkar og etter bedøver. Høyest konsentrasjon av PCO<sub>2</sub> (partialtrykk av karbondioksid), TCO<sub>2</sub> (total karbondioksid) og HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ble funnet hos laks fra levendekjøling, etterfulgt av laks fra ensretterkar og etter bedøver. Dette tyder på endring i syrebasereguleringen hos fisken som følge av respiratorisk aktivitet og stress. Lavest blod-pH ble funnet hos laks fra levendekjøling og etter bedøver. Det var ingen signifikante forskjeller i blod-pH mellom noen av gruppene. Derimot viste alle gruppene en lavere blod-pH i forhold til hva en normalt kan forvente hos en ustresset laks. Dette tyder på at fisken var stresset allerede i ventemerdene. Laks fra kjøletank viste også endringer i ionebalansen, som hadde høyest Na<sup>+</sup> konsentrasjon sammenlignet med de andre uttakene og noe redusert K<sup>+</sup> konsentrasjon sammenlignet med de to ventemerdegruppene. Økningen i Na<sup>+</sup> er et ytterligere tegn på stress hos laksen fra kjøletanken. Videre lå glukosenivået hos laks fra kjøletanken 25 % over basalnivået for glukose hos uthvilt laks. BE (baseoverskudd) underskuddet var størst hos gruppen fra ventemerde og trengt ventemerde, mens underskuddet var noe redusert for de tre

etterfulgte gruppene. Redusert BE for disse gruppene har en direkte sammenheng med økt konsentrasjon av  $\text{HCO}_3^-$  i blodet. Det var ingen signifikante forskjeller i konsentrasjonen av hematokrit og hemoglobin mellom noen av gruppene, men konsentrasjonen av hematokrit og hemoglobin ligger for alle gruppene under normal referanseområde til voksen, frisk Atlantisk laks.

Det ble funnet forskjeller i pre-rigortid mellom de fem ulike gruppene. Potensiell pre-rigortid for de to ventemerddgruppene var i underkant av 20 timer, mens den for laksen fra levendekjøling ble redusert til 4 timer. Potensiell pre-rigortid for gruppen etter ensretterkar var på 9 timer, mens den for gruppen etter bedøver var på 8 timer.

Det kritiske punktet i slaktelinjen er kjøletanken. Levendekjølingen senket temperaturen på fisken, men med så rask inntreden av rigor som ble registrert hos laks i fra kjøletanken, forsvinner mye av hensikten med levendekjølingen. Derimot melder mange næringsaktører om at kjøling av fisk er vanskelig etter at levendekjøling ble faset ut og flere ønsker å tilbakeføre levendekjøling. En jevnere tilsetning av hydrogenperoksid og/eller økt vannutskiftning i levendekjølingskaret vil bedre fiskevelferden under kjøling og mest sannsynlig gi en lengre per-rigortid.

I lukket brønnbåttransport vil pH i brønnvannet reduseres som følge av akkumulering av  $\text{CO}_2$  fra fisken. Ved ankomst til slakteriet blir fisken overført i ventemerder, der pH i sjøvannet vil være høyere enn det pH er i transportvannet. I den forbindelse ble det utført et forsøk om hvorvidt en rask pH-økning kan ha negative effekter på laks og om en mulig  $\text{NH}_3$  giftighet ville oppstå. Laks ble overført til to tanker; Tank 1 (tetthet 10,4 %) og Tank 2 (tetthet 12,4 %) med 10 fisk i hver tank. Etter 4 timer simulert lukket brønnbåttransport ble fisken overført til Tank 3 med god vannkvalitet og høyere pH. Atferdsregistreringer av fisken ble dokumentert før og etter overflytting til Tank 3.

Atferdsregistreringene tyder ikke på negativ virkning av rask pH-økning på laks ved overføring fra Tank 1 (pH 6,7) og Tank 2 (pH 6,6) til Tank 3 med pH 8. Laksen responderte positivt på overflytting til tank med bedre vannkvalitet, der den kviknet til. Resultatet antyder at overføring av laks fra brønnbåt til ventemerd ikke vil medføre fare for  $\text{NH}_3$ -forgiftning, sett ut fra disse forsøksbetingelsene.

## Summary

There are increasingly stricter requirements to the welfare of fish and the product quality in production of farmed fish. To accommodate this, the quality of the water the fish is held in has a great significance, and it is important that the fish are given good water quality as long as it is alive. In this context, the water quality at a slaughter plant was examined at four different points in the slaughter line; in the resting cage, in the crowded resting cage, in the chilling tank and in the self-orientation system. Furthermore, fish were collected for blood sampling, measuring of the core temperature and rigor development at five different points in the slaughter line; from the resting cage, from the crowded resting cages (next to the pump), after the live chilling tank, after the self-orientation system and after electrical anesthesia.

The examination of the water quality showed that the water quality in the holding cages was good. All the recorded water quality parameters from the self-orientation system were within recommended limits for good fish welfare. In the chilling tank the water quality deteriorated through a production day, as shown by increased amounts of suspended solids (SS) and increased concentration of carbon dioxide. The SS concentration exceeds the recommended limits for salmonids, while the concentration of carbon dioxide was found to be within "acceptable" level for salmon. As a result of increased CO<sub>2</sub> content, the pH decreased in the chilling tank, but did not fall below the recommended pH level for salmonids. Furthermore, it was found a wide variation in oxygen saturation in the chilling tank which at times was extremely high (259 %). The temperature of the chilling tank was higher than the recommended level for live-chilling of fish, but was within the preferred temperature interval for Atlantic salmon.

The blood analysis showed a change in the acid-base balance in the salmon from the sampling points; after live-chilling, after the self-orientation system and after anesthesia. The highest concentration of PCO<sub>2</sub> (partial pressure of carbon dioxide), TCO<sub>2</sub> (Total carbon dioxide) and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> was found in salmon from live-chilling, followed by salmon from the self-orientation system and after anesthesia. This indicates a change in the acid-base regulation in the fish due to respiratory activity and stress. Lowest blood pH was found in salmon from live-chilling and after anesthesia. There was no significant difference in blood pH between any of the groups. However, all the groups showed a lower blood pH value compared to what one normally would expect in an unstressed salmon. This suggests that the fish was stressed already in the resting cage. Salmon from the chilling tank also showed changes in the ion balance, which had the

highest  $\text{Na}^+$  concentration compared to the other groups and somewhat reduced  $\text{K}^+$  concentration compared to the two resting cages groups. The increase in  $\text{Na}^+$  is an additional sign of stress in salmon from the chilling tank. Furthermore, the glucose levels in salmon from the chilling tank were 25 % above basal level of glucose in unstressed salmon. The BE (base excess) deficits were greatest in the groups from the resting cage and the crowded resting cage while the deficit fell slightly for the three succeeding groups. Reduced BE for these groups has a direct correlation with the increased concentration of blood  $\text{HCO}_3^-$ . There was no significant difference in the concentration of hematocrit and hemoglobin between any of the groups, but the concentration of hematocrit and hemoglobin was below the normal reference range for adult, healthy Atlantic salmon, for all groups.

It was found differences in the pre-rigor time between the five different groups. Potential pre-rigor time for the resting cages and the crowded resting cage groups was nearby 20 hours, while it was shorten down to 4 hours for the salmons from live-chilling. Potential pre-rigor time for the group after the self-orientation system was 9 hours, while it was 8 hours for the group after anesthesia.

The critical point in the slaughter line is the chilling tank. The live-chilling lowered the core temperature of the fish, but with such rapid onset of rigor that was registered in salmon from the chilling tank; much of the purpose of live-chilling disappears. However, many industry actors have reported that chilling of fish is difficult after live-chilling was faced out and many of the actors wants to return back the live-chilling. A more equal addition of hydrogen peroxide and / or increased water exchange in the live-chilling tank will improve fish welfare during cooling and most likely increase the pre-rigor time.

In closed well-boat transportation, the pH in the water will decrease as a result of the accumulation of  $\text{CO}_2$  from the fish. Upon arrival at the slaughter plant, the fish is transferred to resting cages, where the pH in the seawater will be higher than the pH in the well-boat water. In this context, an experiment was conducted on whether a rapid pH increase might have negative effects on salmon and if an  $\text{NH}_3$  toxicity would occur. The salmon were transferred to two tanks; Tank 1 (density 10.4 %) and Tank 2 (density 12.4%) with 10 fish in each tank. After 4 hours simulated closed transportation, the fish were transferred to Tank 3 which contained good water quality and a higher water pH. The behavioral registrations of the fish was documented before and after it was transferred to Tank 3.

The behavioral registrations did not indicate any adverse effect in salmon, due to the rapid pH increase by transferring them from Tank 1 (pH 6,7) and Tank 2 (pH 6,6) to Tank 3 with pH 8. Salmon responded positively to the transfer to the tank with better water quality, where it revived. The result suggests, with these experimental conditions, that the transfer of salmon from a well-boat to a resting cage will not endanger  $\text{NH}_3$  toxicity.

## **Innhold**

<b>1. Innledning</b> .....	<b>9</b>
<b>Generell slakteprosess av Atlantisk laks (Salmo Salar)</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Vannkvalitet</b> .....	<b>14</b>
<b>Kritiske vannparametere</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.1 Oksygen</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.2 Karbondioksid</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.3 Ammoniakk</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Transport og vannkvalitet</b> .....	<b>26</b>
<b>Brønnbåttransport</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.2 Åpen transport</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.3 Lukket transport med brønnbåt</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.4 Utfordringer med kombinert brønnbåttransport (vekselvis åpen og lukket transport)</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.5 Åpen vs. lukket transport</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.6 Utvikling i vannkvalitet for åpen, lukket og kombinert brønnbåttransport</b> .....	<b>30</b>
<b>4. Fysiologiske- og biokjemiske prosesser i fisk.</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1.1 Stress</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1.2 Stress hos laksefisk i forbindelse med slakting</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1.3 Glykolyse</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1.4 Laktat</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1.5 Rigor mortis/ kvalitet</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2 Effekt av surt vann på fisk</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.1 Fiskeblod og pH</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.2 Fysiologiske effekter av surt vann hos fisk</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3 PH i fisk betydning for produktkvalitet</b> .....	<b>42</b>
<b>4.3.1 Endring i pH</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3.2 Holdbarhet</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3.3 Sammenheng mellom pH og kvalitet på fersk fisk</b> .....	<b>44</b>
<b>4.4 Oppsummering og konklusjon</b> .....	<b>45</b>
<b>5. Forsøk I Vannkvalitet</b> .....	<b>47</b>
<b>5.1 Forsøksbetingelser</b> .....	<b>47</b>
<b>5.2 Material og metode</b> .....	<b>51</b>



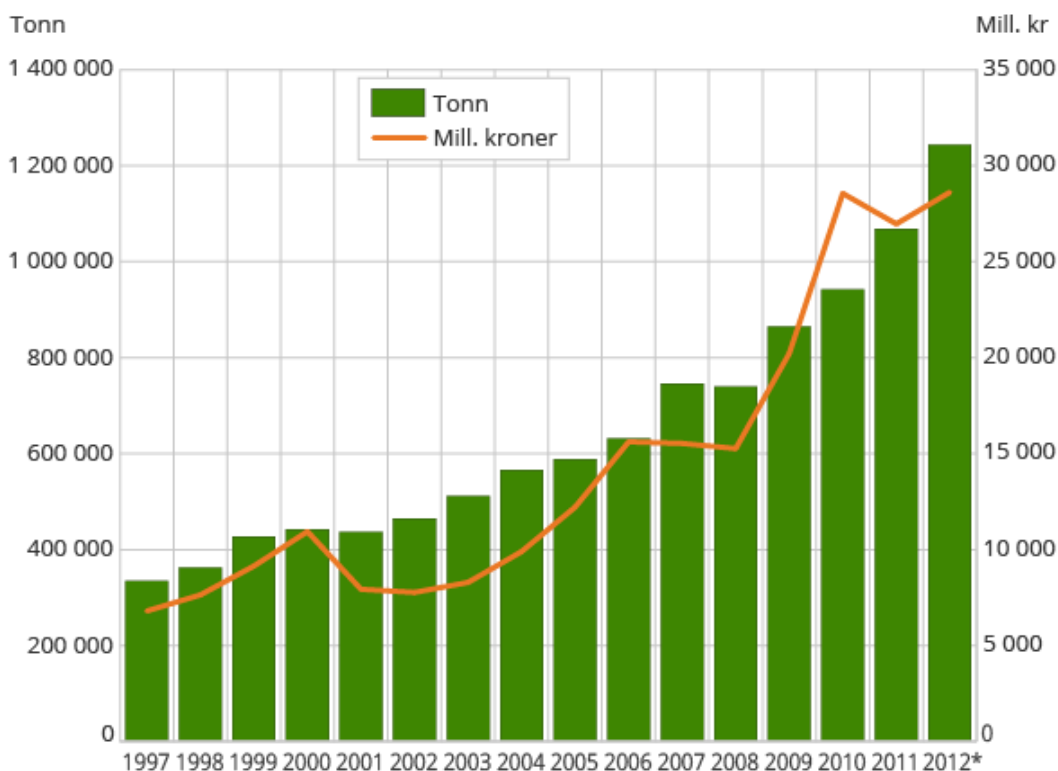
5.2.1 Databehandling .....	52
5.3 Resultat og diskusjon vannkvalitet.....	52
6 Forsøk II-Blodanalyser .....	67
6.1 Material og metode .....	67
6.2 Databehandling .....	72
6.3 Resultat og Diskusjon .....	72
7. Forsøk III- Rigorutvikling .....	87
7.1. Material og metode .....	87
7.1.2 Databehandling .....	87
7.3 Resultat .....	87
7.3.1 Diskusjon .....	88
8. Forsøk IV. Effekt av rask pH-økning på laks .....	91
8.1 Innledning .....	91
8.2 Material og metode .....	93
8.2.1 Databehandling .....	94
8.3 Resultat .....	95
8.3.1 Diskusjon .....	97
9. Oppsummering.....	101
10. Konklusjon.....	104
12. Referanseliste.....	106
Vedlegg.....	I

## 1. Innledning

Akvakultur i Norge har siden 1970-tallet hatt en rask utvikling og havbruksnæringen er nå et av landets største eksportnæringer. Norge har gode vilkår for kontrollert produksjon av sjømat med den lange kystlinjen og dype fjorder med kaldt, friskt vann (Hovland et al. 2010).

Atlantisk laks er hovedproduktet og utgjorde 93 % av den produserte mengden oppdrettsfisk i 2011 (SSB 2012). Oppdrett av atlantisk laks og andre arter drives langs hele kysten, der anlegg for klekkeri, matfisk og slakteri er lokalisert på ulike plasser i landet. Dette gjør det nødvendig med levende transport av fisk. Fisk transporteres minst to ganger i løpet av livet, fra klekkeri til anlegg for matfisk og som matfisk til slakteri. Transportbehovet av levende fisk øker på grunn av den økende produksjonen og på grunn av utviklinga mot sentralisering av større slakteri (Lekang & Fjæra 1997). I 2011 ble det i alt produsert i overkant av 1 million tonn laks i Norge, til en førstehåndsverdi på 27 milliarder kroner (SSB 2012). Foreløpige tall for 2012, viser en økning på 16,5 % for mengde solgt oppdrettslaks i Norge. I alt ble det solgt 1,2 millioner tonn laks til en førstehåndsverdi av 29 milliarder kroner (figur 1) (SSB 2013).

### Solgt mengde og førstehåndsverdi av laks. 1997-2012



Kilde: Statistisk sentralbyrå.

Figur 1. Solgt mengde og førstehåndsverdi av laks i tidsrommet 1997-2012. Hentet fra (SSB 2013).

Fiskevelferd i akvakultur er viktig gjennom hele verdikjeden da det er en viktig forutsetning for produksjon av mat av høy kvalitet (Akse et al. 2006). For å kunne oppnå optimal vekst og minimal risiko for sykdom må miljøet rundt fisken være best mulig. Kvaliteten på vannet som fisken oppholder seg i er viktig da dette i stor grad utgjør fiskens miljø (Lekang & Fjæra 2002). God vannkvalitet gjør seg også gjeldene for etisk og forsvarlig slakteprosess (Akse et al. 2006). Laksefisk stiller høye krav til vannkvalitet. Det er derfor avgjørende å vite hvilke parametere som har betydning for fiskens helse og trivsel, for å kunne regulere vannkvaliteten på en hensiktsmessig måte og dermed sikre fisken god vannkvalitet (Lekang & Fjæra 2002). At vannkvalitet er viktig er innlysende, men vannkvaliteten er også sammensatt og det er viktig å kjenne til sammenhengen mellom parametere og hvordan disse gjensidig påvirker hverandre (Rosten et al. 2004). Selv om en finner at enkeltparametere er tilfredsstillende, kan samspillseffekter mellom flere parametere medføre en total kvalitet som ikke imøtekommer betingelser for god vannkvalitet (Lekang & Fjæra 2002).

Det er en link mellom pre-rigortid (før dødsstivhet) og kjøttkvalitet (Erikson et al. 1997), samt en sammenheng mellom pre-rigortid og fiskevelferd (Rosten et al. 2004). Kort pre-rigortid er normalt et tegn på forhøyet anaerob muskelaktivitet før slakting. Høy tetthet under transport, lasting og lossing, fangst, trenging og pumping eller håving, er alle adverse (ubehagelige, negative) stimuli for fisken som kan forårsake flere fysiologiske reaksjoner. Stress under transport kan også komme av lite oksygen eller dårlig vannkvalitet på grunn av utilstrekkelig vannutskifting som fører til akkumulering av de metabolske avfallsstoffene karbondioksid og ammoniakk (Erikson et al. 1997). Stress og muskel aktivitet under transport og håndtering av fisk under slakteprosessen kan redusere tiden før inntreden av rigor mortis (dødsstivhet), som hovedsakelig utløses av glykogen og ATP uttømming i muskelcellene. Håndtering og prosessering av fisk under rigor mortis kan føre til tap av kvalitet og dårligere filetutbytte (Erikson et al. 1997). Stress under slakting vil tømme muskelen for energi, produsere mer melkesyrer, redusere pH i muskel og øke hastigheten for inntreden av rigor mortis (Poli et al. 2005).

Akkumulering av CO<sub>2</sub> i transportvannet eller i karvannet vil raskt senke pH i vannet (Kießling et al. 2006; Rosten et al. 2004). Det kan muligens forventes at vann med lav pH til en viss utstrekning virker hemmende for mikroorganismer i vannet og på fiskens hud, sammenlignet med nøytral pH. Imidlertid mangler det publisert informasjon rundt dette (Andreoletti et al. 2009). Levendekjøling med høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon på atlantisk laks (*Salmo salar*) virker stressende på fisken. Dette er observert ved reduksjon i muskel pH og en tidlig inntreden av

rigor mortis (Roth, Bjorn et al. 2006). Det er også kjent at høy aktivitet på fisk under karbondioksidbedøving rutinemessig fører til blødningsskader på gjellene (Robb & Kestin 2002). En kunne derfor anta at dette kan lede til innføring av vannbårne mikroorganismer inn i fiskeblodet, men det finnes ingen relatert publisert informasjon rundt dette (Andreoletti et al. 2009). Det er i dag forbud mot å bruke karbondioksidbedøving på fisk, jf. § 14 (Slakteriforeskriften 2006) da dette har vist seg å medføre langvarig døds-kamp for fisken. Imidlertid vil det under lukket transport og ved levendekjøling oppstå akkumulering av metabolskprodusert karbondioksid, som et resultat av liten vannutskifting. Fordel med lukket transport, i forhold til åpen transport, kan sees i sammenheng med sedativ virkning av mild CO<sub>2</sub> eksponering, gitt tilstrekkelig oksygen og langsom nedkjøling av vannet (Hjeltnes et al. 2008), og på den måten redusere muskelaktiviteten til fisken. Et annet spørsmål er om fisk som puster i surt vann kan føre til reduksjon av pH i blod eller spiselig vev, som igjen kan ha gunstig effekt på kjøttkvaliteten. Ved bedøving med CO<sub>2</sub> på griser blir anestesen induisert gjennom pH-senkning i cerebrospinalvæsken og hjernecellene (Lund 2005). Dette fører til en økt surhetsgrad, det vil si en pH senkning fra 7.4, som er normal pH i cerebrospinalvæsken, til 7.1, analgesi respektiv anestesi, eller under 6.8 (dyp anestesi) (Lund 2005). Imidlertid er det ingen indikasjon assosiert til pH-fall i kjøttet.

Det overordnede målet med oppgaven har vært å undersøke hvordan vannkvaliteten ved ulike punkter i slaktelinjen ved et lakseslakteri tilfredsstiller kravet til god vannkvalitet og fiskevelferd, samt fiskens fysiologiske tilstand og til slutt hvilken betydning det får for pre-rigortid. Videre ble det i litteraturstudie også lagt vekt på utfordringer med brønnbåttransport, og hvilken betydning lav pH har på fisk. Det ble også utført et forsøk for å undersøke hvilken effekt rask pH-økning har på laks og om mulig NH<sub>3</sub>-giftighet ville oppstå. Figur 2 viser flytskjema over slakting av laks og illustrasjon over hvor i slaktelinjen forsøkene er utført.

### **Generell slakteprosess av Atlantisk laks (*Salmo Salar*)**

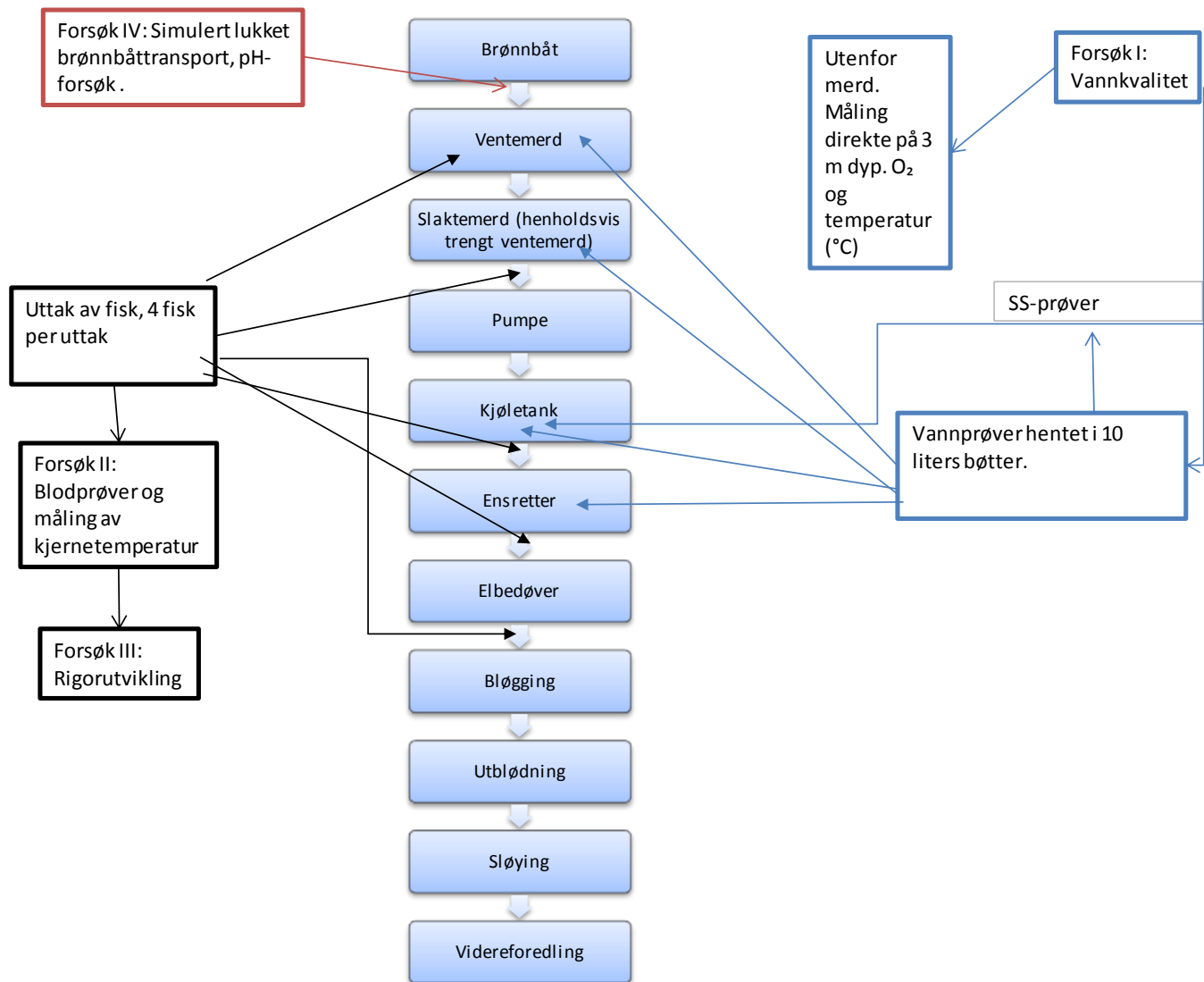
Fisk blir transportert fra oppdrettsmerdene til slakteriet i en brønnbåt (figur 2) og er sultet i forkant av transporten. Når brønnbåten ankommer slakteriet blir fisken overført til ventemerde (figur 2) eller sendt direkte til slakting i fra brønnbåten. De fleste slakterier i Norge benytter seg av ventemerde der størrelse og antall ventemerder varierer fra slakteri til slakteri.

Ventemerdene fungerer som et lager av slaktefisk utenfor slakteriene med den hensikt å frigjøre transportkapasitet, stresse ned fisken etter transport, og kanskje viktigst; gi en kontinuerlig tilgang på slaktefisk (Kristiansen & Samuelsen 2006). Maksimal tetthet i ventemerde skal ikke overskride 25 kg m<sup>3</sup> jfr. § 3-f, §46 (Akvakulturdriftsforskriften 2008).

Videre er det fastsatt at fisk skal avlives så raskt som mulig etter at den har kommet til slakteriet, jfr. §10, (Slakteriforeskriften 2006). Maksimal oppholdstid i ventemerde er 6 døgn, jfr. § 54 (Akvakulturdriftsforskriften 2008).

Ventemerden går over til å bli en slaktemerde (figur 2), i det slakting forberedes. Fisken trenges sammen ved at merden lines opp eller det brukes en orkastnot foran et inntaksrør i slaktemerden, der fisken enten pumpes direkte inn til bedøver eller via et levendekjølingskar (figur 2). Deretter føres fisken videre til et ensretterkar (forutsatt at dette benyttes på slakteriet). Der orienterer fisken seg selv inn i bedøvelsesutstyret. I Norge er det gjennom Akvakulturforskriften- §34, lovfestet at fisk skal bedøves før slakting og at den skal være bedøvet i det døden inntreffer. Videre stilles det krav om at fisken bløgges slik at døden skjer som et resultat av blodtap fra hjernen. Bløgging vil si å kutte over blodårene som fører fra hjerte. Fisk som får en effektiv og riktig utført bløgging får en rask død og er lettere å sløye. Samtidig er det også viktig å få vekk blodet i fisken da dette lett medfører bakterievekst (Lynum 2005). Etter at blodårene er kuttet over er det vanlig prosedyre å blø ut fisken i utblødningskar (figur 2) med kaldt vann. Muskelkrampene vil her hjelpe til å drive ut blodet. Fisken må ligge i kaldt vann under utblødingen, da blod ved lavere temperatur koagulerer saktere og dermed holder seg flytende lenger (Olsen et al. 2006). Samtidig fungerer dette også ofte som etterkjøling av fisken (Tobiassen 2013).

Etter en bestemt oppholdstid i utblødningskar føres fisken videre til en sløyemaskin (figur 2) som spretter opp buken og innvoller fjernes. Fisk som ikke skal videreføres går direkte til pakking, der den pakkes hel i kasser sammen med et lag is. Fisk som går videre til filetering blir enten produsert pre-rigor (før dødsstivhet) eller post-rigor (etter dødsstivhet). Fisk som produseres post-rigor legges til modning i kar med isvann, og filetproduksjonen utføres etter at fisken har gjennomgått rigor mortis (dødsstivhet). Ved pre-rigor produksjon sendes fisken direkte til filetering og lang pre-rigor tid er her av stor industriell betydning da fisken må prosesseres før dødsstivheten inntreffer. Filetering av fisk pre-rigor vil fileten være tilgjengelig for forbrukeren i ferskere tilstand (Kiessling et al. 2006) siden den ikke må lagres som ved post-rigor prosessering. Det er også vist at pre-rigor filetering av laks gir fileten fastere tekstur, bedre farge og mindre gaping tidlig i lagringsforløpet sammenlignet med fileter prosessert post-rigor (Skjervold et al. 2001a).



Figur 2. Flytskjema for slakting av laks og illustrasjon over hvor i slaktelinjen forsøkene er gjennomført.

## 2. Vannkvalitet

Kontroll på vannkvaliteten i lukkede systemer er helt essensielt ved oppdrett av Atlantisk laks (*Salmo salar*). Vannkvaliteten blir i stor grad styrt av fiskens metabolske aktivitet, der karbondioksid og nitrogenforbindelser er de to viktigste metabolittene som har betydning for miljø, ytelse og velferd. Det er en kontinuerlig danning av karbondioksid og nitrogenforbindelser som følge av fiskens metabolisme. Disse skilles ut i vannet hovedsakelig over fiskens gjeller. Fiskens metabolisme er avhengig av fiskestørrelse, stress, temperatur i vannet og fôringsstatus (Rosten et al. 2011).

God dyrevelferd er nærmest blitt en forutsetning for god økonomi, hvor trivsel for fisken er en viktig faktor. I slakteriforskriften som trådte i kraft i 2007, vektlegges fiskens velferd under all håndtering. God vannkvalitet til fisk er viktig så lenge fisken er i live.

### Kritiske vannparametere

Fisk stiller bestemte krav til sine omgivelser når det gjelder temperatur og innhold av ulike forbindelser som ammoniakk, karbondioksid, oksygen og partikler (tabell 1). Det er bestemte toleranseområder for de ulike parameterne som varierer mellom arter. De fleste aktuelle vannkvalitetsparameterne er særdeles dynamiske og varierer mye med biologiske og naturmessige faktorer, noe som gjør det vanskelig å sette eksakte grenser. Parameterne vil også kunne influere hverandre, der den negative effekten av en vannparameter kan virke synergistisk (forsterke) eller antagonistisk (minke den negative effekten) av en parameter (Rosten et al. 2004).

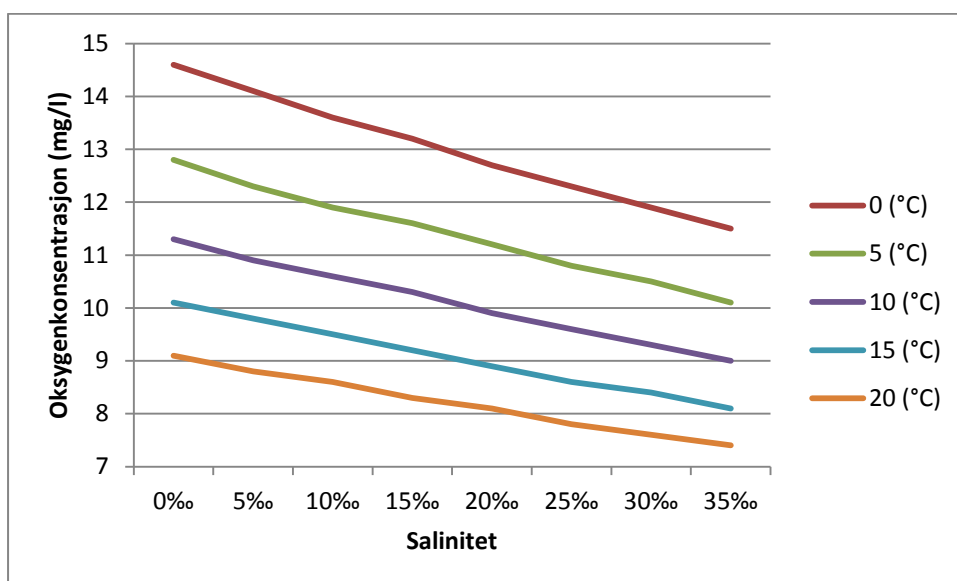
Tabell 1. Grenseverdier for vannkvalitetsparametere hos laks . \*\*ferskvann \* sjøvann. Etter <sup>a</sup>(Rosten et al. 2004), <sup>b1</sup>(Lekang & Fjæra 1997), <sup>b2</sup>Bilotta & Brazier 2008; Robertson et al. 2007).

Parameter	Optimum	Tålbart	Betinget	Ikke akseptabelt
<sup>a</sup> O <sub>2</sub>	100 %	60 % 10-	50 %	≤40%
<sup>a</sup> CO <sub>2</sub>	1-10 mg/l	40 mg/l	60 mg/l	100 mg/l
<sup>a</sup> NH <sub>3</sub>	<2µg/l	2-25 µg/l	25-70 µg/l	70µg/l
<sup>b</sup> SS	<25 mg/l <sup>b1</sup>	<60mg/l <sup>b2</sup>		
<sup>a</sup> pH	6.5-6.7** 7.0-8.5*	6.5-5.7	5.0	<5.0
<sup>a</sup> Temperatur	6-18°C			

### 2.1.1 Oksygen

Oksygen har en relativt lav løselighet i vann og løst oksygen er den første vannkvalitetsparameter som begrenser produksjonen, både i lukkede og åpne

oppdrettsanlegg (Stefansson et al. 2007). Oksygenforbruket hos laks avhenger av temperatur (Liao 1971; Muller-Feuga et al. 1978), fôringsrate (Forsberg 1997), kroppsstørrelse (Liao 1971), svømmehastighet (Grøttum & Sigholt 1998; Liao 1971), vekstrate (Jobling 1994) og stress (Portz et al. 2006). Ut i fra oksygenforbruket til fisken kan en beregne fiskens produksjon av metabolitter (CO<sub>2</sub> og TAN), og dette benyttes ved beregninger for dimensjonering av tilfredsstillende vann- og oksygentilsetning i et oppdrettssystem, der oksygenivået må tilpasses fiskens forbruk og behov (Rosten et al. 2011). Løseligheten til oksygen i vann varierer med temperatur og salinitet, der den synker med økende salinitet og temperatur (figur 3). Konsentrasjonen av O<sub>2</sub> i likevekt med ferskvann ved 12 °C og normal atmosfærisk trykk (1013 mb) er 10,8 mg/l. Sjøvann med en salinitet på 35 ‰ vil oksygenkonsentrasjonen være 8,6 mg/l ved tilsvarende betingelser (Lekang & Fjæra 1997).



**Figur 3.** Løseligheten av oksygen i vann (mg/l) ved 0, 5, 10, 15 og 20 °C ved normal atmosfærisk trykk (1013 mb). Oksygenkonsentrasjonen synker med økt temperatur og med økt salinitet. Etter (Stefansson et al. 2007).

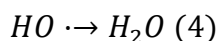
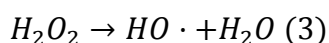
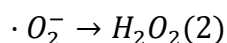
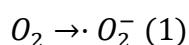
Ved økende temperaturer vil fiskens forbruk av O<sub>2</sub> øke som følge av økt stoffskifte. Denne økningen i stoffskifte kan gjøre det vanskelig å tilfredsstille fiskens behov for O<sub>2</sub> ved høye vanntemperaturer (Stefansson et al. 2007). Lave oksygenverdier kan medføre redusert vekst og økt dødelighet (Bergheim et al. 2006), mens for høye oksygenivåer kan gi oksidativstress (Kristensen et al. 2010; Lushchak & Bagnyukova 2006; Lygren et al. 2000). Giftigheten av ammoniakk kan også øke med lave oksygenivåer (Downing & Merckens 1955; Lloyd 1961; Thurston et al. 1981). Oksygenmetning på 140-150 % (Rosten et al. 2011) fører til redusert sykdomsmotstand og tilvekst, økt dødelighet (Fridell et al. 2007) samt redusert respirasjonsfrekvens og akkumulering av CO<sub>2</sub> i blodet (Bernier & Randall 1998; Powell &



Perry 1997). Forskning tyder på at oksygenivåer mellom 80-100 % er anbefalt (Rosten et al. 2011). Som en nedre grense av oksygenmetning hos laksefisk er det blitt fastslått at den ikke bør falle under 70-80 % og at en oksygenmetning over 120-140 % bør unngås (Thorarensen & Farrell 2011).

Intensivt oppdrett innebærer generelt høy biomasse, lavt spesifikk vannforbruk og tilsetning av oksygen for å sikre nok oksygen i tankene. Ved å tilsette oksygen kan vannforbruket reduseres til et minimum. Imidlertid kan denne strategien skape alvorlige problemer. For det første er det helt nødvendig med et avansert sikkerhetssystem, da svikt i oksygentilførselen raskt vil føre til anoksi og kvelning. På en annen side, kan oksygenering med ren oksygen-gass skape giftig  $O_2$  miljø for fisken. De toksiske effektene er knyttet til dannelsen av det frie oksygenradikalet superoksid ( $O_2^-$ ) (Stefansson et al. 2007).

#### *Ligning 1*



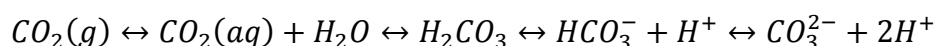
Under normale forhold dannes  $O_2^-$  som et ledd i den aerobe respirasjonskjeden (elektrontransportkjeden). Superoksid dannes via «en-elektron» reduksjon av oksygen, se (1) i *ligning 1*. Prikken foran ( $\cdot O_2^-$ ) er benevnelse for radikaler. Superoksid ( $\cdot O_2^-$ ), Hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) og hydroksylradikaler ( $HO \cdot$ ) er alle mer reaktive enn  $O_2$ . Samlet betegnes de som reaktive oksygen forbindelser (ROS) (Mathews, C. K. et al. 2000) også kalt frie oksygenradikaler (FRO) (Fossum 2009).  $O_2$  er relativt lite reaktivt. Når det reduseres til superoksid får det et uparet elektron i det ytterste skall, hvilket gjør det svært reaktivt og danner raskt kjemiske bindinger med andre frie radikaler i kroppen. ROS spiller en viktig rolle i celledesignaloverføring og homeostasen i kroppen. Dersom det dannes for mye ROS kan det imidlertid medføre store skader i det vevet de blir produsert, en tilstand som kalles oksidativ stress (for ytterligere informasjon, se (Mathews, C. K. et al. 2000)). Virkningsmekanismen for  $O_2^-$  vil delvis være gjennom direkte effekt på membrantransportproteiner, delvis som endringer i proteinsyntesen og dels gjennom oksidering av lipider i cellemembranen (Rohn et al. 1993; Rohn et al. 1996).

Akvatiske organismer regulerer partialtrykk av oksygen (pO<sub>2</sub>) i blod og vev til et lavt nivå. Antagelig er dette for å minimere produksjonen av ROS. Fisk regulerer oksygenopptaket primært ved å regulere pustefrekvens, diffusjonsavstand over gjellene og total respiratorisk overflate. I tillegg reguleres hemoglobinkonsentrasjonen og hemoglobinet oksygenaffinitet (Rosten et al. 2004). Data viser at partialtrykket i arterielt blod for mange fiskearter ikke inneholder mer oksygen enn det som tilsvarer 30 % metning (Massabuau 2003). Sannsynligvis kommer dette av at dannelsen av frie radikaler øker dramatisk over dette trykket (Hjeltnes et al. 2008; Stefansson et al. 2006). Undersøkelser tyder på at laks kan være mer sårbar for fri radikaldannelse som følge av hyperoksi (O<sub>2</sub> konsentrasjon over 100 % metning) enn andre undersøkte arter (Stefansson et al. 2006). Atlantisk laks er ikke i stand til å redusere partialtrykket (PaO<sub>2</sub>) i arterielt blod til mindre enn 50 % av metningen (60-70 % i gjennomsnitt), og med oksygentrykk langt over det normale, som i tilfeller med superoksygenering, vil PaO<sub>2</sub> i blodet øke og gi en økt dannelsen av frie radikaler (Hjeltnes et al. 2008). Hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vil også kunne virke negativt på produksjonen av erythropoetin (EPO, glykoprotein hormon som kontrollerer dannelsen av røde blodceller), det vil si at kroppens dannelsen av hemoglobin og rødeblodceller reduseres (Hjeltnes et al. 2008; Stefansson et al. 2006).

### 2.1.2 Karbondioksid

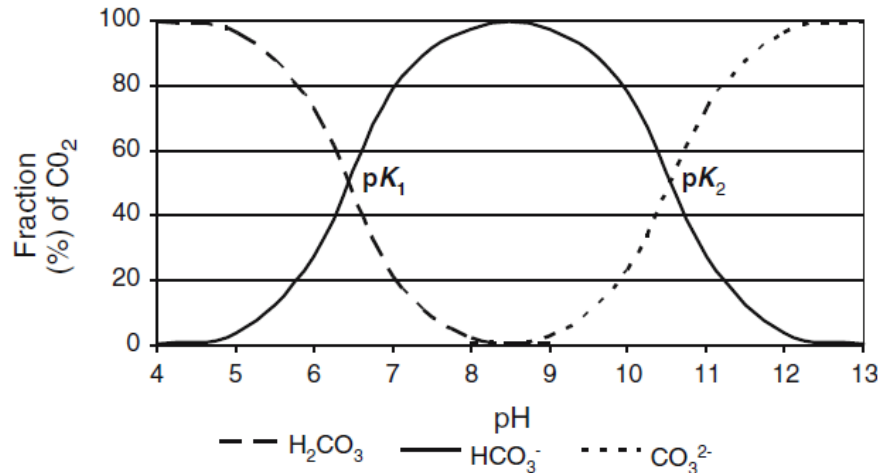
Tilførsel av karbondioksid i sjøvann inngår i følgende likevekter:

*Ligning 2*



Der g er for gass og ag står for løst i vann (Børsheim & Golmen 2010). CO<sub>2</sub> løses lett i vann og reagerer svakt surt. Dette skyldes at løst CO<sub>2</sub> delvis reagerer med vannet og danner karbonsyre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), som er en svak syre. I midlertid er det bare en liten del av det løste CO<sub>2</sub> som danner H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Det meste vil foreligge som molekylært CO<sub>2</sub> (gassform). Avhengig av pH vil H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dissosiere til bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) som igjen kan dissosiere til karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) under dannelsen av hydrogenioner (H<sup>+</sup>), frigjøring av H<sup>+</sup> fører til at pH i vannet synker (Børsheim & Golmen 2010).

Likevekten av reaksjonen er avhengig av pH (figur 4). Siden vann stort sett har en pH skala i område 7-9, vil det meste av CO<sub>2</sub> innholdet som reagerer med vann danne HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (figur 4) (Portz et al. 2006).



Figur 4. Forholdet mellom pH og relativt andeler av uorganisk karbon, i form av karbonsyre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) og karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) i en løsning. Figur hentet fra (Portz et al. 2006).

Løseligheten til karbondioksid i vann avhenger av temperatur og saltinnhold, der løseligheten minker med økende temperatur og saltinnhold (Rosten et al. 2011).

Sjøvann har svært god bufferkapasitet som følge av karbonbalansen, og kan ta opp vesentlig mer CO<sub>2</sub> gass enn ferskvann. Ved basisk påvirkning forskyves likevekten mot høyre (Børsheim & Golmen 2010) og det dannes mer HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> og CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (ligning 2). Bikarbonat er en amolytt (Lucena 2000), dvs. kan både fungere som en syre og en base (Hart et al. 2007). Dette gjør at bikarbonat både kan ta i mot protoner fra syrer og avgi protoner til baser. På grunn av denne dobbeltsidige opptreden til bikarbonat, gjør bikarbonat i stand til å bufre pH i en bredere pH-intervall (Lucena 2000). Saltvann har et høyt innhold av Ca<sup>2+</sup> som har en høy affinitet for CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Portz et al. 2006) og fører til dannelse av kalsiumkarbonat (Børsheim & Golmen 2010). Forskyvning av likevekten mot høyre gjør at mer CO<sub>2</sub> kan tas opp i sjøvannet. Ved lav pH forskyves likevekten mot venstre og mindre CO<sub>2</sub> kan tas opp i vannet.

Likevekten mellom formene av de fem komponentene; H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> og CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> er bestemt av ett sett med likevektskonstanter. Litt forenklet kan en si at summen av konsentrasjonen av disse fem komponentene er konstant i havet. For å beholde den totale ionelikevekten vil konsentrasjonen av en komponent påvirke konsentrasjonen av en eller flere andre komponenter. Stadig tilførsel av hydrogenioner fører til at pH i vannet synker. Lavere pH vil igjen medføre at det dannes mindre karbonat som igjen vil føre til at det dannes mindre kalsiumkarbonat. Når andelen av fritt karbonat minker samtidig som konsentrasjonen av H<sup>+</sup> øker fører dette til at bufferkapasiteten i forhold til ytterligere CO<sub>2</sub> tilførsel minker (Børsheim & Golmen 2010).

Fisk utskiller metabolsk produsert CO<sub>2</sub> primært over gjellene og i mindre grad over huden. På denne måten opprettholder fisk en relativt konstant indre CO<sub>2</sub>-nivå. Det antas at mer enn 85 % av produsert CO<sub>2</sub> diffunderer som gass gjennom gjellene til det omgivende vannet i form av molekylært CO<sub>2</sub> (gassform). Noe av den produserte CO<sub>2</sub> vil også hydreres inne i gjelleepitelcellene til HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> og H<sup>+</sup> som utveksles mot Na<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup> fra det omgivende vannet (Brix 1992).

Fisk produserer generelt 1,27 g CO<sub>2</sub> for hvert 1,0 g oksygen konsumert (Portz et al. 2006). Uten vannutskifting eller CO<sub>2</sub>-utlufting vil CO<sub>2</sub> produsert av fisken akkumuleres i vannmassene. Dersom konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> blir høy i det omgivende vannet vil det kunne medføre redusert CO<sub>2</sub> utskilling fra fiskens gjeller. Dette fører til at CO<sub>2</sub> konsentrasjon i fiskens blod øker (Hyperkapni). Den umiddelbare konsekvensen av økt CO<sub>2</sub> i blodet er at pH i blodet faller (respiratorisk acidose) (Portz et al. 2006). Når blodet blir surt fører dette til at hemoglobinet oksygenaffinitet reduseres og dermed evnen til å transportere oksygen (omtales nærmere under 4.2.1).

På denne måten kan derfor konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> i vannet ha både en direkte og en indirekte effekt på fiskens fysiologi. For det første skjer en interaksjon med bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) buffer systemet som kan påvirke pH i blodet, syrebasebalansen og hydromineralbalansen. For det andre vil CO<sub>2</sub> redusere pH i det omgivende vannet og kan derved påvirke eventuelle stoffer som viser ulike former avhengig av pH. Følgelig kan en reduksjon i pH mobilisere metallioner som aluminium (Al) (Hjeltnes et al. 2008).

I åpne systemer med god vanngjennomstrømning vil ikke CO<sub>2</sub> være et problem. Derimot kan karbondioksidakkumulering i vannmassene fort bli et problem i systemer med redusert vannforsyning, for eksempel under lukket brønnbåttransport eller i en levendekjølingstank på et slakteri. Høye verdier har en rekke negative følger for fisk, som nyreskader, forstyrrelser i ionereguleringen og i syre-basereguleringen (Fivelstad et al. 1998). Videre kan det føre til redusert oksygenbindingskapasitet i hemoglobin (Eddy et al. 1977), redusert tilvekst (Fivelstad et al. 1998), og ved svært høye nivåer har karbondioksid anestetisk effekt på fisken (Bernier & Randall 1998). Mattilsynet gir en maksgrense på 15 mg/l CO<sub>2</sub> i oppdrettsvannet (Merknad-til-akvakulturdriftsforskriften 2004), hvilket er tilnærmet 1:1 forhold mellom O<sub>2</sub> forbruk og CO<sub>2</sub> produsert (Rosten et al. 2011). CO<sub>2</sub> antas å ha en større toksisitet ved lavere oksygenmetninger (Rosten et al. 2011) og laksefisk ser ut til å være mer sensitiv for CO<sub>2</sub> ved lave temperaturer enn ved høye (Fivelstad et al. 2007).

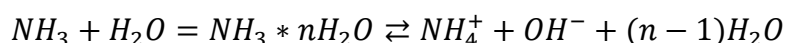
Selv om konsentrasjonen av karbondioksid i sjøvann generelt er lav, kan likevel CO<sub>2</sub> akkumuleres i vannet i tilfeller med avgrensede områder, og en kan risikere konsentrasjoner høyere enn anbefalte verdier for god fiskevelferd. Litteraturen gir ikke noe entydig svar på grenseverdier av karbondioksid i oppdrettsvannet for å opprettholde god fiskevelferd. Enkelte hevder den ikke bør være høyere enn 15-20 mg/l (Portz et al. 2006). Forslag til maksimalt akseptabelt CO<sub>2</sub> konsentrasjon i vann til oppdrettsfisk er utredet av Rosten et al. (2004), der øvre grense for *optimum* konsentrasjon er satt til 10 mg/l.

### 2.1.3 Ammoniakk

Ammoniakk er et naturlig forekommende produkt av metabolsk nedbryting og er vanlig i alle akvatiske systemer (Russo & Thurston 1991). I vann foreligger ammoniakkforbindelsene på to hovedformer, u-ionisert ammoniakk (NH<sub>3</sub>) i gassform og ionisert ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Summen av disse to betegnes som TAN (Total Ammonium Nitrogen) og oppgis som N mg/l. Hos laksefisk er TAN det dominerende nitrogen-ekskresjonsproduktet, og dannes i hovedsak som følge av forbrenning av aminosyrer. Økt konsentrasjon av TAN i fiskekar skriver seg derfor fra fiskens metabolske aktivitet (Stefansson et al. 2007).

Følgende likevekt gjelder for forholdet mellom ammoniakk (NH<sub>3</sub>) og ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) i vann:

*Ligning 3*



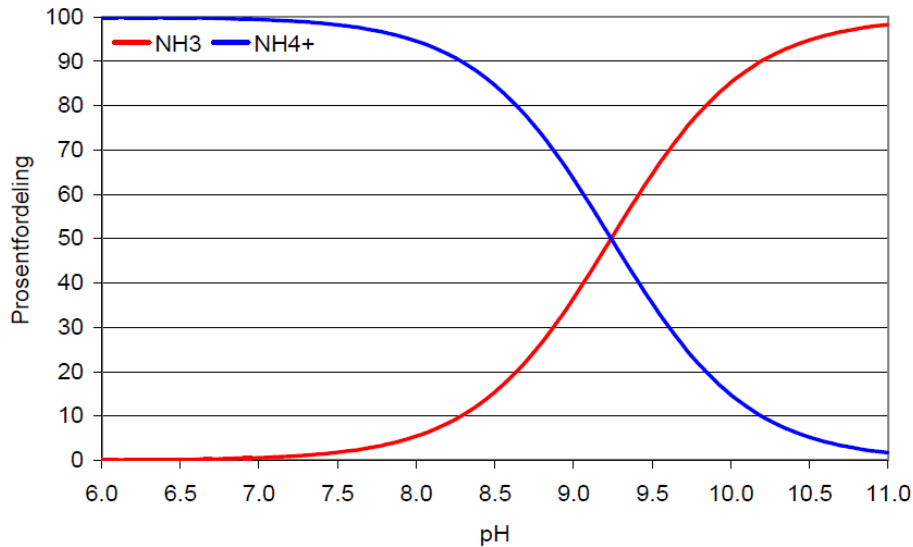
Likevekten består av den u-ioniserte formen (NH<sub>3</sub>), hydrogen- bundet til minst tre (n>3) vannmolekyler og den ioniserte formen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Russo & Thurston 1991). NH<sub>3</sub> regnes som den mest giftige komponenten for fisk, og skyldes at den er mer permeabel på gjellemembranen, mens fiskens membraner er relativt impermeable ovenfor NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Stefansson et al. 2007).

Gjellemembranen er imidlertid minst 10 ganger mer permeabel i sjøvann enn i ferskvann. For oppdrettsfisk i sjøvann kan derfor NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ha større betydning for giftigheten (Rosten et al. 2004).

Likevekten styres i hovedsak av faktorer som; temperatur, pH og salinitet. Økende salinitet vil redusere andel NH<sub>3</sub> i vann mens økende pH og temperatur øker konsentrasjonen av NH<sub>3</sub> og reduserer konsentrasjonen av NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. På grunn av en høyere pH i sjøvann enn i ferskvann, vil en større del av TAN foreligge som u-ionisert ammoniakk (figur 5). Ammoniakk-formen er selv i små konsentrasjoner giftig for fisk, mens ammonium er mindre giftig. En antyder lethalnivået

av ammoniakk i saltvann ligger på 0,08-0,45 mg/l  $\text{NH}_3$  for laks (Stefansson et al. 2002).

Ammoniakk i lave nivåer fører til stress og gjelleskader, og en antar at nivået for fisk generelt bør ligge under 0,005 mg/l  $\text{NH}_3$ , og hos laksefisk under 0,001-0,005 mg/l  $\text{NH}_3$ .

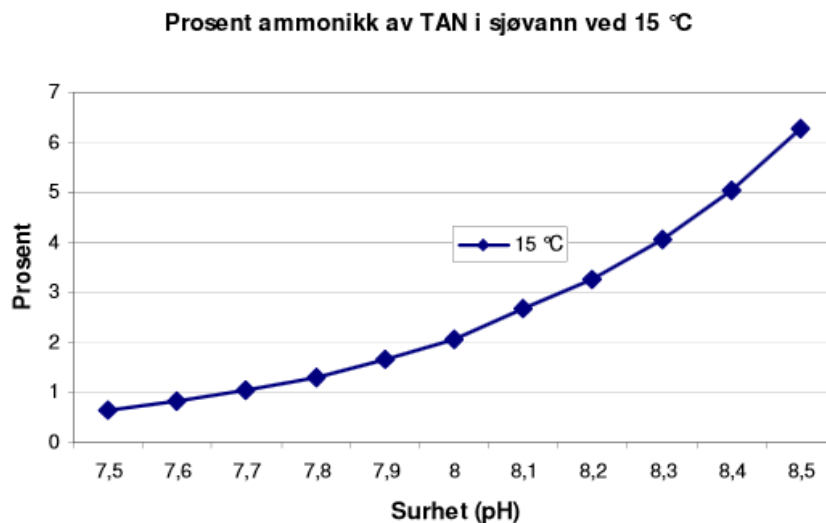


**Figur 5. Andel  $\text{NH}_3$  og  $\text{NH}_4^+$  i prosent som inngår i totalammonium-nitrogen i forhold til pH. Figur hentet fra (Rosten et al. 2004)**

Ferskvann ved 12 °C og pH 9,7 vil ha en likevekts fordeling på 50:50. Tilsvarende temperatur ved pH 7 er det kun ca. 0,2 % av TAN som foreligger som  $\text{NH}_3$ . En pH økning fra 7-8 vil øke konsentrasjonen av  $\text{NH}_3$  med ca. 10x i en gitt mengde TAN. Temperaturøkning fra 10 til 20 grader gir omtrent en dobbelt  $\text{NH}_3$  konsentrasjon. Økning i salinitet vil gi en svak reduksjon av  $\text{NH}_3$ , men har mindre virkning enn de øvrige nevnte. Siden sjøvann som regel har en høyere pH enn ferskvann, vil dette gi en kraftig økning i mengde  $\text{NH}_3$  i forhold til situasjon med samme mengde TAN i ferskvann (Terjesen & Rosseland (u.å)). En pH økning i sjøvann fra 8,0 til 8,3 med temperatur på 15 °C fører til en dobling av  $\text{NH}_3$  andelen, fra 2 til 4 % (figur 6).  $\text{CO}_2$  omdanning til karbonsyre, bikarbonat og karbonat (se ligning 2) vil redusere pH i vannet som følge av  $\text{H}^+$  frigjøringen. Redusert pH vil igjen føre til ammoniakk «avgifning». Med dette utgangspunktet kan det være en fordel med «høye»  $\text{CO}_2$  verdier (Tveranger & Johnsen 2012).

Konsentrasjonen av TAN i et normalt gjennomstrømningsystem vil ikke representere noe problem som faktor alene, men kan være betydelig i resirkulering og i lukkede transportsystemer. Særlig vil akkumulering av ammoniakk bli et problem i de tilfellene pH økes (Stefansson et al. 2007). Det er blitt rapportert dødelighet på laksefisk forårsaket av konsentrasjoner på 25µg til 300 µg  $\text{NH}_3$ /l, og negative gjelle-interaksjoner på 10 µg  $\text{NH}_3$ /l. U-

ionisert-ammoniakk vil imidlertid aldri eksistere alene, men vil fungere synergistisk eller additivt til andre forurensninger (Hjeltnes et al. 2008).



Figur 6.  $\text{NH}_3$  i prosent i sjøvann med temperatur 15 °C ved variabel pH. Figur hentet fra (Tveranger & Johnsen 2012).

### Produksjon

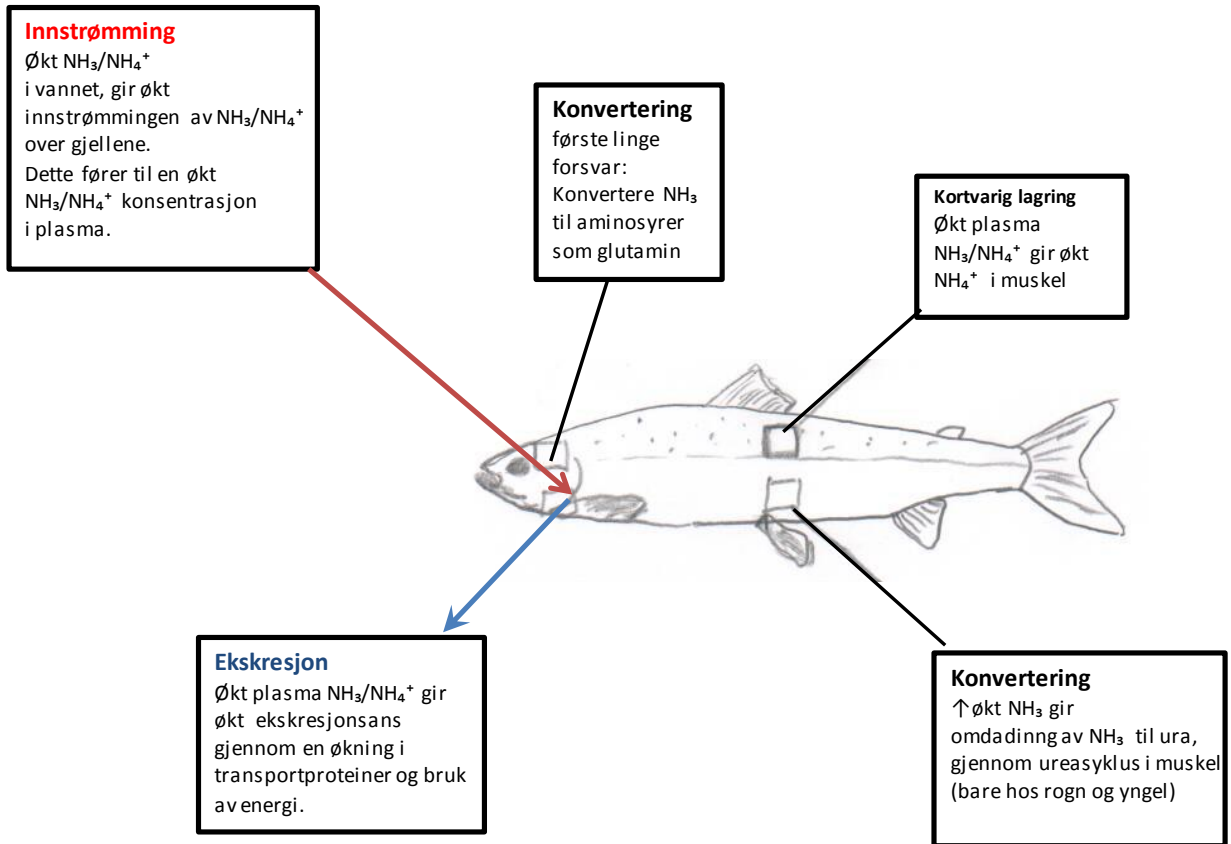
Nitrogenholdige ekskresjonsprodukter blir hos fiske i hovedsak utskilt som  $\text{NH}_3$  eller  $\text{NH}_4^+$  over gjellene, men også urea og andre nitrogenholdige produkter blir skilt ut denne veien. Hos fisk kan inntil 85 % av nitrogenutskillelsen skje i form av  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Hos marine arter er andelen av urea i ekskresjonsproduktene ofte noe større (30-40 %) enn hva den er hos ferskvannsfisk. Mesteparten av ammoniakken produseres i fiskens lever og transporteres deretter i blodbanen til gjellene for utskillelse. Noe ammoniakk produseres også i gjellene, nyrene og i muskelvevet. Produksjonen av ammoniakkeforbindelsene i muskelvev hos fisk er størst ved anoksiske forhold (fritt for oksygen) eller ved anstrengelser (Jobling 1992). Ammoniakkproduksjonen skjer hovedsakelig via deaminering (enzymatisk frigjøring av aminosyrenes aminogruppe) av aminosyrer. Store deler av den produserte  $\text{NH}_3$  (>97 %, ved fysiologisk pH (artsavhengig)) ioniseres umiddelbart etter produksjonen.  $\text{NH}_3$  nøytraliserer derfor en stor del av den samtidige produserte  $\text{CO}_2$  og danner  $\text{HCO}_3^-$  og  $\text{NH}_4^+$ . Ammonium transporteres videre til gjellene hvor mer enn 90 % elimineres (Brix 1992).

### **Forsvarsmekanismer**

Det antas at ferskvannsfisk som blir utsatt for en lett  $\text{NH}_3$  eksponering tar i bruk flere forsvarsmekanismer (figur 7). Siden permeabiliteten er høyere for  $\text{NH}_3$  enn for  $\text{NH}_4^+$ , vil innstrømmingen av  $\text{NH}_3$  være størst. Innstrømmingen fører til at konsentrasjonen av TAN i plasma øker. Fisken reagerer fort på den økte konsentrasjonen ved å konvertere  $\text{NH}_3$  og glutamat til glutamin. Når plasma TAN øker vil dette etter hvert føre til at fisken skiller ut ammoniakk mot konsentrasjonsgradienten. Sannsynligvis skjer dette fordi det blir uttrykt flere transportproteiner (Terjesen & Rosseland (u.å)). En har trodd utskillingen av ammoniakk hos ferskvannsfisk i hovedsak skjer via diffusjon av  $\text{NH}_3$ , over gjellene hvor den protoneres til  $\text{NH}_4^+$  i grensesjiktet mellom gjellene og det omgivende vannet (Nawata et al. 2007; Weihrauch et al. 2009). Nyere studier på regnbueørret viser at denne arten skiller ut ammoniakk gjennom Rhesusproteiner i gjellene, og ved hjelp av  $\text{H}^+$ -ATPase pumper som forsurer vannet rett utenfor gjellene (Nawata et al. 2007). For fisk i saltvann ser det imidlertid ut til at forsuring av gjellevannet ikke er involvert i ammoniakk utskillelsen på grunn av bufferkapasiteten i saltvann. Utskillelsen ser i hovedsak ut til å skje via en passiv diffusjonstransport av både  $\text{NH}_3$  og  $\text{NH}_4^+$  via transcellulære veier (gjennom cellene) og «lekk» paracellulære (mellom cellene) veier (Weihrauch et al. 2009). Det antas også at ammoniakk utskilling hos marine arter også skjer via inoeutveksling, der  $\text{NH}_4^+$  antas å erstatte  $\text{K}^+$  i  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -ATPase og/ eller  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  co-transport (figur 8) (Wilkie 1997).

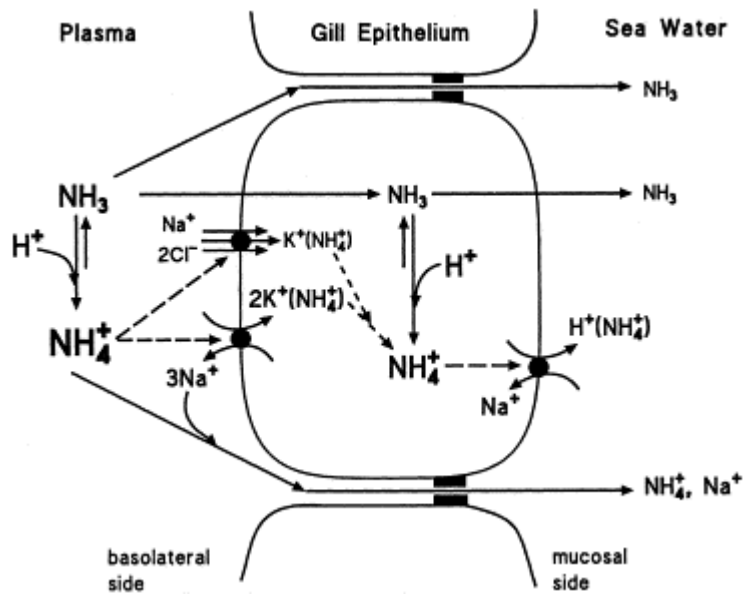
Fisk kan tolerer høye nivåer av TAN i muskel. Under mer akutt ammoniakk eksponering fungerer muligens muskelen som en kortvarig buffer (Wilkie 1997). Rogn og yngel har også mulighet til å konvertere  $\text{NH}_3$  til ura, som er mye mindre giftig enn  $\text{NH}_3$ . Disse mekanismene bidrar til å stabilisere TAN nivå i fisk, men de er energikrevende. Fisken vil derfor bruke mer energi til å bøte på ammoniakk eksponeringen som heller kunne vært benyttet til vekst. Dersom kapasiteten overstiges vil TAN akkumulere ukontrollert og fisken vil vise tegn på forgiftning (Terjesen & Rosseland (u.å)). En rekke effekter er funnet som følge av ammoniakkeksponering, blant annet effekter på plasmakortisol og plasma katekolaminer, respirasjon og sirkulasjon, hematologiske faktorer, metabolske faktorer, vann- og ionebalanse, lever, nyrevev og vevstruktur i gjeller. Akkumulert ammoniakk forstyrrer den oksidative energimetabolismen og fører til tømning av energilagre i hjernen. Dette anses å være den primære giftvirkningen av ammoniakk (Smart 1978).





Figur 7. En forenklet oversikt over antatt forløp og forsvarsmekanismer hos laksefisk i ferskvann utsatt for en subletal økning av TAN i miljøet. Etter (Terjesen & Rosseland (u.å))

Modellen i figur 8 beskriver ammoniakk ekskresjonen i gjellene hos saltvanns-adapterte fisker. Under «stady-state» tilstand vil konsentrasjonen av TAN i blodet normalt være høyere enn konsentrasjonen i det omgivende vannet. På grunn av diffusjonsgradienten mellom blod og vann i stady-state tilstand vil derfor majoriteten av TAN ekskresjon hos marine arter skje via diffusjon av  $\text{NH}_3$  og  $\text{NH}_4^+$  gjennom fiskens gjeller. Bevegelsen av  $\text{NH}_3$  tar sannsynligvis sted via paracellulære og transcellulære veier. Tilstedeværelsen av «lekk» paracellulære (kation permeable, eks.  $\text{Na}^+$ ) forbindelser hos marine arter vil også forenkle ammoniakk utskillelsen ved at  $\text{NH}_4^+$  kan passere gjennom disse kanalene.  $\text{NH}_4^+$  kan også krysse gjellene ved å erstatte  $\text{K}^+$  i ione-transportproteiner, som for eksempel  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, eller ved  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  co-transport. Transport av  $\text{NH}_4^+$  via apikal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  utveksling vil også muligens forenkle ammoniakk ekskresjonen i gjellene hos saltvannsfisk (Wilkie 1997). (se.(Wilkie 1997) og (Weihrauch et al. 2009) for mer detaljer).



Figur 8. En mulig modell for  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  utveksling hos saltvannsadapter fisk. Hentet fra (Wilson et al. 1998).

### **3. Transport og vannkvalitet**

#### **Brønnbåttransport**

Brønnbåt er den vanligste transportmetoden av levende fisk i Norge, men bil er også brukt til transport av yngel og smolt. Flytransport er lite brukt i Norge av økonomiske årsaker, men brukes mer ute i verden der infrastrukturen i distriktene er dårligere enn tilfellet er i Norge (Lekang & Fjæra 1997). Generelt blir transport i åpne systemer vanligvis sett på som mindre risikabelt enn transport i lukkede systemer. Reguleringer og restriksjoner i henhold til forekomst av smittsomme sykdommer, har imidlertid, til en viss grad, krevd at flere fisk må transporteres i lukket system. På en annen side vil man med lukket transport i større grad kunne foreta beregninger av risikoen ved transporten. All transport av fisk vil til en viss grad føre til stress, relatert til faktorer som; pH, temperatur, forandring i vannkjemi, transporttid, biomasse, skumming, lasting og lossing. Stressfull kommersiell transport, kan øke risikoen for dødelighet (Hjeltnes et al. 2008).

Brønnbåtene er utstyrt med brønner, det vil si rom til å oppbevare fisken. Brønnene er knyttet til et system av rør og pumper som sørger for resirkulering av transportvannet. Normalt vil brønnbåtene tilføre ekstra oksygen til fisken under lasting, transport og lossing. Det blir brukt flere systemer for oksygentilførsel. Fjerning av karbondioksid og nitrogen i vannet, er ikke standard utstyr i alle brønner, men er vanlig for brønner som er spesialisert for lukket transport. Noen brønnbåter er utstyrt med RSW (refrigerated seawater) kjøleanlegg som kjøler ned transportvannet. I de fleste brønnbåter kan vannutskiftningen kontrolleres ved å åpne ventiler, hastigheten på fartøyet og/eller ved å bruke store sirkulasjonspumper. Avkjøling av transportvannet vil redusere metabolismen til fisken, dermed forsinkes forringelse av transportvannet i lukket system (Hjeltnes et al. 2008).

På grunn av smittefare ved å ta inn og slippe ut vann, blir vannet i brønnbåt i dag resirkulert/luftet. Faktorer som er viktig ved all transport av fisk er; nok oksygen, lav tetthet, lav temperatur, sultet fisk, kontinuerlig observasjon av fisken, unngå stress og avtalt transportplan (Stefansson et al. 2002). Ved oksygentilsetning må skadelig høye konsentrasjoner unngås. CO<sub>2</sub> kan reguleres gjennom lufting, og ved god sulting av fisken før transport. Ved å holde en lav pH (6,2 til 6,5) i transportvannet, kan skadelige nivåer av ammoniakk forebygges. Rask pH-stigning som kan skje ved rask åpning av ventiler etter lang tid lukking må unngås da dette kan føre til akutt ammoniakkforgiftning (Nilsen et al. 2011).

### **3.1.2 Åpen transport**

Ved åpen transport i brønnbåt vil utfordringer med vannkvalitet være knyttet til kvaliteten på det vannet som tas inn i brønnbåten gjennom brønnbåtventilene og eventuelt via pumper. I tillegg kommer forholdet mellom biomasse og gjennomstrømningskapasitet. I moderne brønnbåter er dette vanligvis aldri noe problem. Vanngjennomstrømningen alene er i de fleste tilfeller nok til å forsyne fisken med oksygen og fjerne metabolske avfallsprodukter, og ligger som regel på  $> 100$  liter/m<sup>3</sup> brønnvolum/min. Tettheten ved åpen slaktelakstransport ligger normalt på 115-180 kg/m<sup>3</sup>. Ved transport av settefisk, når frakten i hovedsak går med åpne ventiler, anbefales en tetthet på 35-50 kg/m<sup>3</sup>. Akutt dødelighet under åpen transport skyldes ofte inntak av kjemikalier fra utslipp fra båter og slakteri. I tillegg kan en ofte få problem med en uheldig blanding av vann. Når vann med ulik pH, salinitet, ionestyrke og ulikt innhold av organiske stoffer blandes, oppstår en ustabil vannkjemi fra blandingsøyeblikket og noe tid utover (Rosten et al. 2004).

### **3.1.3 Lukket transport med brønnbåt**

I lukket transport vil vannkvaliteten være bestemt av fiskens metabolisme. Metabolismen øker med økt temperatur, stressnivå, økt aktivitet og med minkende fiskestørrelse. Oksygen, karbondioksid, TAN og totalt organisk bundet karbon (TOC) er de viktigste stoffene. På grunn av sjøvannets bufferkapasitet for CO<sub>2</sub>, vil pH synke mer i transport med ferskvann i brønnen enn med sjøvann. CO<sub>2</sub> nivå over 60 mg/l anbefales ikke for transport av laksefisk i lukket system når konsentrasjonen av TAN og TOC er høye (Rosten et al. 2004). Ved å senke temperaturen på vannet vil en oppnå nedsatt metabolisme hos fisken, som igjen vil redusere metabolske avfallsprodukter og på den måten fungerer det som tiltak i forbedring av vannkvalitet i et lukket system. Slike operasjoner er imidlertid ikke uten risiko. Dersom en blir nødt til å ta inn friskt sjøvann med høyere pH i brønnen kan akutt ammoniakkdødelighet oppstå. NH<sub>3</sub> representerer den største faren i en lukket transport. Ammoniakkkonsentrasjonen kan holdes lav ved å holde en pH under 6,5. Etter 1-2 timer lukket transport vil denne pH ofte komme av seg selv på grunn av akkumulering av karbondioksid. Inntak av frisk sjøvann med pH 8,2 vil ofte representere stor fare for akutt ammoniakkforgiftning. Det oppstår en blandingssone mellom friskt og gammelt vann i brønnen, hvor ammonium kan gå over til ammoniakk. Dette kan få fatale følger dersom ikke utskiftingen skjer raskt nok. Dersom en holder oksygenmetningen høy kan giftvirkningen av ammoniakk delvis motvirkes. Risikoen for påvirkning av sjøvannstoleransen blir imidlertid høy. Grunnen er blant annet at høye oksygenkonsentrasjoner kan skade kloridcellene på gjellene. Ved ferskvannstransport av smolt

uten kontroll på oksygenmetningen kan dette oppstå. Potensielt høye ammoniakk nivåer og lang transporttid kan friste til å øke oksygennivåene svært mye (Rosten et al. 2004). Ammoniakkforgiftning, høyt innhold av karbondioksid, temperatursjokk, store avvik i vannets innhold av oksygen eller en kombinasjon av disse faktorene kan medføre transportdødelighet (Nilsen et al. 2011). Begrepet «Forsinket dødelighets-syndrom» (Harmon 2009), beskriver tilfeller av økt dødelighet som følge av stress under transport, der dødeligheten kan oppstå dager til uker etter transporten (Nilsen et al. 2011). Stress hos fisk i forbindelse med saltvannstransport, vil gi fisken problemer med vann og ione-balansen, og forsinket dødelighet skyldes stort sett dette fenomenet (Kristiansen & Samuelsen 2006).

Ankomst og lossing fasen er ett annet kritisk øyeblikk ved lukket transport. Risikoen er forbundet med faren for rask stigning i pH som kan forårsake rask transformasjon av  $\text{NH}_4^+$  til  $\text{NH}_3$  og gi toksiske ammoniakknivåer. Inntak av friskt sjøvann med høyere pH er nesten uunngåelig under lossing av fisk fra en brønnbåt med vakuumpumper. Når ventilene åpnes øker dermed risikoen for akutt ammoniakkforgiftning (Hjeltnes et al. 2008).

Hovedsakelig er det fiskens metabolisme som avgjør vannkvaliteten under lukket transport. Metabolismen hos fisk er større for liten enn stor fisk, den vil også, som nevnt tidligere, øke med økende temperatur, stressnivå og svømmeaktivitet. Temperatur er antagelig den mest kritiske faktoren for akkumulering av metabolitter i transportvannet. Sjøvannstemperaturen er normalt høyest på sensommeren og høsten. Derfor vil det være mindre marginer ved transport på sensommeren, som følge av høy metabolisme hos fisken på grunn av høye vanntemperaturer (Hjeltnes et al. 2008).

### **3.1.4 utfordringer med kombinert brønnbåttransport (vekselvis åpen og lukket transport)**

Den mest kritiske faktoren her er varigheten på perioden med lukkede ventiler. Problemet ser ut til å oppstå under åpning av ventilene for sjøvannsforsyning etter en periode med lukket transport. Teoretiske beregninger foreslår at årsaken kan være en plutselig endring i ammoniakk-ammonium likevekten forårsaket av en rask økning i ionestyrke og pH. Utskifting av vann i en brønn vil ikke skje uten dannelse av midlertidige og uforutsigbare blandingssoner mellom nytt og gammelt vann. Ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) representerer alltid den mest kritiske faktoren for dødelighet og redusert velferd under stengt transport i sjøvann. Forholdsregel er å holde en pH under 6,5, som nevnt tidligere, vil det drive likevekten mot ammonium og opprettholde et lavt ammoniakknivå. På grunn av faren for ammoniakk forgiftning må følgelig

lossing foregå uten tilsetning av nytt vann, dersom transporten har vært lukket (Hjeltnes et al. 2008).

Karbondioksid opphoping i vannet senker pH og dermed reduseres dannelsen av  $\text{NH}_3$  fra økende TAN. På en annen side virker dette stressende på fisken og virker negativt på fiskens syre-base-balanse. Økende  $\text{CO}_2$  konsentrasjoner i vannet vil raskt føre til en økning i  $\text{CO}_2$  partialtrykket i fiskeblodet som påvirker oksygenbindingen til hemoglobinet. Dette gir et økt behov for tilgjengelig oksygen, enten ved å tilsette oksygen eller ved å redusere temperaturen på vannet, eller en kombinasjon av begge (Hjeltnes et al. 2008). Synkende temperaturer øker derimot giftigheten av ammoniakk (Stefansson et al. 2007). Forhøyet konsentrasjon av karbondioksid i blodet (hyperkapni) kompenseres fysiologisk ved økning i plasma bikarbonat. Omfang og hastighet av  $\text{CO}_2$  opphoping er viktig da fisken har en begrenset mulighet for tilpassing. I slike tilfeller er det viktig å unngå ekstra syre-base stress som kan oppstå fra hypoksi og anstrengelser, som leder til fall i pH i muskel og i blod på grunn av hyperlaktatemi (Wedemeyer 1996). Det er grunn til å tro at det er en interaksjon mellom  $\text{CO}_2$  konsentrasjonen i vannet og giftigheten av ammoniakk, spesielt i samvær med lavt oksygenivået i transportvannet (Hjeltnes et al. 2008).

### **3.1.5 Åpen vs. lukket transport**

I en tidligere studie av Gatica et al. (2010) ble det foretatt sammenligning av åpen vs. lukket brønnbåttransport med henhold til stressrespons i fisk. Grad av påvirkning de ulike transportsystemene hadde på fisken ble målt ved hjelp av pH i muskel, inntreden av rigor mortis og forandringer i blodparametere relatert til stress i fisk. Sammenligningene ble gjort ved fire forskjellige, og sammenlignbare transportfaser; i merd på oppdrettsanlegget, i brønnbåt etter lasting, i brønnbåt etter reisen og før lossing, og på slakteriet etter pumping til prosesseringsanlegget. Fisken fra åpentransport ble pumpet fra ventemerde til prosessering, mens fisken fra lukket transport ble pumpet direkte fra brønnbåt til prosessering. Resultatet viste at fisken i fra åpen brønnbåttransport hadde en gradvis reduksjon i muskel-pH (målt umiddelbar etter død) for hver påfølgende fase i transporten, mens muskel-pH for fisken fra lukket brønnbåttransport tilsynelatende ikke viste stor forskjell mellom de ulike transportfasene. Pumpefasen hadde størst innvirkning på fisk, hvor fisk fra begge transporttypene fikk redusert muskel-pH. Effekten av pumping på muskel-pH var betydelig større hos fisk fra åpen transport, sammenlignet med fisk fra lukket transport. Gatica et al. (2010) antydte at årsaken til høyere muskel-pH hos fisk fra lukket transport muligens kom av at den lave temperaturen under reisen medførte i redusert aktivitet på enzymer involvert i

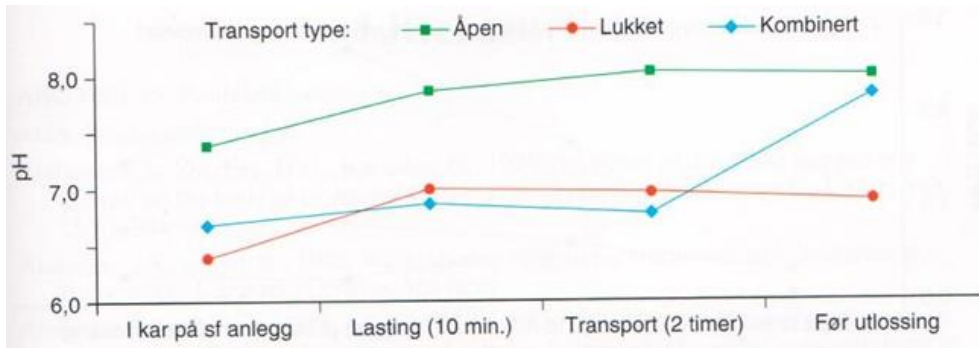
glykogenolysen og nedbrytingen av glukose. Det ble også registrert en høyere økning av laktat i blodet hos fisk fra åpen transport etter pumping, sammenlignet med fisk fra lukket transport. Forfatterne antok at den sedative effekten av kjølevannet under transporten hemmet fiskens bevegelse og dermed reduserte muskelaktiviteten som fører til økt laktat i blod. Videre ble det vist at pumpingen medførte i en betydelig høyere rigor indeks målt tre timer post-mortem hos fisk fra åpen transport sammenlignet med fisk fra lukket transport. Blodanalysen tydet imidlertid på at lukket og kjølt brønnbåttransport påførte fisken mer stress enn åpen brønnbåttransport, ettersom fisken fra lukket transport hadde høyere konsentrasjon av klorid, natrium og kortisol, samt høyere osmolaritet. Imidlertid hadde lukket transport et bedre sluttprodukt, i henhold til kjøttkvalitet, med høyere muskel pH og lavere rigor indeks målt tre timer post mortem. Resultatene antyder at det vil være en vis fordel med lukket transport i henhold til levendekjøling av fisk under transport, der medfølgende høyere muskel pH og forsinket utbrudd av rigor mortis vil gi mer tid til pre-rigor prosessering og potensielt bedre filetkvalitet.

Til tross for bedre sluttprodukt ved lukket transport som vist i studie av Gatica et al. (2010), vil imidlertid ikke den registrerte stressresponsen imøtekomme krav om dyrevelferd. Åpen transport vil i utstrakt grad ha mindre utfordringer i forhold til vannkvaliteten, der problemet generelt ser ut til å oppstå ved passering av belter med giftige blandesoner eller om man får kjemikalier inn i brønnen. På grunn av smittevernmessige forhold kan derimot lukket transport være nødvendig.

### **3.1.6 Utvikling i vannkvalitet for åpen, lukket og kombinert brønnbåttransport**

Forskjellene mellom vannkvaliteten som fisken opplever i de ulike transporttypene, åpen lukket og kombinert kan vises ved resultater fra et forsøk med brønnbåttransport av smolt (Rosten et al. 2007). Tre kommersielle brønnbåttransporter ble fulgt, åpen, lukket og kombinert, med 0+ laksesmolt. Vannkilden var sjøvann med noe innslag av ferskvann. Resultatet av dette studiet viste dramatiske forskjeller i vannkvaliteten smolten opplever i et lukket- kontra et åpent- transportsystem (figur 9, 10, 11 og 12).

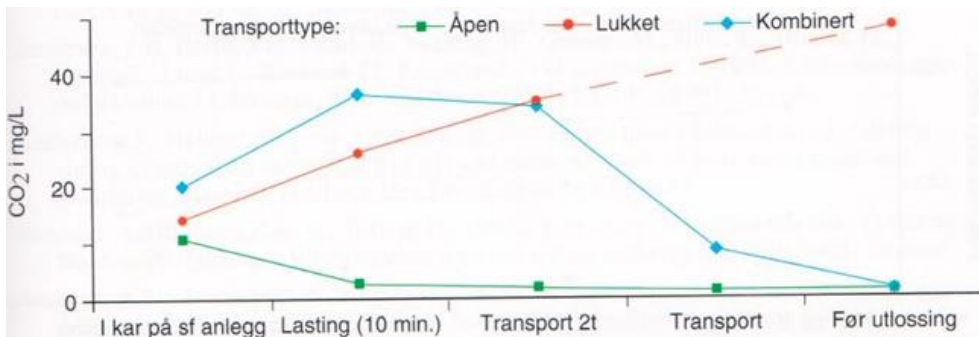
For de lukkede transportene ligger pH mye lavere enn hva den gjør for åpen transport, mens den stiger i den kombinerte når ventilene åpnes (figur 9).



**Figur 9.** pH i fiskebrønnen ved de tre transporttypene. Vannprøver tatt på settefiskanlegg, før transport, under transport og rett før lossing. Figur hentet fra (Rosten et al. 2007).

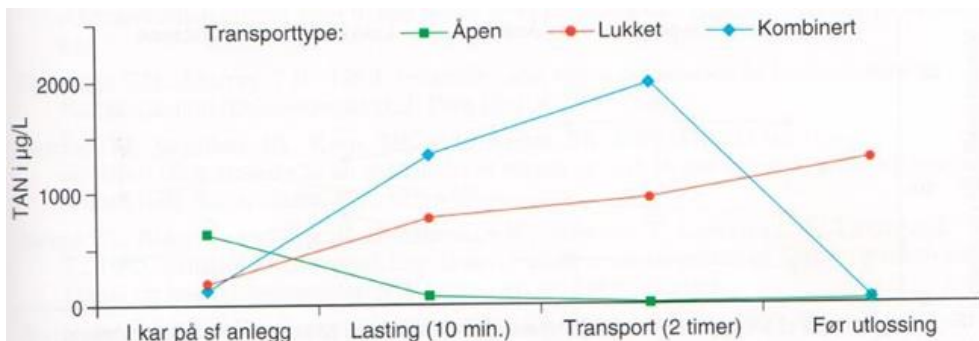
Karbondioksidkonsentrasjonen i fiskebrønnen er opptil 40 ganger høyere etter 2 timer i den lukkede transporten sammenlignet med åpent system (figur 10)(Rosten et al. 2007).

Akkumuleringen av CO<sub>2</sub> under lukket transport er årsaken til pH-senkningen. Konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> reduseres i kombinerte når ventilene åpnes og pH øker, mens den i lukket transport viser en ytterligere økning.



**Figur 10.** CO<sub>2</sub> i fiskebrønnen med de tre transportene. Vannprøver tatt på settefiskanlegg, før transport, under transport og rett før lossing (Rosten et al. 2007).

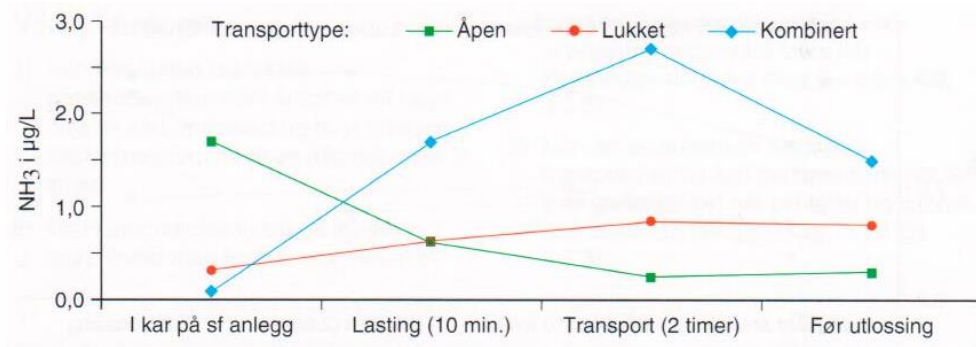
Figur 11 viser at konsentrasjonen av TAN ligger langt høyere i lukket og kombinert transport sammenlignet med det åpne etter 2 timer.



**Figur 11.** Total ammonium nitrogen (TAN) i fiskebrønnen under de tre transportene. Vannprøver tatt på settefiskanlegg, før transport, under transport og rett før lossing (Rosten et al. 2007).



Av figur 12. kan en se at andelen ammoniakk er betydelig høyere for den kombinerte transporttypen etter 2 timer. Det er noe uklart hvorvidt den kombinerte transporttypen gikk med åpne eller lukkede ventiler ved de ulike målingspunktene da dette ikke poengteres. Imidlertid blir det nevnt at etter 2 timer transport må den oppfattes som lukket.



**Figur 12. Ammoniakk i fiskebrønnen med de tre transporttypene. Vannprøver tatt på settefiskanlegg, før transport, under transport og rett før lossing (Rosten et al. 2007).**

## 4. Fysiologiske- og biokjemiske prosesser i fisk.

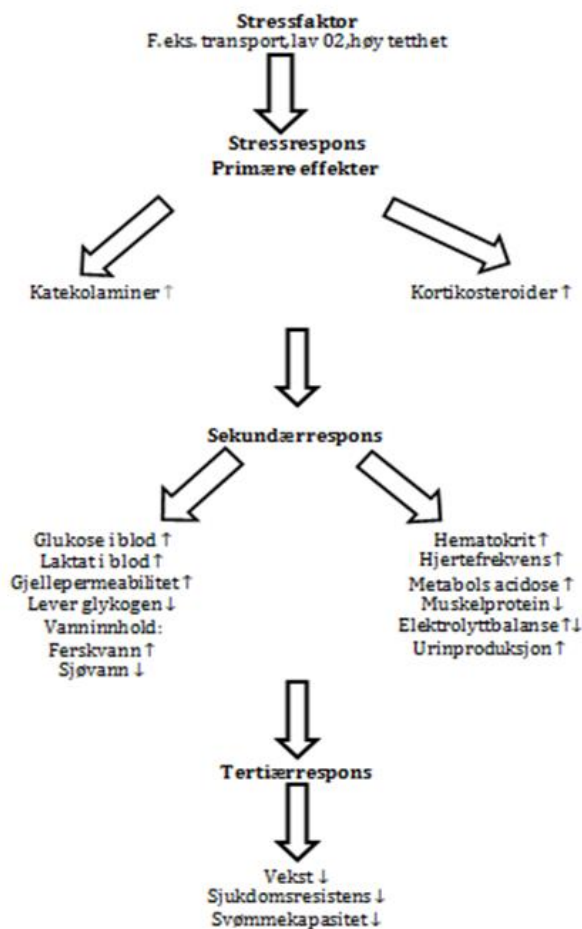
### 4.1.1 Stress

Akutt stress blir beskrevet som; «*en plutselig, forbigående belastning fra miljøet (stressor) og dyrest respons på denne stressituasjonen*» (Stefansson et al. 2005). Denne responsen oppstår raskt som følge av korttidsforandringer i miljøet og i verste fall kan den være akutt dødelig. Stort sett har akutt stress bare konsekvenser innenfor en kort periode av livssyklusen. Fysiologiske responser på stress deles ofte inn i primære, sekundære og tertiære responser (figur 13). I grove trekk omfatter dette fasene i General Adaptation Syndrome, GAS (alarm, motstand, homeostase/kompensasjon/utmattelse). Håndtering, dårlig vannkvalitet og hurtige endringer i miljø som temperatur, oksygen etc., medfører ofte i stressrespons hos fisk (Stefansson et al. 2005).

De primære stressresponsene har som hensikt å alarmere individet i forhold til et ugunstig miljø og vil for fisk inntreffe i løpet av sekunder eller minutter. Fisken responderer ved frigivelse av adrenalin fra kromafinceller i hodenyren, mens hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI) akselen frigjør hormonet ACTH fra adenohypofysen som i sin tur stimulerer til produksjon og frigjøring av kortikosteroider (hovedsakelig kortisol hos fisk) fra interrenalvev (Stefansson et al. 2005).

De sekundære responsene er i hovedsak knyttet til energimobiliseringen og representerer mulighetene fisken har til å motstå forandringer og unngå fare. Stress fører generelt til en omdreining av metabolismen fra anabolisme (oppbygning) til katabolisme (nedbrytning/frigi energi). Fysiologiske viktige forandringer ved sekundærrespons er knyttet til endringer i blodkjemi. Stress vil blant annet føre til økt konsentrasjon av plasma glukose og laktat som energisubstrat for fysiologiske omstillinger og aktivitet (fight og flight). I vev som lagrer energi vil det også skje endringer, blant annet vil det oppstå en reduksjon i lever glykogen, muskelprotein og etter hvert vil det også tære på fettvev. På denne måten fører de metabolske endringene til at mer energi er tilgjengelig til bruk i prosesser som øker sjansen for å overleve.

I tillegg til energimobilisering inntreffer andre endringer med formål å øke oksygenopptaket, og slik bidra til energifrigjøring. Hos fisk vil det blant annet i gjellene skje en rekruttering av flere sekundærlameller for å øke oksygenopptaket. Dette får imidlertid konsekvenser for fiskens respiratorisk-osmotiske kompromiss. Rekrutteringen av sekundærlamellene får følge i økt ione-lekkasje over gjellene som videre vil kunne føre til osmotisk ubalanse. Følgelig vil fisk i ferskvann tape salter og få et vannoverskudd, mens fisk i sjøen taper vann og får et overskudd av ioner/salter (Stefansson et al. 2005).



Til slutt får de sekundære responsene sitt utløp i tertiære responser. De tertiære responsene kan strekke seg over timer og dager. Responsene er adaptive i det de tillater endringer i for eksempel atferd som øker fiskens sjanse for å overleve (Stefansson et al. 2005). Langvaring stress kan derimot være maladaptivt og vil redusere fiskens evne til reproduksjon, vekst og overlevelse (Sigholt & Staurnes 1992).

Figur 13. Oversikt over sammenhenger mellom stressfaktor og fysiologisk respons på stress hos fisk. Etter (Portz et al. 2006) og (Sigholt & Staurnes 1992).

#### 4.1.2 Stress hos laksefisk i forbindelse med slakting

Under slakteprosessen blir fisken utsatt for en rekke faktorer som kan utløse stressrespons i laks. Håndtering, pumping, nedsatt vannkvalitet, eventuelt oppholdstid ute av vann (Mejdell et al. 2009) og trenging (Skjervold et al. 2001b) er alle faktorer som gjerne er forbundet med

stress hos fisk. Økt muskelaktivitet før død som følge av stress kan medføre redusert tid før inntreden av rigor mortis (Robb et al. 2000), bløtere tekstur (Kiessling et al. 2004; Roth et al. 2002; Roth, Bjørn et al. 2006), tap av farge (Robb et al. 2000) og filetspalting (Kiessling et al. 2004; Robb et al. 2000; Roth, Bjørn et al. 2006). Tiden fisken holdes trent og grad av trening har stor betydning for fiskevelferd, der hard og/eller langvarig trening vil utmatte fisken som igjen får følge for produktkvaliteten. Slimtap og skjelltap er ofte et resultat av langvarig stress hos fisk (Mejdell et al. 2009). Stressrespons blir ofte målt via blodanalyse (Poli et al. 2005; Sigholt & Staurnes 1992). Blodparametere som ofte måles er; glukose, laktat, kortisol og osmolaritet (Skjervold et al. 1999). Konsentrasjonen av ioner (Sigholt & Staurnes 1992) og hematokrit (Poli et al. 2005) i blod blir også brukt som stress indikatorer på fisk. Visuell vurdering av atferd benyttes også ved vurdering av stressnivå hos laksefisk der blå/grønn farge på fisken tyder på at den har vært utsatt for stress (Mejdell et al. 2009). Det er utarbeidet en skala for treningsgrad (tabell 2), der fiskens atferd og antall blanke fisesider, samt antall ryggfinner i overflaten som er synlig, benyttes som mål for treningsgraden.

**Tabell 2.** . Skala for vurdering av treningsgrad. Fiskens adferd og antall ryggfinner i overflaten samt antall blanke fisesider som er synlig, kan gi et mål for treningsgrad. Etter (Mejdell et al. 2009).

<b>Nivå 1</b>	Ønsket mål	<i>Fisken svømmer rolig, men ikke nødvendigvis i samme retning. Ingen ryggfinner bryter vannflaten, ingen hvite sider å se.</i>
<b>Nivå 2</b>	Godt	<i>Normal svømmeaktivitet ved inntak til pumpen. Få ryggfinner bryter overflaten, ingen hvite sider å se.</i>
<b>Nivå 3</b>	Uønsket	<i>Oppjaget adferd med hektisk svømming i forskjellig retning. Mer enn 20 ryggfinner bryter overflaten, noen hvite sider synlig mesteparten av tiden.</i>
<b>Nivå 4</b>	Uakseptabelt	<i>Svært høy aktivitet med svømming i alle retninger, pusting i overflaten. Avtagende aktivitet over tid pga. utmattelse. Mange ryggfinner og hvite sider i hele avkastet. Ikke mulig å holde jevn pumperate.</i>
<b>Nivå 5</b>	Ekstrem trening	<i>Fisken er utmattet og dør om den ikke gis mer plass. Mange fisk flyter på siden.</i>

#### 4.1.3 Glykolyse

Levende muskel har en stadig tilførsel av oksygen fra blodet, hvor oksygenet brukes til oksidasjon av glykogen via glukose til karbondioksid og vann. Energi i form av ATP og kreatinfosfat frigjøres til muskelarbeidet. Etter døden vil oksygentilførselen stoppe opp og det vil raskt oppstå anaerobe forhold. Glykogenet blir bare delvis nedbrutt av muskelenzymer til melkesyre. Økt opphopning i melkesyre fører til et fall i muskelens pH. Spaltingen av glykogen vil kunne fortsette helt til melkesyreoppbyggingen resulterer i så lav pH at enzymene

inaktiveres. Dette skjer ved en pH på rundt 5,5 (Lynum & Rustad 2005). Imidlertid avhenger dette av størrelsen på glykogenreservene, hvor fiskemuskel ligger på rundt 0,3 %, avhengig av fiskeart og kondisjon. Til sammenligning inneholder pattedyrmuskel rundt 1,0 % glykogen. Størst glykogennivå finner en i stor, velfødd og ustresst fisk. Under kraftig muskelaktivitet vil glykogen raskt bli forbrukt. Fisk som er utsatt for høye stressfaktorer før slakt vil ha lite glykogenreserver igjen etter døden. PH-fallet blir derfor ofte mindre enn hos ustresst fisk (Lynum & Rustad 2005).

Levende fisk og pattedyr har en muskel pH rundt 7.0. Glykolysen vil som regel soppe ved pH 5,4-6,0 i pattedyrkjøtt. I fiskemuskel vil pH sjelden falle under 6,2-6,5 på grunn av lavere glykogeninnhold i muskel. Desto større glykogenreservene er, desto mer melkesyre dannes, som igjen resulterer i økt motstandsdyktighet mot bakterieangrep. Pattedyrkjøtt har ofte lengere holdbarhet enn fiskekjøtt og skyldes blant annet større pH-fall. Glykolysen er svært temperatur avhengig. Høy temperatur vil føre til raskt pH fall og hurtig inntreden og forløp av rigor mortis (Lynum & Rustad 2005).

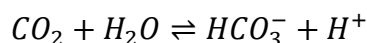
Lav pH i muskel som følge av glykolysen vil gi en bedre lagringsdyktighet. PH på under 5,5 gir en sterk hemming av bakterievekst. Vannbindingsevnen vil derimot bli dårligere jo nærmere pH kommer mot det isoelektriske punkt, som ligger rundt pH 5,4 (Lynum & Rustad 2005).

Langsom glykogen nedbryting kan gi tid til de enzymatiske trinnene involvert i glykolysen til å forringes og dermed stoppe før all glykogenen brytes ned til laktat, som igjen vil gi en høyere slutt pH. CO<sub>2</sub> sedering er vist å gi forringing i tekstur. Årsaken til dette er blitt tilskrevet økt fysisk aktivitet umiddelbart før slakting. Om dette kommer av økt aktivitet eller et raskere pH fall eller lavere slutt pH er omdiskutert (Kiessling et al. 2004).

#### **4.1.4 Laktat**

Under aerob forbrenning (med oksygen til stede) vil musklens forbrenning av glukose føre til økt produksjon av karbondioksid. Ettersom CO<sub>2</sub> konsentrasjonen øker vil pH reduseres (H<sup>+</sup> øker) i blodet, som følge av likevekten mellom vann, karbondioksid og hydrogenprotoner (Midling et al. 2008). Dette skjer via bikarbonat reaksjonen (ligning 4) i erytrocyttene (røde blodceller) (Mathews, Christopher K. et al. 2000).

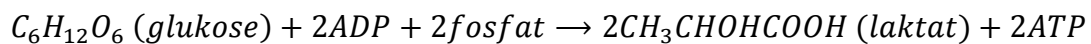
*Ligning 4*



Hoved andelen av fiskefileten består av hvitmuskulatur, som har dårlig blodtilførsel og derfor lite oksygentilgang. Høy muskelaktivitet i den hvite muskelen medfører derfor økt anaerob forbrenning. Anaerob forbrenning fører til økt produksjon av melkesyre (laktat) i muskelen, og redusert pH. Fisk som utsettes for stress over lengere tid vil ha økt oksygenforbruk og dermed økt CO<sub>2</sub> produksjon, samt forhøyet laktat nivå som følge av økt anaerob forbrenning. Dette resulterer i redusert pH i blod og muskel (Midling et al. 2008).

Anaerob forbrenning av glukose til melkesyre (Mathews, Christopher K. et al. 2000):

*ligning 5*



#### **4.1.5 Rigor mortis/ kvalitet**

Rigor mortis eller dødsstivhet er den første post-mortem prosessen som har en stor påvirkning på struktur og utsende på fiskemuskelen. Dette kan få innvirkninger på kjøttkvaliteten. Rigor oppstår når ATP-konsentrasjonen i musklene faller under et kritisk nivå. Oppheving av bindingen mellom myosin og aktinfilamentene er ATP-avhengige. Tiden før rigor vil derfor påvirkes av ATP-konsentrasjonen i muskel ved dødstidspunktet (Berg et al. 1997).

Rigor mortis er prosessen som omdanner muskel til kjøtt. Denne prosessen er avgjørende for kjøttets holdbarhet, sensoriske og tekniske kvalitet. Alle dyr gjennomløper dødsstivhet. Fiskekjøttets vannbindingsevne, vekt, drypptap og kvalitet avhenger av hvordan fisken gjennomløper rigor mortis (Agnalt et al. 2004).

Muskelen består av muskelfibrer. Muskelfibrene inneholder blant annet muskelproteinene aktin og myosin. Aktin og myosin er organisert slik at de kan gli mellom hverandre. For at en muskel skal kontrahere, trenger den en nerveimpuls og et signal (Ca<sup>2+</sup>) som utløser sammentrekningen. Muskelen bruker ATP for å løse opp muskelsammentrekningen og slappe av igjen (Agnalt et al. 2004).

Energi kan lages aerob (med oksygen) eller anaerob (uten oksygen). Under aktivitet brukes det energi. Dersom aktiviteten vedvarer over lengere tid, klarer ikke kroppen å tilføre muskelen nok oksygen. Uten oksygen til stede, vil muskelen omdanne glukose til energi der sluttproduktet er melkesyre (laktat) (*ligning 5*). Det dannes to molekyler av melkesyre for

hvert glukosemolekyl. Nivået av melkesyre vil overtid bli så høyt og pH så lav at aktin og myosin slutter å bevege seg. Når det ikke er nok ATP igjen til å slappe av, blir muskelen stiv og sur. Under dødsstivheten forblir aktin og myosin fastlåst på grunn av mangel på ATP som gjør at aktinmyosinbindingen ikke kan åpnes (Agnalt et al. 2004). Aktin proteinet er festet til tversgående proteinskiver som kalles Z-linjen. Ved opphør av rigor mortis er det ikke bindingen mellom aktin og myosin som brytes, men sannsynligvis aktinfilamentenes forankring til Z-linjen som oppløses (Lynum & Rustad 2005).

Opphoping av melkesyre inni muskelcellene gjør at det blir flere molekyler inne i cellen enn utenfor. Resultatet er økt osmotisk trykk inne i cellen. Formelen  $\pi = cRT$  uttrykker det osmotiske trykket, der  $c$ = antall molekyler inne i cellen,  $R$ = gasskonstanten og  $T$ = temperatur. Osmose er diffusjon av vann gjennom en semipermeabelmembran fra områder med høy vannkonsentrasjon til områder med lav vannkonsentrasjon. For å utligne trykkforskjellen vil derfor vann utenfor cellen transporteres inn i cellen. Økt væsknivå inne i cellen fører til at cellen blir utspent og det er dette som er årsaken til selve stivheten (Agnalt et al. 2004).

Temperaturen i selve fisken under avliving er avgjørende for hvordan fisken gjennomløper dødsstivheten. Fisk som produseres pre-rigor blir filetert direkte etter avliving. Deretter legges fisken i kasser med is, og transporteres til kunden mens fisken gjennomgår rigor mortis. Dette skjer uten at fileten henger fast til ryggbeinet, og konsekvensen av dette er at fileten trekker seg sammen og forkortes. Dersom dette inntreffer ved lave temperaturer kan muskelforkorting bli kraftig. Resultatet er at cellene i fileten revner og væske renner ut. Konsekvensen av et stort drypptap, er tap av kvalitet, vekt og følgelig penger. Fisk bør ikke fryses før rigor mortis inntreffer, fordi muskelen fortsatt vil inneholde energireserver. Energireservene vil da brukes opp under tiningen, hvilket medfører en kraftig sammentrekning som gir et ekstra stort væsketap, såkalt tine-rigor (Agnalt et al. 2004).

Biokjemien til muskel post-mortem og utbrudd av rigor, påvirkes av metoder og utstyr ved håndtering før slakting (Lowe et al. 1993; Proctor & McLoughlin 1992; Robb et al. 2000). Avhengig av glykogen reserve, vil rigor mortis starte en viss tid etter død (Lynum & Rustad 2005). Dette kan skje umiddelbart dersom fisken er sultet eller alvorlig stresset. Langvarig og alvorlig stress under slakting kan tappe muskelen for energireserve, som forstyrrer melkesyre produksjonen og endrer muskelens slutt pH. Under slike omstendigheter vil rigor mortis starte umiddelbart eller kort tid etter død (Andreoletti et al. 2009). Situasjoner med akutt stress fører til en økt produksjon av melkesyre, medfølgende raskt pH-fall (Caggiano 2000). Hos fisk som

utettes for stress før død, vil aktiviteten under håndteringen før slakting føre til at økt bruk av energirikeforbindelser i muskelen under anaerob forbrenning. Muskel pH ved slakt vil derfor være lavere og gi et hurtigere pH fall (Andreoletti et al. 2009).

## **4.2 Effekt av surt vann på fisk**

Det ser ikke ut til å foreligge noen dokumentasjon på om hvorvidt lav pH på det omgivende vannet til fisken vil ha gunstig effekt på kjøtt kvaliteten. Imidlertid er det i de senere åra blitt gjort flere studier på effekten av surt vanns innvirkning på fisk. Spesielt på ferskvannsfisk. Fiskedød ved lav pH er blitt tilskrevet kvelning på grunn av koagulasjon av slim på gjellene (Ellis 1937; Westfall 1945) redusert blod  $PO_2$  (Vaala & Mitchell 1970), og på grunn av redusert oksygenbærerkapasitet i blodet (Green & Root 1933) som følge av at pH i blodet synker (Packer 1979). De første rapportene om fiskedød i enkelte sure vassdrag i Sør-Norge kom så tidlig som i 1920. Imidlertid ble det først oppdaget at det var en sammenheng mellom fiskedød og vannets surhetsgrad mot slutten av 1920-årene. Fiskedød i sure vann og vassdrag i Norge skyldes ikke primært  $H^+$ , men mobiliseringen av aluminium fra jord og løsmasser ved forsuring (Poleo 1992). Det er i hovedsak ferskvann som vil få problemer med lav pH. Sjøvann har derimot en høyere pH i vannet og vil normalt ikke falle til skadelige verdier for fisken. Imidlertid er det i nyere tid blitt økt fokus på effekter av lav pH i sjøvann ettersom havet stadig forsures av  $CO_2$  (Ishimatsu et al. 2008). Utgangspunktet for litteraturstudie var å se om fisk som «puster» i surt vann vil kunne få reduksjon i pH i blod eller spiselig vev, noe som kan ha gunstig effekt på kjøttkvaliteten. Lav pH i muskel er forbundet med god holdbarhet. Som tidligere nevnt har pattedyr lavere muskel pH etter død enn fisk og dette er årsaken til at pattedyrkjøtt ofte har lengere holdbarhet enn fisk (Lynum & Rustad 2005).

### **4.2.1 Fiskeblod og pH**

Fiskens respirasjon styres av oksygeninnholdet i blodet (Stefansson et al. 2007), der oksygenet transporteres i blodet bundet til det jernholdige porfyrin-proteinet hemoglobin (Hb) (Helle 1990). Dette respirasjonspigmentet har fisk konsentrert som monomeren myoglobin i rødmuskel og som tetramerer i blodceller. Dersom blodets pH faller, reduseres hemoglobinet oksygenaffinitet, dette er kjent som Bohr-effekten (Helle 1990). Bohr-effekten endrer generelt de oksygen-bindende egenskapene til hemoglobinet som respons på endringer i både partialtrykket av oksygen og pH (Olsen & Elvevoll 2011). Dette fysiologiske fenomenet finnes både hos pattedyr og fisk. Imidlertid finnes en annen ekstrem form for Bohr-effekt hos



fisk, Root- effekten (Helle 1990). Root-effekten oppstår når lav pH i blodet fører til at totalt oksygeninnhold reduseres (Stefansson et al. 2007). Det som skjer er at når pH faller spaltes oksygenet av hemoglobinet, dette er kjent som Root-av-effekt. Oksygenet forblir fysisk oppløst i blodet og fører til at  $pO_2$  stiger. Når pH stiger slik at blodet blir mindre surt vil oksygen bindes til hemoglobinet og  $pO_2$  synker, dette er kjent som Root-på-effekt (Schreiner 1992). Ved en lang rekke «in vivo» pH-målinger av fisk, har det vist seg at fisk grupperer seg rundt en såkalt «konstant relativ alkalinitet» i blodet. Det er derfor blitt konkludert med at plasma-pH i fisk reguleres mot en relativ alkalinitet. PH i blodet styres ved å regulere forholdet mellom venøst  $CO_2$  og  $HCO_3^-$  ved hjelp av karbonatbuffersystemet (Brix 1992). Atlantisk laks har normalt en pH i blod 7,7-7,8 (Mejdell et al. 2009). PH i blodet faller når blodet tar opp  $CO_2$  fra vevet. Dette gjør at hemoglobinet gir fra seg mer  $O_2$ . Prosessen reverseres ved passasje gjennom gjellene. Mengden produsert karbondioksid fra cellenes metabolisme, står i forhold til oksygenforbruket (Helle 1990).  $CO_2$  bindes ikke til hemoglobinet, men transporteres i blodet enten fysisk løst eller kjemisk bundet, som  $HCO_3^-$  eller som karbaminobundet (bundet til aminosyrer) (Brix 1992). Ved normal pH vil det meste av  $CO_2$  transporteres i blodet som  $HCO_3^-$  (Helle 1990). I og med at fiskens respirasjon styres av oksygeninnholdet vil respirasjonen nedreguleres under hyperoksiske (oksygenmetning >100 %) forhold. Vider kan dette føre til at utskillelsen av  $CO_2$  reduseres og det oppstår dermed en opphoping av  $CO_2$  i fisken (hyperkapni). Hyperkapni påvirker fiskens syrebaseregulering ved blant annet å øke konsentrasjonen av  $HCO_3^-$  i blodet. I tilfellet med superoksygenering vil pustefrekvensen reduseres og  $CO_2$  innholdet i blodet vil øke og fører til at pH i blodet faller. Avhengig av pH og bikarbonat-konsentrasjonen i vannet vil fisken kvitte seg med  $CO_2$  i gassform eller som løst  $HCO_3^-$ . Dersom konsentrasjonen av  $CO_2$  i arterielt blod (fra gjellene) øker som følge av økt  $CO_2$ -innhold i vannet, vil konsentrasjonen av  $CO_2$  i venøst blod (retur til gjellene) øke. Diffusjonsgradienten over gjellene vil dermed fortsatt være rettet ut av fisken (Stefansson et al. 2007).

#### **4.2.2 Fysiologiske effekter av surt vann hos fisk**

Dersom fisk utsettes for surt vann, kan dette medføre forstyrrelser i fiskens homeostase (Rosten et al. 2004). Giftvirkningen av svært mange gasser, metaller og andre forbindelser er pH-avhengig, derfor vil effekten av pH ( $H^+$ ) alene i de fleste tilfeller være umulig å registrere. Generelt regner en med at skader først oppstår ved  $pH < 4.0-4.5$  og  $pH > 8.5-9.0$ , der den primære virkningen av  $H^+$ , er økt permeabilitet (ionelekkasje) hos fisk (Rosseland B. O. et al.

1990). Tidligere forsøk har vist at fisk eksponert for surt ferskvann får redusert konsentrasjon av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  i plasma (McDonald & Wood 1981; Ye 1986).

Gjelle-epitelet til fisk er svært permeabelt for hydrogenioner. I surt vann vil konsentrasjonen av  $\text{H}^+$  være mye høyere i vannet enn i fiskens blod. Hydrogenioner kan derfor diffundere over gjellemembranen og inn i fiskekroppen. Dette vil gi et positivt skift i membranpotensialet. Enhver faktor som forårsaker endringer i den elektriske balansen (membranpotensialet) mellom blod og vann vil kunne påvirke bevegelsen av ioner over gjellene. Innkommende  $\text{H}^+$  ioner vil reagere med bikarbonat i blodet og produsere karbondioksid og vann;  $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$  (Ye 1986). Det antas at mindre enn 20 % av den innkommende syren blir bufret med  $\text{HCO}_3^-$  i blodet. Resterende syre antas å nøytraliseres i intracellulærvæskerom (Eddy 1976). Flere har rapportert om redusert pH i blod hos fisk ved eksponering for surt vann (Packer & Dunson 1970; Packer 1979; Ye 1986). Når pH i blodet synker hos fisk vil hemoglobinet's  $\text{O}_2$  affinitet reduseres (Bohr effekt), samt redusert  $\text{O}_2$  innhold (Root-effekt) (Randall 1970). Dersom Root-effekt oppstår i arterielt blod som følge av lav pH vil dette hemme  $\text{O}_2$  transporten til kroppsvev (Ye 1986). Under aktivitet vil fisk produsere en mengde syremetabolitter som følge av økt metabolisme. Ye (1986) antok at høy aktivitet hos fisk i surt vann mest sannsynlig vil generere en acidosestilstand (overskudd av syre i blodet). Acidose kan i sin tur føre til at oksygentilførselen til vevet reduseres som følge av lavere transportkapasitet for oksygen i blodet (Sigholt & Staurnes 1992). Randall (1991) mente at fisk under aktivitet i surt vann vil få problemer med utskillelse av  $\text{H}^+$  på grunn av den høye syrekonsentrasjonen i det omgivende vannet og vil derfor få problemer med å håndtere acidose-tilstand. Fisk i nøytralt vann, vil få noe av  $\text{H}^+$  ionene som produseres under aktivitet skilt ut over gjellene, og på denne måten gjenopprette pH i blodet til hvileverdier. Som følge av hemmet  $\text{H}^+$  utskillelse over gjellene på grunn av høy omgivende  $\text{H}^+$  konsentrasjon (Packer 1979), kan dermed fiskens mulighet til å komme seg etter aktivitet-indusert acidose bli svekket (Randall 1991). Imidlertid er det blitt poengtert at surt omgivende vann ikke nødvendigvis fører til indre acidosestilstand i fisk (Wood 1989).

Slimsekresjon er en vanlig respons hos fisk som er eksponert for surt vann (Randall 1991; Ye 1986), hvilket kan hemme fiskens oksygenopptak (Packer & Dunson 1972; Randall 1991; Ye 1986) og utveksling av gasser over gjellene (Randall 1970).

En studie av Day & Butler (1996) viste at når brunørret (*Salmo trutta*) ble utsatt for en subletal pH eksponering, førte dette til at fisken fikk redusert glykogenlager i muskel. For hvit

muskel var denne reduksjonen på 52 % til 82 % og endret seg lite med økt aktivitet. For rødmuskel ble lageret redusert med 34-45 %, men falt ytterligere rundt 70 % med økt aktivitet. Redusert glykogennivå i hvit muskel er blitt observert for flere arter som er blitt eksponert for hypoksi (reduert tilgjengelighet av oksygen), Bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*, Cutthroat trout *Salmo clarki* (Heath & Pritchard 1965), regnbueørret *Oncorhynchus mykiss* (Boutilier et al. 1988; Dunn & Hochachka 1986) og skrubbe *Platichthys flesus* (Jørgensen & Mustafa 1980). En studie med brunørret eksponert for lav pH viste at syreeksponeringen tilsynelatende ikke hadde noen effekt på partialtrykk av oksygen i blod og totalt oksygeninnhold i arterieblod for denne arten (Butler et al. 1992). Dette indikerer at fisken ikke lider av oksygenmangel (Day & Butler 1996). Videre fant Butler et al. (1992) en økning i hematokrit og plasma protein nivåer i blodet, som følge av syreeksponeringen. Dette kan føre til at blodets viskositet øker (blodet blir tykkere og flyter tregere), som i sin tur kan føre til en forstyrrelse i den lokale kapillærblodtilførselen til musklene og dermed svekke tilførselen av både oksygen og blod-bundet glukose fra leveren hos fisken under svømming (Day & Butler 1996). Ved mangel på oksygen vil dette inducere til en økning i anaerob energiproduksjon via glykolysen i påvirket vev og dermed tømme muskelens glykogenlager. Effektene antas å ha en større skadevirkning på hvitmuskel enn på rødmuskel, da hvitmuskel bare har om lag halvparten så mange kapillærer i forhold til rødmuskel. Tverrsnittet i de hvitemuskelfibrene er i tillegg mye større enn tverrsnittet i de rødemuskelfibrene. Dette gjør at tettheten på kapillærene er redusert som igjen gir en økt diffusjonsavstand (Day & Butler 1996). Samme forfattere rapporterte også om en vesentlig forhøyet konsentrasjon av laktat i både rød- og hvitmuskel hos fisk i hvile ved eksponering for lav pH. Hvilket ble beskrevet som en indikasjon på forhøyet forekomst av glykolyseaktivitet i disse vevene ettersom begge muskeltypene ble hypoksisk (oksygenmangel) med syreeksponering. Laktat verdiene kan også være en indikasjon på en redusert evne til å skille ut vevslaktat på grunn av forstyrrelser i lokal kapillærblodtilførsel til disse vevene (Day & Butler 1996). Ved slaktning vil redusert glykogenlager medføre at mindre laktat blir omdannet til melkesyre etter død og pH fallet blir mindre, som igjen vil få konsekvenser for holdbarhet og kvalitet på produktet (Lynum & Rustad 2005).

#### **4.3 PH i fisk betydning for produktkvalitet.**

Surhetsgraden eller pH i fisk er logaritmen til summen av  $H^+$ -ioner fra karbondioksid (karbonsyre,  $CO_2$  i blodet) og melkesyre (laktat) (Midling et al. 2008). Derfor er ofte lav pH

forbundet med en serie negative omstendigheter eller behandlinger. Bufferegenskapene til  $\text{HCO}_3^-$  (bikarbonat) gjør at blodet har evne til å motstå reduksjon i pH. Fiskemuskel har imidlertid ikke denne egenskapen. Fiskemuskel vil derfor typisk ha en lavere pH sammenlignet med fiskens blod så lenge bufferkapasiteten i blodet er intakt (Midling et al. 2008).

#### **4.3.1 Endring i pH**

På grunn av post-mortem anaerobisk dannelse av melkesyre vil normalt pH synke innen de første dagene etter død. Under senere post-mortem forandringer holdes pH mer eller mindre konstant eller har en liten økning på grunn av dannelsen av basiske forbindelser. Den hvitemuskelen i fisk har en lav blodforsyning. Ved økt anstrengelse hos fisk, for eksempel ved fangst, dannes det melkesyre i fiskemuskel. I og med at dette vevet har liten blodforsyning vil det ta tid før melkesyren fjernes fra muskelen (Huss 1988). Siden laktatproduksjonen i forbindelse med økt anstrengelse trenger tid for å fjernes fra muskelen vil det, i følge Huss (1988), akkumuleres tilsvarende mengder melkesyre i muskelen, uavhengig av muskelstress før død.

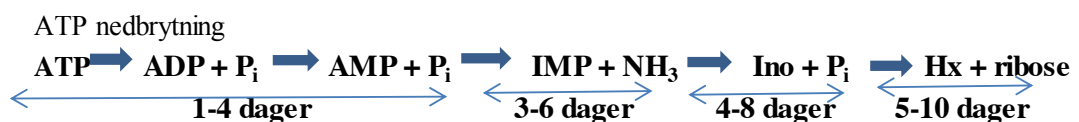
Sesongvariasjonen i pH er til en viss grad relatert til energireservene i fisk, som glykogen i lever og muskel. Imidlertid vil mye av glykogenet spaltes hydrolytisk til glukose etter død, og det er derfor ingen direkte korrelasjon mellom glykogeninnhold og post-mortem pH. Post-mortem pH kan variere betydelig (pH 5.4-7.2). Empirisk data har vist at noe av forskjellene er arts-spesifikke. Eksperimentell data tyder på at sulting og re-ernæring påvirker pH. Selv om pH endringene generelt er relativt små, har det en stor teknologisk betydning (Huss 1988). I følge Love (1980) er post-mortem pH den mest signifikante faktoren som påvirker teksturen til kjøttet og graden av filetspalting «gaping» (Huss 1988). En av grunnene til dette er at selv en liten pH endring vil drastisk påvirke egenskapene til bindevevet (myocommata) (Huss 1988). Et pH-fall fra 7,1 til 6,2 gjør at bindevevshinnene rundt muskelfibrene hos fisken løses opp slik at muskelvevets mekaniske styrke minker til  $\frac{1}{4}$ . Bindevevet er således svært ømfintlig for lav pH. Lav pH gjør at collagenet i bindevevet går i oppløsning hvilket fører til filetgaping (Lynum & Rustad 2005) Filetspaltingen blir enda tydeligere ved frysning, og i den forbindelse er det foreslått at torsk med pH under 6,7 ikke bør brukes til frysing (Huss 1988; Love 1980). Svært grundige engelske undersøkelser (Love 1975) viste at torsk fra Færøyene hadde litt lavere pH post-mortem enn torsk fanget nær Aberdeen eller ved kysten i Nord-Norge. På grunn av disse pH forskjellene holder torsk fra Færøyene litt lenger på

islagring, men har en økende tendens til filetspalting og utvikler tekstur defekter hvis de fryses (Huss 1988).

### 4.3.2 Holdbarhet

Hastigheten på autolysen (selvoppløsning) og påfølgende bakterieoppblomstring er avgjørende faktorer for holdbarheten til fiskeproduktet. Etter at fisken er slaktet vil autolysen settes i gang på grunn av oksygenmangel eller lav pH som følge av at melkesyreproduksjonen initierer lysosomene i cellene til å frigjøre enzymer. I levende fisk sørger disse enzymene for nedbrytning av døde celler. Lysosomer er små membranposer som finnes i alle celler og inneholder blant annet en rekke enzymer som bryter ned fiskens fosforforbindelser, proteiner og sukkerforbindelser. Eksempler på slike enzymer er fosfataser, proteaser, lysozymer, og glucidaser. I første omgang er virkningen av disse enzymene nedbrytning av ATP (figur 14) som påvirker smak og aroma. Deretter løses forbindelsen mellom aktin og Z-skiven opp som gjør at myomerene/sarkomerene løses fra hverandre og fører til opphør av rigor mortis og fisken får en bløtere tekstur (Lynum & Rustad 2005).

Hastigheten på reaksjonene i figur 14 er artsavhengig. Stress før slakt påvirker nedbrytningen av ATP til ADP og vil i mindre grad påvirke de senere reaksjonene (Eilertsen 2008). IMP er en aromaforsterker og gir en frisk fiskesmak og lukt på fisken. Nedbrytningen av IMP til inosin gjør at lukt og smak forsvinner, mens hypoxantin gir en uønsket bitter smak (Caggiano 2000; Eilertsen 2008).



Figur 14. Nedbrytning av ATP, ADP, AMP, IMP (Inosin monofosfat), Ino (Inosin), Hx (hypoxantin) med ca. tidsforløp. Etter (Eilertsen 2008).

### 4.3.3 Sammenheng mellom pH og kvalitet på fersk fisk

Ved å måle pH i fisken kan en se hvor langt fisken har kommet i lagringsforløpet, der helt fersk fisk har en pH nær nøytralpunktet. Avhengig av fiskens glykogenreserver vil pH etter hvert falle under 6 når glykogen omsettes anaerobt til melkesyre. Under rigor mortis vil pH holde seg tilnærmet konstant. På grunn av dannelsen av flyktige baser på slutten av lagringsforløpet vil pH stige og kan gå over nøytralpunktet. Lav pH i fiskekjøttet gir størst motstandsdyktighet mot bakterieangrep. Veldig lav pH i fiskekjøttet vil imidlertid føre til at

kjøttet blir tørt og seigt. Derimot vil høy pH gi bedre vannbindingsevne (tabell 3). Velfødd fisk i god kondisjon vil ha større glykogenreserver, hvilket gir økt dannelse av melkesyre, derav lavere pH og større motstandsdyktighet mot bakterieangrep (Lynum & Rustad 2005).

Tabell 3. Oversikt over sammenhengen mellom pH og kvaliteten på fersk fisk. Etter (Lynum & Rustad 2005).

	Lav pH	Høy pH
Vannbindingsevne	Dårlig	God
Lagringsevne	God	Dårlig
Bilukt/bismak	Sent	Tidlig
Trå konsistens	Tidlig	Sent
Filetgaping	Mye	Lite
Egnet til frysning	Nei	Ja

#### 4.4 Oppsummering og konklusjon

Det er vist at lav pH i vannet fører til pH fall i fiskeblodet. Imidlertid vil blodets bikarbonatsystem kompensere for den lave pH ved å øke opptaket av bikarbonat og på den måten bufre blodets pH tilbake til opprinnelig verdi. Derimot fører den høye konsentrasjonen av syre i vannet til at fisken får problemer med utskilling av overskuddssyre. Dersom syreeksponeeringen overskrider blodets bufferkapasitet vil fiskens oksygentransport bryte sammen. Slimsekresjon vil ytterligere kunne hemme fiskens oksygenopptak og utskillelse av gasser over gjellene, hvilket vil medføre i stress hos fisken. Videre vil forstyrrelse i ionereguleringen som følge av syreeksponeeringen bringe fisken ut av homeostase og fisken vil få problemer med vannbalansen. Forstyrrelser i den normale ione-transportmekanismen fører til at fisk i sjøvann får økt konsentrasjon av ioner i plasma og mister vann, mens det motsatte skjer for fisk i ferskvann. Fisken vil strebe etter å gjenopprette likevekten av en homeostaseforstyrrelse. Dette fører til mobilisering av energireserver der formodentlig mer energi vil brukes til vedlikehold av for eksempel gjeller, der syreeksponeeringen har sin primære effekt (Day & Butler 1996). Uttapping av energilager medfører at mindre glykogen omsettes anaerobt til melkesyre etter død. I følge Huss (1988) (se 4.3.1), er det ingen direkte korrelasjon mellom glykogeninnhold og post-mortem pH da mye av glykogenet spaltes hydrolytisk til glukose etter død. Derimot blir et større glykogenlager vektlagt som en viktig betingelse for lavere post-mortem pH av Lynum & Rustad (2005). Huss (1988) skriver også at tilsvarende mengde melkesyre akkumuleres i muskelen uavhengig av muskelstress før død. Derfor vil ikke fangstmetode influere sluttverdien av post-mortem pH. Stress i forbindelse

med slakt er derimot kjent for å akselerere inntreden og omfang av rigor mortis ((Erikson et al. 1997; Gatica et al. 2010; Skjervold et al. 1999; Skjervold et al. 2001b)), som igjen har stor betydning for produktkvaliteten. Selv om lav pH er forbundet med lang holdbarhet vil imidlertid veldig lav pH være uønsket da dette medfører tørt og seigt kjøtt (tabell 3).

Alt tatt i betraktning ser det ut til at lav pH i vannet hovedsakelig får følge i en rekke negative effekter hos fisk. Forsøkene utført på fisk eksponert for lav pH innebærer i all hovedsak sublethale til lethale pH nivåer. I hvilken grad en liten pH senkning fra den normale pH verdien på vannet har noe å si for produktkvalitet ser det ikke ut til å finnes noen dokumentasjon på. I forbindelse med brønnbåttransport til slakteriet vil transportvannet fisken oppholder seg i ofte ha en lav pH som følge av metabolskprodusert karbondioksid. Fisken blir så ført over i ventemerde med pH tilsvarende normal pH i sjøvann (pH 8). Muligens kunne en lavere pH (pH 7) i vannet til fisken etter transport hatt gunstig effekt på kjøttkvaliteten. Selv om det er vist at pH i fiskeblodet synker hos fisk i surt vann, ser det ikke ut til at dette har direkte påvirkning i pH fall i kjøttet. Videre ser det ut til at en lav muskel pH vil gi et mindre pH fall i fiskemuskel etter død, og dermed også hurtigere inntreden av rigor mortis. Derimot vil en lav pH i vannet som følge av høye CO<sub>2</sub> konsentrasjoner kunne medføre en mild sedasjon av fisk, og mindre energi går med til aktivitet (Hjeltnes et al. 2008). Følgelig vil også glykogenreservene være større ved død. Lav pH i vannet vil også ha den fordel at det i betydelig grad minsker risikoen for ammoniakkforgiftning, se avsnitt 2.1.3. Imidlertid kan CO<sub>2</sub> konsentrasjonen som må til for at fisken skal bli sedatert, bli så høye at de ikke imøtekommer kravet for å opprettholde god fiskevelferd, se for øvrig avsnitt 2.1.2.

## **5. Forsøk I Vannkvalitet**

### **5.1 Forsøksbetingelser**

#### **5.1.1 Generelle betingelser i ventemerder**

Ventemerdene til slakteriet ligger på relativt grunt vann ved kai, og avstanden til slakteriet er derfor kort. Generelt skal forholdene i ventemerd tilsvare forholdene under ordinær oppdrettsenhet, unntaket er at fisken ikke føres (Mejdell et al. 2009). I og med at fisken ikke blir føret i ventemerdene vil oksygenforbruket derfor mer enn halveres i forhold til når fisken føres (Forsberg 1997; Kristiansen & Samuelsen 2006). Like etter overføring av fisk fra brønnbåt til ventemerden kan imidlertid stress under håndteringen føre til økt oksygenforbruk. Fisken bør derfor få tid til å roe seg ned før den påføres ytterligere stress. Mengde metabolskprodusert karbondioksid og ammoniakk har direkte sammenheng med oksygenforbruket til fisken og skadelige verdier av disse to parameterne er ikke sannsynlig i ventemerder. Utskillelsen av ammoniakk vil være svært lav da fisken er sultet og en vil få begrensinger i oksygen lenge før det vil oppstå skadelige ammoniakkverdier. I og med at ventemerdene ligger i grunt, beskyttende område, er det risiko for både høye (>18 °C) og lave temperaturer (< 3°C) i vannet, noe som kan stresse fisken. Høy temperatur kan i sin tur gi fisken problemer med å dekke oksygenbehovet på grunn av redusert oksygeninnhold samt økt forbruk hos fisken. Lave temperaturer på vinterhalvåret har tilsynelatende mindre velferdsmessige konsekvenser for fisken, men det er også her en nedre grense. Både ved lave og høye temperaturer vil fisken få problemer med osmoreguleringen. Temperaturen i ventemerdene vil ikke være svært forskjellig i fra temperaturen i oppdrettsmerdene fisken holdes i, og derfor skulle det ikke ha stor betydning hvor fisken holdes. I og med at ventemerdene er grunnere vil imidlertid fisken ha mindre mulighet til å gå ned på dypere vann, med lavere temperatur. I tillegg kan temperaturen i vannet være høyere i områdene slakteriene ligger. Når fisken trenges vil fiskens egen bevegelse generer en vannstrøm, men for å se hvilken effekt det har og om dette er tilstrekkelig må det utføres oksygenmålinger. Fisketetthet og oksygenforbruk må uansett balanseres opp mot mengde vann og oksygeninnhold i vannet som strømmer gjennom ventemerden. Dette er spesielt viktig under trenging på grunn av økt oksygenforbruk hos fisken, og mindre tilførsel kan medføre lave oksygenverdier. Generelt bør ikke oksygeninnholdet i vannet gå lavere enn 6 mg/l oksygen i trengt tilstand (Kristiansen & Samuelsen 2006).



## 5.1.2 Levendekjøling

### Generelt om levendekjøling

Tidligere ble levendekjøling benyttet for å roe ned laksen i kombinasjon med tilsetning av karbondioksid for å gi full sedasjon (Erikson et al. 2006; Roth, Bjorn et al. 2006). Det er i dag forbudt å bruke karbondioksid til bedøving av fisk. Bedøvelse med karbondioksid ble forbudt da dette ga stressrespons og tidlig flukt/panikkatferd hos laks. Imidlertid kan denne stressresponsen også skyldes et stort fall i pH, samt lav oksygenmetning (Slinde et al. 2013). Dersom en kontrollerer surhetsgraden og oksygentilførselen, kan muligens CO<sub>2</sub> fungere som et sedateringsmiddel (Slinde et al. 2013). Levendekjøling er av mange trukket frem som den mest effektive metoden for å senke temperaturen i laksen (Tobiassen 2013). Flere slakterier praktiserer levendekjøling ved at fisk pumpes fra slaktermerd eller direkte fra brønnbåt til en RSW-kjøletank hvor temperaturen på vannet senkes. På grunn av de store vannmengdene som skal kjøles blir mye av vannet resirkulert, noe som får følge for vannkvaliteten. Ved liten vannutskifting og høy fisketetthet vil konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> øke, pH og oksygen synke og fisken vil avgi slim og skjell, blod fra småskader og andre stoffer som forurenser vannet (Slinde et al. 2013). For mye partikler i vannet kan også skade fisken og bør unngås (Lekang & Fjæra 2002).

Utgangspunktet for levendekjøling av fisk var todelt, (1) å få en rask temperstursenking i fisken tidlig i prosesseringslinjen basert på det faktum at levede fisk kjøles raskere ned enn død fisk (Erikson et al. 2006), fordi fiskens blodsirkulasjonssystem/gjellebueoverflate fungerer som varmeveksler (Stevens & Sutterlin 1976) og (2) ved å benytte den sedative effekten av hypotermi på fisk (Roth, Bjorn et al. 2006; Skjervold et al. 2001b). Målet med levendekjøling blir derfor å roe ned fisken før bedøving og bløgging og forbedre kvaliteten ved at mindre aktivitet gir færre slagskader, mindre laktatproduksjon, mindre pH fall, lengere holdbarhet, økt tidsrom for filetering før rigor mortis inntreer og mindre filtgaping (Slinde et al. 2013). Fisk er poikilotherm (vekselvarm), derfor er temperaturen på det omgivende vannet kritisk for deres fysiologiske reaksjonshastighet og metabolske prosesser. Hver art har et optimalt temperaturområde hvor fisken ikke viser noen tegn på termisk stress og/ eller endrer adferd (Portz et al. 2006). Atlantisk laks ser ut til å foretrekke vanntemperaturer på 4-12 °C, men de kan overleve lavere temperaturer, til og med temperatur ved frysepunktet (Skjervold et al. 2001b). I forbindelse med levendekjøling av laks er det viktig at temperaturen i vannet ikke blir så lav at det kan medføre fiskedød. Avhengig av omstendighetene begynner laks å dø ved temperaturer på -0,7 til -1,7 °C (Skuladottir et al. 1990), og nedre temperaturgrense i

vannet ved levendekjøling av laks må derfor ikke bli lavere enn  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Mejdell et al. 2009). For å få en effektiv varmetransport fra fisk til kjølt vann blir det anbefalt å holde en temperatur i vannet rundt  $0,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Kiessling et al. 2006). Fisk må akklimatiseres til vanntemperatur over  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da den sedative effekten av hypotermi ikke induseres dersom akklimatiseringstemperaturen er lavere enn dette (Erikson et al. 2006). Raskt temperaturfall ned mot fiskens toleransegrense kan derimot utløse sterke stressresponser og dødelighet (Donaldson et al. 2008). Forskning viser imidlertid at laks er i stand til å tolerere relativt bratte temperaturfall uten noen signifikante negative effekter på blod-stress-parameterne, og at fysisk stress av håndtering overskrider effekten av termisk påkjenning (Foss et al. 2012). Samme forfatterne viste at overføring av laks fra  $16-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ikke ga mer stress enn overføring til samme temperatur.

Blant alle miljøfaktorer som påvirker kjemiske prosesser i fisk er temperatur mest dominerende (Foss et al. 2012). Nedkjølt fisk innebærer også behov for mindre is ved pakking (Slinde et al. 2013). Pakkes fisken i kasser med kjernetemperatur på  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  vil isen som legges i kassene gå med til å kjøle ned fisken til  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dette fører til smeltevann i fra transportbilene og i verstefall må mer is tilføres. Mattilsynet har satt krav til kjernetemperatur  $< 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ved pakking (Erikson et al. 2006).

### **Kjøletanen på slakteriet**

Kjøletanken er produsert i syrefast stål av Uni-foos Technic AS (Danmark), med volum på  $60\text{ m}^3$ . Fisken drives i den vannfylte tanken ved hjelp av 6 medbringere som er festet til et transportbånd. Hastigheten på medbringerene styres manuelt av bløggeren. På den måten sikres kontinuerlig mottak av jevn mengde fisk til bløggebordet. Kjølt vann strømmer inn i karet på kortsiden, i forkant av karet der vanninnløpet er plassert (figur 15) (Brunstad & Harsvik 2011).

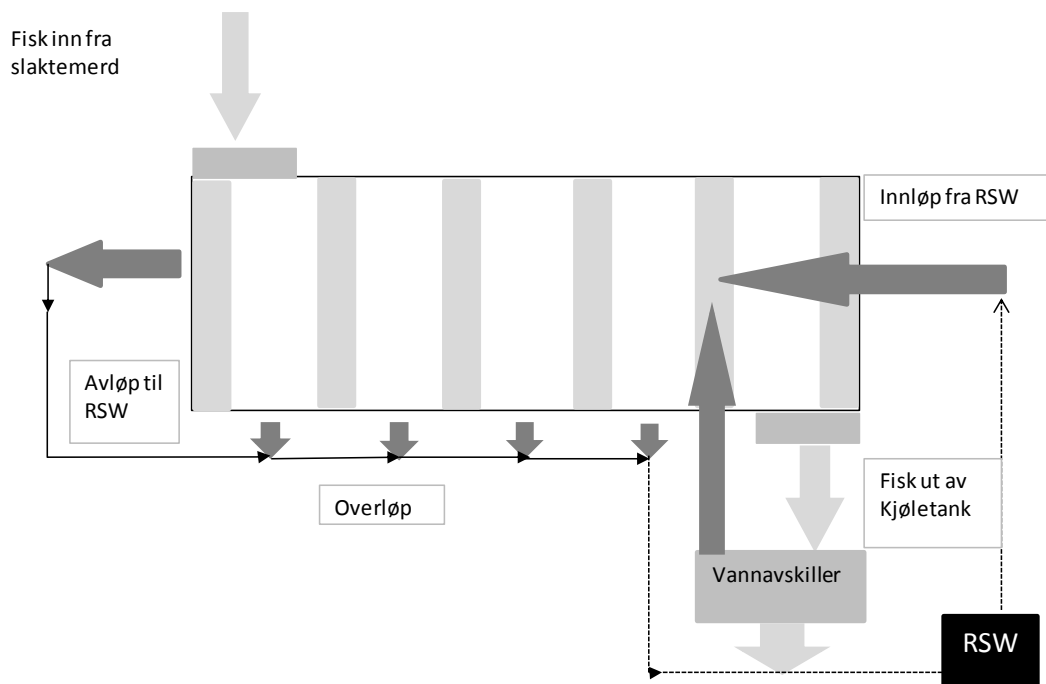
Det kjøres dobbelt skift på anlegget og etter endt produksjonsdag blir vannet tappet ut, og friskt vann gradvis tilsatt frem mot neste produksjonsdag. Vannet blir nedkjølt av et Refrigerated Sea Water (RSW) kjøleanlegg.

For å unngå at eventuelle lakselus følger med fisken inn til slakting blir hydrogenperoksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) tilsatt i kjøletanken for å avluse laksen. Når hydrogenperoksid tilsettes i vann, spaltes det til oksygen og vann, og fungerer dermed også som oksygenering av tanken. Ved dosering blir  $\text{H}_2\text{O}_2$  tilsatt i avløpsrenne som fører vannet til RSW anlegget før tilbakeføring i kjølekaret. Hydrogenperoksid blir dermed tynnet ut i vannmassene før blandingen

strømmer ut i karet. Dette er viktig da kjemikalet også er toksisk for fisken.

Hydrogenperoksid er følsom for påvirkning og nedbrytingen kan påskyndes av varme (Bruno & Raynard 1994; Rach et al. 1997), lys, forurensing eller høy pH (Norskfiskeoppdrett 2009).

Vannprøvene ble hentet hvor fisken går ut av kjølekaret, og nytt vann fra RSW-kjøleanlegget pumpes inn, se figur 15.



Figur 15. Tegning av kjøletank etter (Brunstad & Harsvik 2011).

### 5.1.3 Ensretter

Før fisken sendes til bedøving tilføres fisk fra levendekjøling til ensretterkaret. Dette skjer i bakkant av kjølekarets lengderetning. Vanntilførselen skjer oppstrøms via perforerte plater midt i karet. Avløpet er i forkant av karet, hvor vannet renner over en vannavskiller sammen med fisken. Ensretterkaret har totalt tre kanaler som fisk og vann føres inn i. Fisken skilles derfra fra vannet i en vannavskiller og føres så videre inn på et transportbånd som fører til elektrobedøveren (Brunstad & Harsvik 2011). Hensikten med en ensretter er å sikre riktig innmating av fisk til bedøver uten manuell operasjon. Dersom fisken kommer inn i bedøveren med sporden først, vil fisken få strømmen gjennom bakparten noen tid før fisken bedøves. Strømmen vil først kunne passere hjernen når fisken har kommet så langt inn på båndet at hodet kommer i kontakt med en lamell. En del av fisken som kommer baklengs vil klare å hoppe ut av bedøveren og vil således få strømstøt opptil flere ganger (Mejdell et al. 2009).

For å undersøke vannkvaliteten i ensretterkaret ble det foretatt målinger over to produksjonsdager tilsvarende for det beskrevet tidligere under kjøletank. Vannprøvene ble hentet ved innløpet i karet, like der fisk fra kjøletank kommer inn.

## **5.2 Material og metode**

Vannmålingene ble gjennomført 19. og 20. juni 2013 på lakselakteriet Bremnes Seashore As. I ventemerden og slaktemerden (trengt ventemerden) ble vannkvaliteten vurdert som stabil og målinger ble kun utført en gang per dag, henholdsvis kl. 17.00 første dag og kl. 09.00 andre dag. For å kartlegge utviklingen av vannkvaliteten i kjøletank og ensretter ble det utført målinger kl. 17.00, kl. 18.45 og 20.30 første dag, og kl. 09.00, kl. 14.30, kl. 17.00 og 19.00 andre dag. I tillegg ble temperatur og oksygen målt direkte på 3 meters dyp utenfor merd *en* gang per dag, henholdsvis kl. 17.00 første dag, og kl. 09.00 andre dag. Vannprøvene ble hentet i 10 liters bøtter for hvert uttak (figur 16) og tatt med inn for analyse. Oksygen, pH, karbondioksid og temperatur ble målt direkte gjennom prøveuttaksdagene. Det ble benyttet en OxyGuard Handy Delta (OxyGuard International A/S, Birkerød, Danmark) til oksygenmålinger og vanntemperatur (°C). Oksygeninnholdet ble målt i mg/l og i prosent metning (%). Registering av pH ble gjennomført med OxyGuard Handy pH (OxyGuard International A/S, Birkerød, Danmark). Karbondioksid (CO<sub>2</sub>) ble målt med OxyGuard Carbon Dioxide Analyser (OxyGuard International A/S, Birkerød, Danmark). Instrumentets måling er basert på en fotometrisk analysator plassert i sonden. Sondemembranen er permeabel for gass, men ikke for vann, på samme måte som et saturometer og innholdet av CO<sub>2</sub> gass i sondens målekammer blir dermed et uttrykk for CO<sub>2</sub> gasstrykket i vannet. CO<sub>2</sub> måleren er avhengig av kontinuerlig bevegelse. Det følger det med et prøveglass til karbondioksidmåleren. Dette prøveglasset har en liten propell i bunn som sørger for bevegelse i vannet. Vannprøvene ble forsiktig tømt over i prøveglasset for å unngå gassutveksling. Utenom karbondioksid, ble alle målingene utført direkte i bøtta med vannprøve.

### **Suspendert stoff**

Som følge av liten vannutskiftning i kjøletanken vil det bli akkumulering av totalt innhold av partikler i vannet. Med henhold til dette ble det tatt ut vannprøver av kjøletanken til suspendert stoff (SS) analyse. Suspendert stoff defineres som vannets innhold av organiske og uorganiske partikler (Bilotta & Brazier 2008).

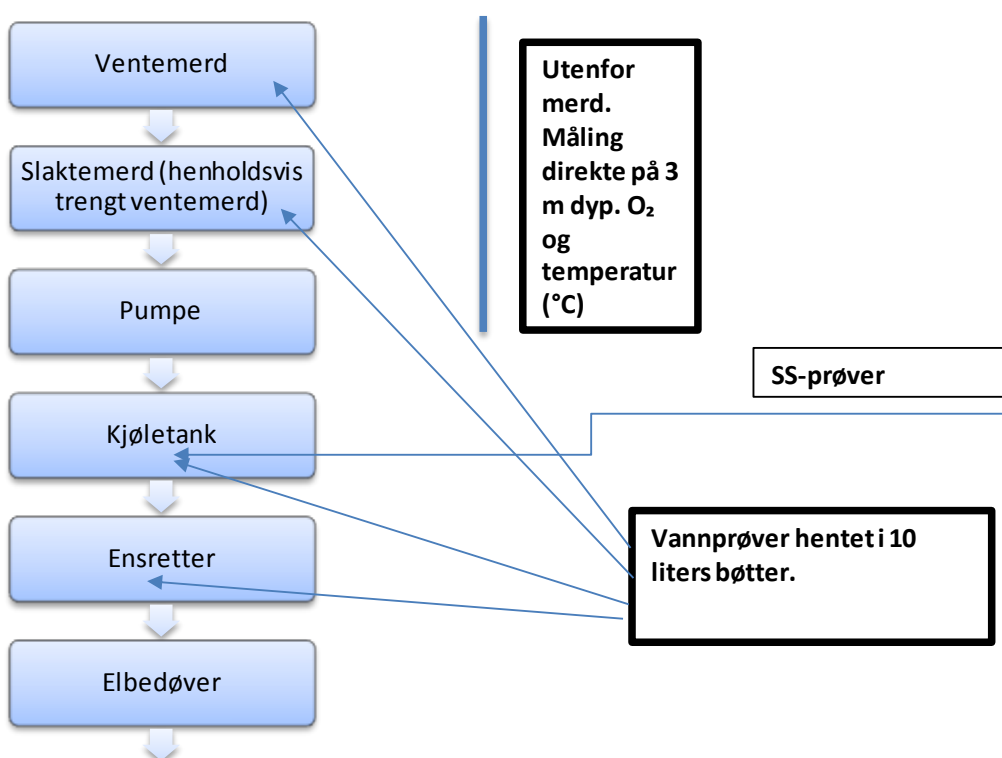
### **Prøveuttak av SS**

For å måle suspendert stoff (SS) ble det benyttet to plastflasker (500ml) til vannprøveinnsamling. Det ble tatt 2 vannprøver fra kjøletank for SS-analyse (figur 16).

Vannprøveinnsamlingen ble utført 20. juni 2013, henholdsvis kl. 14.30 og kl. 19.00, hver på 500 ml. Vannprøvene ble innhentet ved å senke plastflaskene ned i vannet med tuten på flaska først. Prøvene ble tatt ut av 10 liters bøtte med den aktuelle vannprøven. Vannprøvene ble holdt kaldt i kjøleskap frem til analyse.

### SS-analyse

Analysen av suspendert stoff ble utført på UMB i Ås den 25.juni 2013, 5 dager etter prøvetakingen. Prøvet vannet ble filtrert gjennom filter med porestørrelse 1,2 µm (Whatman GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK). Filteret ble deretter tørket på MB 45 Moisture Analyzer (Ohaus Europe GmbH, Sveits). Suspendert stoff ble kvantifisert i mg/l.



Figur 16. Illustrasjon av hvor i slaktelinja det ble utført vannmålinger

### 5.2.1 Databehandling

Alle resultater ble behandlet i Microsoft Excel 2010, hvor figurer og grafer er produsert.

### 5.3 Resultat og diskusjon vannkvalitet

#### Ventemerd

Resultatet av de registrerte vannkvalitetsparametere for ventemerd, trengt ventemerd og på 3 meters dyp utenfor merd, er vist i tabell 4 og 5. Samtlige registrerte vannkvalitetsparametere for ventemerd og trengt ventemerd er innenfor kravet til vannkvalitet for god fiskevelferd (tabell 1, kapittel 2). Alle oksygenmålingene ligger innenfor kravet om minimum metning på

70-80 %. Karbondioksid konsentrasjonen var lik for begge ventemerdene (trengt og ikke trengt) og var på 1 mg/l ved målingene begge dagene. Temperatur og oksygenmetningen på 3 meters dyp utenfor ventemerd avviker ikke i stor grad fra målingene i ventemerd og trengt ventemerd. Det var heller ingen stor variasjon i målingene fra dag 1 til dag 2.

CO<sub>2</sub> er i hovedsak et problem i lukkede systemer med oksygentilsetning og liten vannutskiftning. I et åpent system i sjøvann, hvilket er tilfelle for ventemerder, vil en få begrensinger i oksygen lenge før CO<sub>2</sub> konsentrasjonene kommer opp i skadelige nivåer for fisken (Kristiansen & Samuelsen 2006). Som en føre var anbefaling bør temperaturen i ventemerdene ikke være over 20 °C for laks (Kristiansen & Samuelsen 2006). De registrerte temperaturmålingene ligger godt innenfor dette kravet.

**Tabell 4. Resultat av vannkvalitetsmålinger dag 1, for henholdsvis ventemerd, slaktemerd og direktemålinger på 3 meters dyp utenfor merd. – Indikerer at måling ikke utført.**

Dato:	Kl. 17.00	Temperatur	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	pH
19.06.2013		(°C)	(mg/l)	(%)	(mg/l)	
	Ventemerd	12,7	8,5	98	1	7,90
	Slaktemerd	12,7	8,7	100	1	7,94
	Utenfor merd (3m dyp)	12,3	8,9	102	–	–

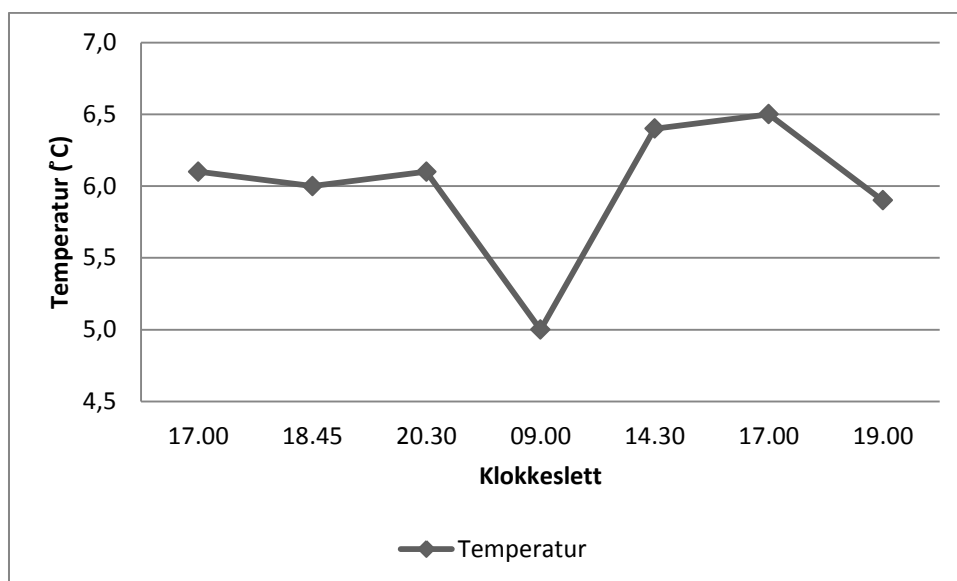
**Tabell 5. Resultat av vannkvalitetsmålinger dag 2, for henholdsvis ventemerd, slaktemerd og direktemålinger på 3 meters dyp utenfor merd. – Indikerer at måling ikke utført.**

Dato:	Kl. 09.00	Temperatur	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	pH
20.06.2013		(°C)	(mg/l)	(%)	(mg/l)	
	Ventemerd	12,9	8,9	102	1	8,03
	Slaktemerd	13,0	7,4	85	1	7,91
	Utenfor merd (3m dyp)	12,9	7,5	85	–	–

### **Kjøletank**

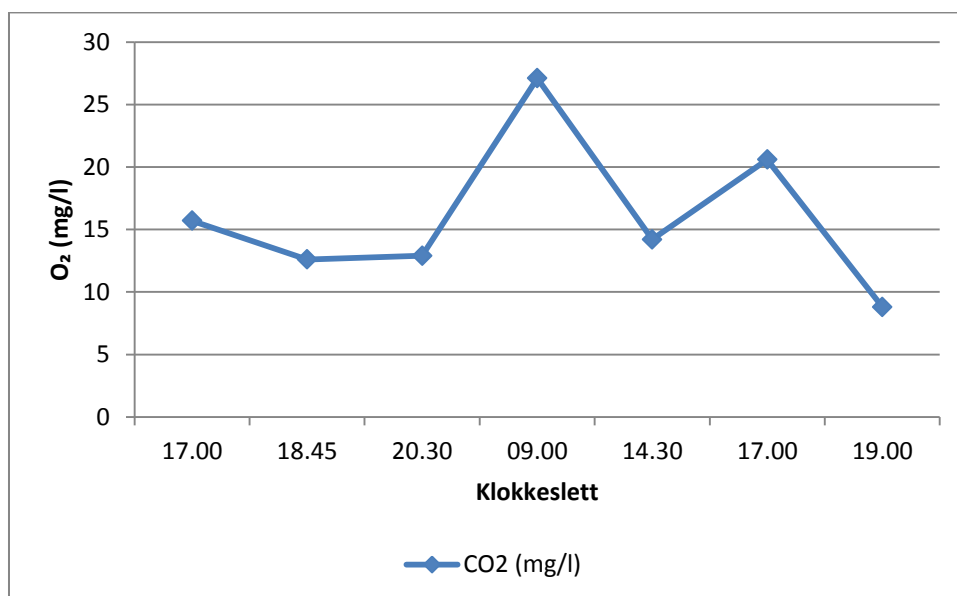
Resultatet av temperaturmålingene i kjøletanken over to produksjonsdager er vist i figur 17. Kjøletanken hadde en svingning i temperatur fra 5 °C som laveste registrerte temperatur til 6,5 °C som høyest registrerte temperatur. Dette er noe høy vanntemperatur i forbindelse med levendekjøling av fisk. Anbefalt vanntemperatur i levendekjølingskar er rundt  $0,0 \pm 0,5$  °C (Kiessling et al. 2006). Imidlertid ble målingene utført på våren med høye sjøvannstemperaturer, noe som gjør det vanskelig å holde lave temperaturer i kjøletanken med det eksisterende kjøleanlegget.

Atlantisk laks ser ut til å foretrekke vanntemperaturer på 4-12 °C (Skjervold et al. 2001b). I så måte er de registrerte temperaturene i kjøletanken gode, i det de ligger innenfor fortrukket temperturintervall for Atlantisk laks. Det blir i litteraturen nevnt at levendekjøling av fisk typisk har en temperatur på 1 °C og oppholdstid på ca. 1 time (Skjervold et al. 2001b). Temperaturmålingene i kjøletanken er langt høyere enn dette og ligger på rundt 6 °C (figur 17). Oppholdstiden per enkelt fisk i kjøletanken på slakteriet er noe usikker. På slakteriet ble det antydnet at den var på rundt 15 minutter. Det er vist at overføring av laks fra 16-4 °C ikke ga mer stress enn overføring til samme temperatur (Foss et al. 2012), og at stress som følge av en temperaturforandring på mindre enn 10 °C er mild og vanligvis godt tolerert av fisk i god helsetilstand (Erikson et al. 2006). Den største temperaturdifferansen ( $\Delta T$ ) var på 8 °C, målt andre dagen, fra 13 °C i trengt ventemerid til 5 °C i kjøletank. Stress i forbindelse med temperaturdifferanse er derfor ikke sannsynlig. Derimot vil sedateringseffekten være liten på grunn av liten temperatur forskjell. For at hypotermi skal fungere som en effektiv sedateringsmetode må  $\Delta T > 10$  ° (Erikson et al. 2006; ILAB 2005; Kiessling et al. 2006).



Figur 17. Temperaturvariasjon i kjøletanken ved ulike måletidspunkt over to produksjonsdager, vist i °C.

Oksygenkonsentrasjonen i kjølekaret varierte mellom 8,8 og 27,1 mg/l, se figur 18. Ingen av oksygenmålingene av kjøletanken lå under anbefalt grenseverdi på 70-80 % (Thorarensen & Farrell 2011). Derimot viser resultatene av oksygenmålingene at vannets metningsprosent ligger over 100% for alle målingene unntatt *en* måling, kl 19.00 andre dag, der oksygenmetningen var på 86%, se figur 19. Metningsprosenten ligger derfor over optimum nivået på 100 % for oksygenmetning i fiskekar (Rosten et al. 2004).



Figur 18. Utvikling av oksygenkonsentrasjonen i kjøletanken ved ulike måletidspunkt gjennom to produksjonsdager, vist i mg/l.

Det antas at giftigheten av ammoniakk blir motvirket av høy oksygenkonsentrasjon. Derfor er det mulig at et moderat konstant overtrykk av oksygen kan værere gunstig (Rosten et al. 2004;

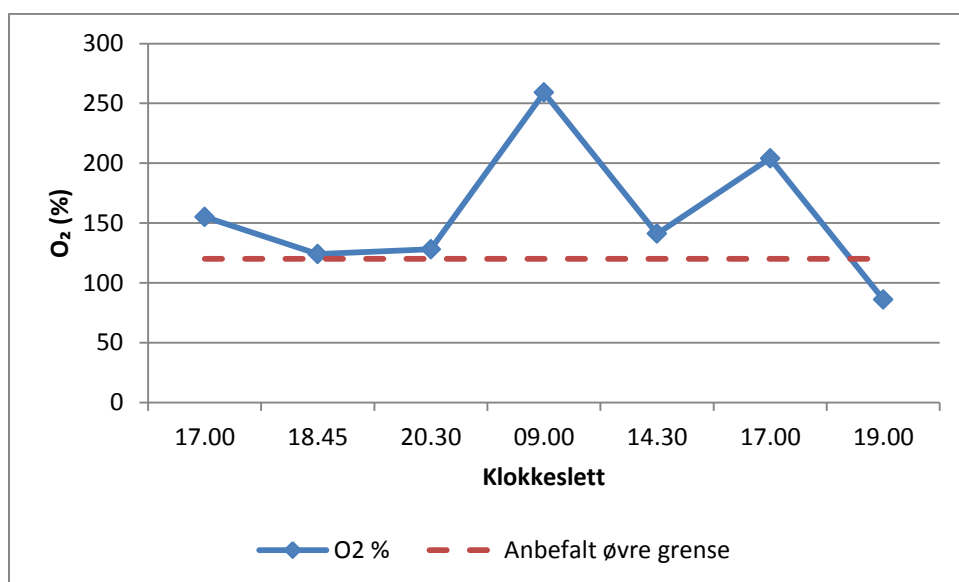


Stefansson et al. 2007). Hyperoksi kan derimot redusere gjelleventilasjonen og øke blod- $p\text{CO}_2$  (Hosfeld et al. 2008), med potensielt alvorlige konsekvenser (Portz et al. 2006). Høye oksygenkonsentrasjoner vil også kunne påvirke ionereguleringen av monovalente ioner ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) som skjer i gjellene (Rosten et al. 2004). Akutt dødelighet er dokumentert for presmolt Atlantisk laks ved oksygenmetning på 280 % ved en ukes eksponering (Lygren et al. 2000). Det er lite dokumentasjon på korttids eksponering for oksygenovermetning i høye konsentrasjoner. Oksygenovermetning er imidlertid potensielt stressende for fisk (Erikson et al. 2006), og mye tyder på at konsentrasjoner så høye som 259 %, som målt i kjøletanken, bør unngås. Oksygenovermetning vil gi risiko for dannelse av det frie oksygen radikalet superoksid ( $\text{O}_2^-$ ) (se, 2.1.1). Atlantisk laks har tilsynelatende manglende  $\text{PaO}_2$  regulering hvilket gjør dem utsatt for oksidativt stress forårsaket av økt dannelse av frie radikaler under hyperoksiske forhold (Kristensen et al. 2010). I transportenheter anbefales ikke for høye oksygenkonsentrasjoner (indikasjon  $>120\%$ ), da dette kan gi gjelleskader og oksidativt stress som gir seg utslag i dødelighet etter transport (Rosten et al. 2004). På grunn av forskjellen i partialtrykk mellom vann og blod, diffunderer oksygenet inn i blodet over gjellene til fisken og bindes til hemoglobinet i de røde blodcellene. Når  $\text{CO}_2$  fra forbrenningen blir frigjort fra cellene synker pH i blodet og oksygenet frigjøres fra hemoglobinet (Bohr og Root effekten). Igjen oppstår det forskjeller i partialtrykk som gjør at oksygen diffunderer inn i cellene og  $\text{CO}_2$  ut. Hos fisk er det oksygeninnholdet i blodet og ikke  $\text{CO}_2$  innholdet (som hos mennesker) som styrer respirasjonsraten. Ved oksygenovermetningen i vannet kan dette føre til at respirasjonsraten blir redusert til et så lavt nivå at fisken får problemer med transport av  $\text{CO}_2$  ut av blodet og over gjellene. Hyperkapni som da oppstår reduserer blodets evne til å transportere oksygen, som i sin tur gjør at blodets oksygeninnhold synker og pustelysten blir stimulert igjen (Kristiansen & Samuelsen 2006).

Mattilsynet har satt en øvre grense for oksygenmetning i kar på 120 % (Merknad-til-akvakulturdriftsforskriften 2004). Flere av de registrerte  $\text{O}_2$  verdiene i kjølekaret ligger over dette kravet og tidvis svært høyt over, se figur 19. Imidlertid er denne grensen sett som umulig å overholde i et RAS-kar og at 120 %-kravet om oksygenmetning derfor må endres. Hvis ikke vil de fleste settefiskanlegg i Norge bryte dette kravet (Sybakmoen 2011). I en tidligere studie ble det vist at regnbueørret, i et åpent system med formodentlig god vannkvalitet, ble godt alt opp ved oksygenmetning på 180 % i 125 dager (Edsall & Smith 1990). Derimot kan store svingninger i oksygenmetningen i seg selv ha negative effekter, da fisken stadig vil måtte foreta respiratoriske tilpasninger i et variabelt miljø (Olaisen 2007).

Imidlertid vil ikke nødvendigvis den til dels store variasjonen i oksygenmetningen målt i kjøletanken virke svært negativt på fisken, da oppholdstiden per enkelt individ her er kort. En bør uansett prøve å holde en stabil oksygenmetning, og store svingninger i oksygenmetningen tyder sterkt på behov for bedre kontroll over hydrogenperoksid doseringen. I en situasjon der oksygenovermetning og forhøyede konsentrasjoner av karbondioksid oppstår samtidig vil hyperkapnisk tilstand forekomme (Erikson et al. 2006).

Et forsøk utført i et lukket system med Atlantisk laks (Erikson 2001) eksponert for oksygenovermetning på 250 % i 5 timer ved 15 °C, førte til en gradvis utmattelse av fisken med gulping- og hoste adferd med munnen over vannflaten. Imidlertid var det ingen anstrengt svømmeaktivitet, og derfor sakte utvikling av rigor. Dette tyder på at fisken ikke var stresset. En post mortem evaluering av fillet kvaliteten viste derimot at oksygenovermetningen førte til mykt kjøtt og overdreven slimdannelse på hudsiden av fileten (Erikson et al. 2006). Redusert produktkvalitet i form av «bløt» muskel blir også av andre trukket fram som et problem ved høy overmetning av oksygen (Kiessling et al. 2006). Hvorfor dette oppstår ved høye oksygenmetninger blir imidlertid ikke nevnt. Videre er det vist at oksygenmetning på 140-150 % gir redusert tilvekst, dårligere sykdomsmotstand og økt dødelighet (Fridell et al. 2007; Lygren et al. 2000; Rosten et al. 2011).

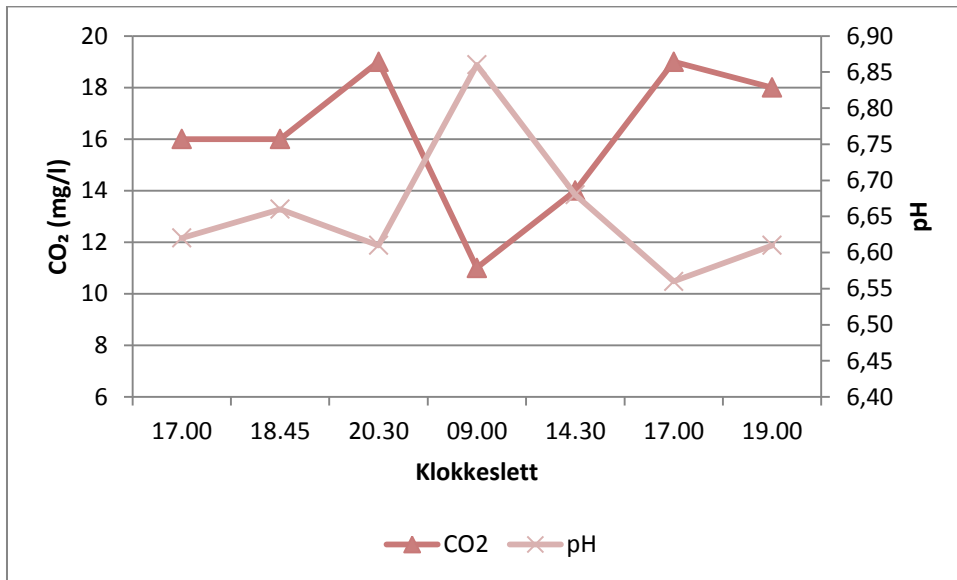


**Figur 19.** Utvikling av oksygenkonsentrasjonen i kjøletanken ved ulike måletidspunkt gjennom to produksjonsdager, vist i % metning.

Den laveste registrerte karbondioksidkonsentrasjonen i kjøletanken var 11 mg/l ved første måling (09:00) dag 2. Det ble videre registrert en konsentrasjons økning i kjølekaret utover dagen der høyeste registrerte konsentrasjonen var på 19 mg/l, henholdsvis kl. 20.30 dag 1 og

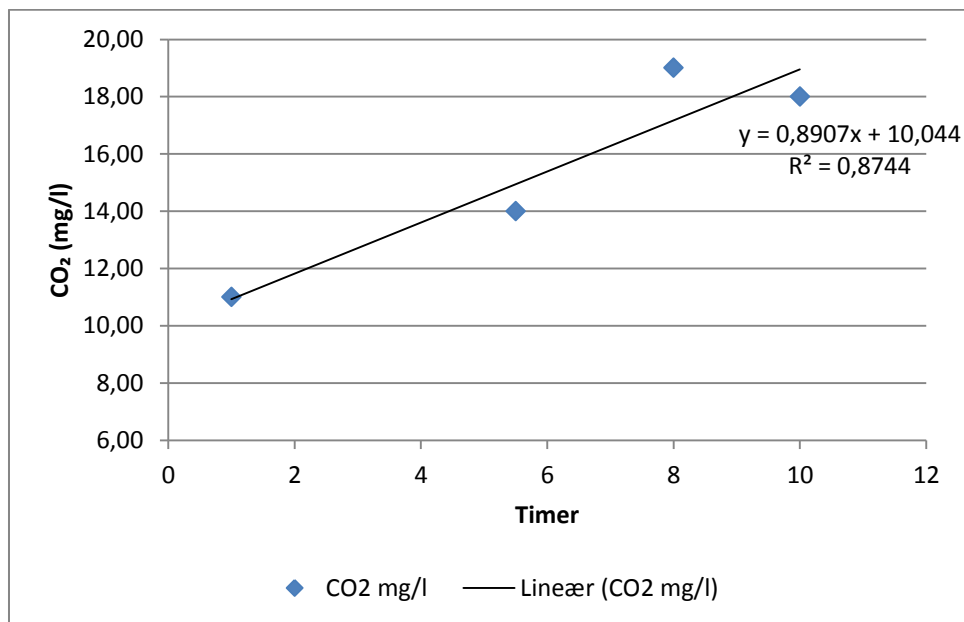
kl. 17.00 dag 2. Målingen utført kl. 17.00 dag 1 hadde en CO<sub>2</sub> konsentrasjon på 16 mg/l hvilket er noe lavere enn hva konsentrasjonen var for samme tidspunkt andre dagen, se figur 20. Forholdene vil imidlertid ikke være identiske fra dag til dag og faktorer som kan tenkes å påvirke dette er helsestatus til fisken og fisketetthet ved måletidspunkt. I intensiv oppdrett av laks er det satt krav til maksimum nivå av karbondioksid på 10 mg/l (Rosten et al. 2004). Nivået er imidlertid vurdert å være for strengt sett i forholdt til operasjonelle nivå i næringen. Norsk settefisk-anlegg har en gjennomsnittlig CO<sub>2</sub>-nivå mellom 10-13 mg/l om våren ved ca. 9°C i vannet (Rosten et al. 2004). Litteraturen gir ingen entydig svar på grenseverdier for CO<sub>2</sub>. Enkelte antyder at CO<sub>2</sub> konsentrasjonen ikke bør ligge over 15-20 mg/l (Colt & Watten 1988; Portz et al. 2006), av andre er et «tålbart» CO<sub>2</sub>-nivå for laks satt til 10-40 mg/l (Foss et al. 2003). Således ligger konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> i kjøletanken innenfor begge disse kravene. De høyeste registrerte CO<sub>2</sub> konsentrasjonene ligger imidlertid over hva som vil være *optimalt* nivå for laks (tabell 1 kapittel 2). Derimot vil oppholdstiden i kjøletanken være kort, og fisken vil derfor ikke utsettes for høye CO<sub>2</sub> nivåer over lengre tid. PH målingene som ble utført de to produksjonsdagene sammenfaller godt med CO<sub>2</sub> utviklingen i kjølekaret, se figur 20. I kjøletanken sank pH, med 0,3 enheter fra første måling (09:00) til nest siste måling (17:00) utført dag 2. Målingene viser en relativt stabil pH i kjøletanken, hvor pH varierte fra 6,56-6,86. PH i kjøletanken reduseres med ~1,3 enheter fra ventemerd på grunn av karbondioksidkonsentrasjonen. Redusert pH kan anses som en potensiell stressor (Erikson et al. 2006). Alle pH målingene ligger imidlertid innenfor anbefalt pH 6-9 for oppdrettsfisk (Erikson et al. 2006) Sublethal pH for brunørret (*Salmo trutta*) er vist på pH 4.5 (Butler & Day 1993), hvilket er betydeligere lavere pH enn hva fisken i kjøletanken ble eksponert for. Lav pH på 6,56-6,86 i dette tilfellet, vil dessuten gi beskyttende effekter mot ammoniakk ved økt andel av ammonium (se for øvrig avsnitt 2.1.3).

Frem til kl. 17.00 dag 2, økte CO<sub>2</sub> konsentrasjonen til 19 mg/l, før den avtok til 18 mg/l kl. 19.00. Årsaken til dette er usikkert. I utgangspunktet skulle en forventet en fortsatt konsentrasjons økning. Av målingene utført dag 1 ser vi imidlertid en økning i CO<sub>2</sub> frem til siste måling kl. 20.30 hvor konsentrasjonen var på 19 mg/l, se figur 20.



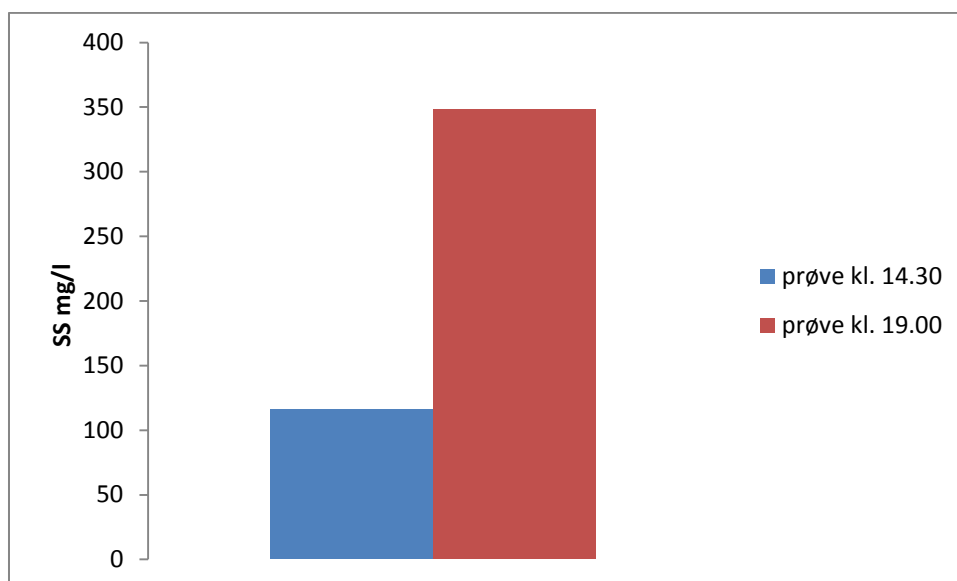
Figur 20. Utvikling av CO<sub>2</sub>, vist i mg/l, og pH i kjøletanken ved ulike måletidspunkt gjennom to produksjonsdager.

Det er funnet en lineær sammenheng ( $R^2=0,87$ ) mellom karbondioksid og tid for målingene utført dag 2, se figur 21. På grunn av et lite datasett med kun fire observasjoner vil sammenhengen være noe usikker. Regresjonsanalysen viser ingen signifikant ( $>0,05$ ) sammenheng mellom karbondioksidkonsentrasjon og tid.



**Figur 21. Konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> som funksjon av tid i kjøletanken, vist ved fire målinger utført dag 2.**

Suspendert stoff (SS) akkumuleres gjennom produksjonsdagen, se figur 22. Konsentrasjonen for første prøve kl. 14.30 var på 116 mg/l, dette ved slutten av første skift. SS konsentrasjonen for andre prøven kl.19.00 var på 348 mg/l som er en tredobling av konsentrasjonen av første prøve. Partiklene stammer sannsynligvis fra fisken i form av skjelltap, utskillelse av faeces og slim. SS kan ved høye konsentrasjoner irritere gjellestrukturene til laksen og føre til stress og redusere immunforsvaret som igjen fører til økt mottakelighet for sykdommer og osmotisk dysfunksjon (Bilotta & Brazier 2008). Laksefisk kan også påvirkes av SS ved at det forstyrrer deres naturlige bevegelse og migrasjon (Bilotta & Brazier 2008). Det er foreslått en øvre grenseverdi på 60 mg/l SS, da høyere konsentrasjoner enn dette kan medføre redusert appetitt og unnvikende atferd (Bilotta & Brazier 2008). Begge de registrerte SS konsentrasjonene ligger langt over den foreslåtte grenseverdien på 60mg/l. Dette er ikke i tråd med kriteriene for god vannkvalitet og fiskevelferd.



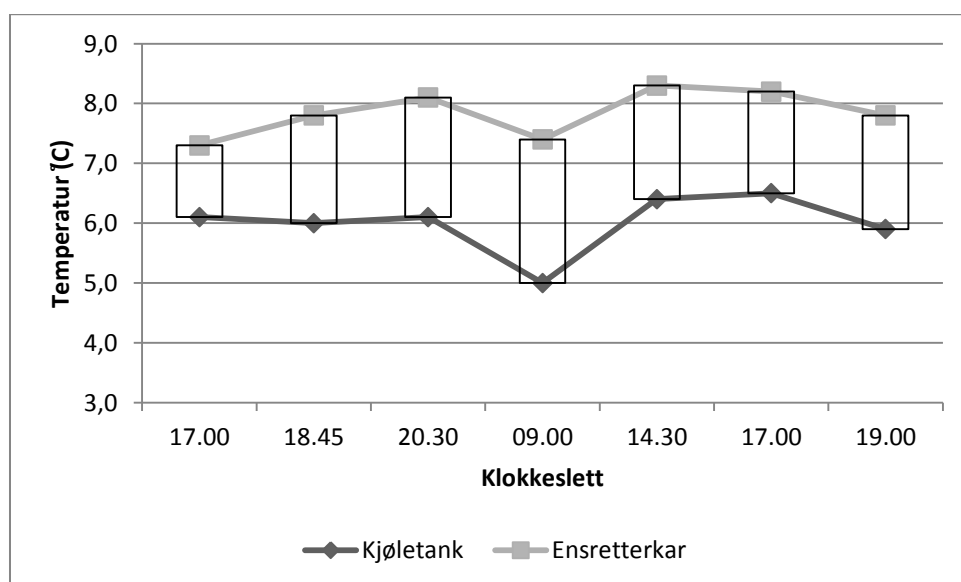
**Figur 22. Utvikling av innhold av suspendert stoff (SS) i kjøletanken vist ved to måletidspunkt gjennom en produksjonsdag, vist i mg/l.**

Generelt bør vannanalysen utføres snarest mulig etter prøven er hentet, da biologisk aktivitet i sjøvann ikke stopper ved prøveinnsamlingen. Videre er det anbefalt å rense filteret med destillert vann før veiing ved måling av SS i sjøvann (Grasshoff et al. 1999). Det ble ikke gjennomført en slik korreksjon under min analyse. Etter Brunstad & Martin (2011) er en korreksjonsfaktor på ca. 15 % nærliggende for justering av prøvene. Selv med en slik justering ligger konsentrasjonen av SS for begge prøvene høyere enn anbefalt grenseverdi. I og med at SS-analysen først ble foretatt 5 dager etter at prøvene var hentet, er gyldigheten av prøven noe usikker. Helst bør analysen gjennomføres innen 24 timer etter prøvetaking (Helsness 2005). Imidlertid gir analysen en indikasjon på hvordan vannkvaliteten forringes utover dagen. Visuelt var det mulig å se tydelig forskjell i farge på de to vannprøvene, der første prøve hadde en lys gul/brun farge, mens andre prøve var betydelig mørkere og mer rød/brun i fargen. På grunn av stadig økning i biomasse som passerer vil mengden av organisk materiale også øke i betydelig grad. Hovedkomponenten er trolig slim, som fører til skumming. Fargetonen på den siste vannprøven skyldes antageligvis akkumulert blod. Trolig kommer dette blodet av skader på enkeltfisk under pumping fra ventemerid til kjølekar. De høye SS verdiene i kjøletanken tyder sterkt på at vannutskiftingen i kjølekarer bør økes eller at partikkelfjerningsutstyr implementeres i den eksisterende løsningen. Det er imidlertid usikkert i hvilken grad SS vil påvirke fisken da oppholdstiden i kjøletanken per individ er forholdsvis kort. Mye tyder derimot på at så høye SS konsentrasjoner som ble registrert ved siste måling bør unngås. I den eksisterende løsningen på slakteriet blir skummet fjernet fra kjøletanken via en «skimmer». Ved tilsetning av hydrogenperoksid i kjøletanken, vil  $H_2O_2$  spaltes til oksygen

og vann. Når dette skjer dannes det små luftbobler i vannet, som har en negativ ladning. Den negative ladningen gjør at positivt ladede partikler bindes til luftboblene og boblene stiger til overflaten av kjøletanken. Hydrofobe partikler vil også føres mot den hydrofobe hinnen i vannskorpen for deretter og «skimmes» vekk fra karet (Brunstad & Harsvik 2011).

### Ensretterkar

Temperaturen i ensretterkaret varierte mellom 7,3 til 8,3 °C og ligger noe høyere enn temperaturen i kjøletanken, se figur 23. Det er tidligere blitt observert at laks som ble utsatt for høyere temperatur i ensretter, sammenlignet med temperaturen på levededkjøling, ble mer aktiv og at en slik temperaturøkning kan øke sannsynligheten for at laksen orienterer seg riktig vei ut av ensretteren. For laks som ble utsatt for lavere temperatur i ensretter enn i vannet de kom fra, gikk ensrettergraden ned (Brunstad & Harsvik 2011).



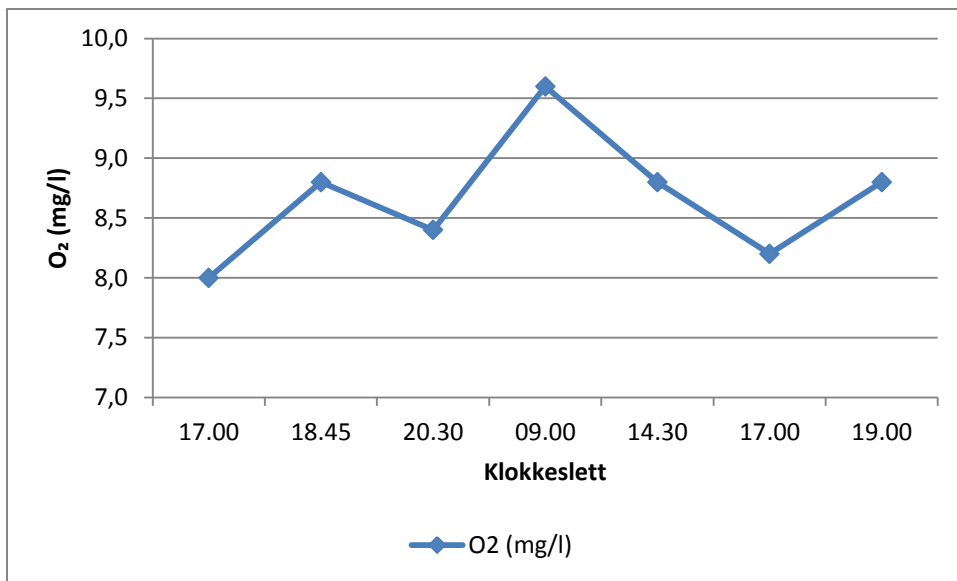
Figur 23. Temperaturvariasjon i ensretterkaret ved ulike måletidspunkt over to produksjonsdager, samt temperaturdifferansen mellom kjøletank og ensretterkar, vist i °C.

Temperaturdifferansen mellom ensretterkaret og kjøletanken varierer fra 1,2-2,4 °C, se tabell 6. Noe høyere vanntemperatur i ensretterkaret er gunstig for å gi fisken en «oppkvikker» etter nedkjølingen og antagelig en bedre evne til å ensrette seg (Brunstad & Harsvik 2011).

Tabell 6. Temperaturdifferansen ( $\Delta T$ ) mellom ensretterkar og kjøletanken ved ulike måletidspunkt over to produksjonsdager.

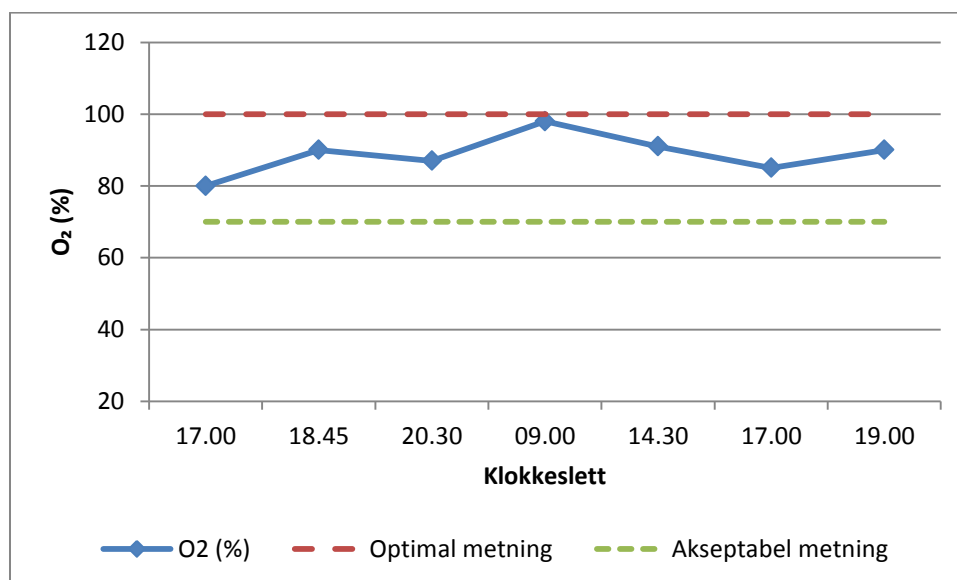
	17.00	18.45	20.30	09.00	14.30	17.00	19.00
$\Delta T$	1,2	1,8	2	2,4	1,9	1,7	1,9

Oksygenkonsentrasjonen i ensretterkaret var god og det ble ikke registrert store variasjoner gjennom de to prøvetakningsdagene. Oksygeninnholdet varierte fra 8,0- 9,6 mg/l, se figur 24.



Figur 24. Utvikling av oksygenkonsentrasjonen i ensretterkaret ved ulike måletidspunkt gjennom to produksjonsdager, vist i mg/l.

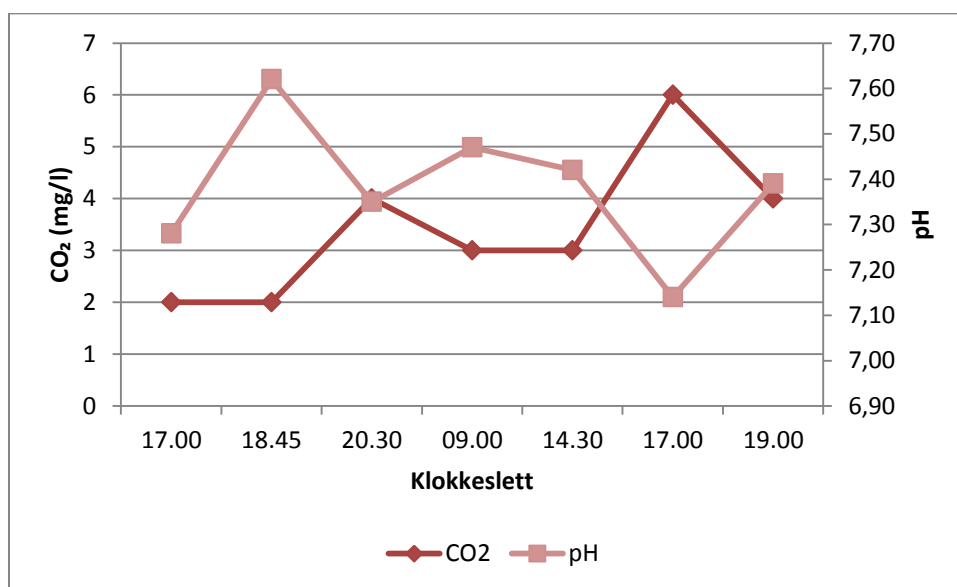
Metningsprosenten av oksygen varierte fra 80-98 % (figur 25) og ligger derfor innenfor anbefalte oksygennivåer mellom 80-100 % for god fiskevelferd (Rosten et al. 2011). Det vil ikke være fare for stress i fisk som følge av over- eller undermetning av oksygen i ensretterkaret.



Figur 25. Utvikling av oksygenmetning i ensretterkaret ved ulike måletidspunkt gjennom to produksjonsdager, vist i % metning.



De registrerte pH verdiene av ensretterkaret varierte fra 7,14-7,68, og stemmer godt med CO<sub>2</sub> målingene, se figur 26. Målingene tyder også her på akkumulering av karbondioksid utover produksjonsdagen (figur 26). Der konsentrasjonen første dagen økte fra 2 til 4 mg/l ved siste måling (kl. 20.30). Andre dagen lå CO<sub>2</sub> konsentrasjonen på 3 mg/l ved de to første målingene og økte så til 6 mg/l kl. 17.00, før den avtok til 4 mg/l, og viser derfor tilsvarende mønster som for målingene av kjøletanken. Den høye CO<sub>2</sub> konsentrasjonen registrert kl. 17.00 i ensretterkaret kan tyde på at vann fra kjøletanken har blitt blandet med vann i ensretterkaret. Imidlertid skjer det tidvis opphoping av fisk i ensretterkaret fordi enkelte fisk får problemer med å ensrette seg og stenger for utgangene ut av ensretteren. Når dette oppstår kan det bli nødvendig med manuell styring av fisken ut av ensretteren. Dersom dette var tilfelle ved målingen kl. 17.00 dag 2, ville det være en naturlig forklaring til den økte CO<sub>2</sub> konsentrasjonen ved dette tidspunktet. Det ble imidlertid ikke gjort noen visuelle registreringer av adferden til fisken ved de ulike målingstidspunktene.



Figur 26. . Utvikling av CO<sub>2</sub>, vist i mg/l, og pH i ensretterkaret ved ulike måletidspunkt gjennom to produksjonsdager.

### Generell diskusjon kjøletank

Vannmålingene viser redusert vannkvalitet i levendekjølingstanken som følge av resirkulering av vannet, høy fisketetthet og ujevn dosering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ujevn dosering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fører til oksygenovermetning av vannet. Høy fisketetthet og resirkulering av vannet fører til opphopning av karbondioksid som igjen senker pH i vannet. Sedatering av fisk krever god vannkvalitet for at prosessen ikke skal være stressende. Økt vannutskiftning og rensing er imidlertid svært kostnadskrevenne dersom en skal holde temperaturen i tanken lav og konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> på akseptabelt nivå. Stressnivået er høyt når fisken ankommer

kjøletanken og de er ofte utmattet etter trenging og pumping i lange rør, og har et høyt oksygenkonsum. Det kalde vannet i kjøletanken vil imidlertid redusere oksygenforbruket og øke løseligheten av oksygen i vannet. Det er grunnleggende krav om forsvarlig vannkvalitet ved sedatering jf. § 13 (Slakteriforeskriften 2006). Tilgjengelig oksygen, pH og forurensende stoffer (blod, slim m.m.) skal holdes på et forsvarlig nivå hele tiden. Alle registrerte pH verdiene og CO<sub>2</sub> konsentrasjonene i kjøletanken ligger innen for *tålbart* nivå for laksefisk. Det er heller ingen fare for kuldesjokk hos laksen da temperaturene i kjøletanken er relativt høye og dermed blir heller ikke  $\Delta T$  (temperatur differansen) mellom slaktemerd og kjøletank veldig stor. Oksygenmetningen og konsentrasjonen av SS møter imidlertid ikke krav om god vannkvalitet og dyrevelferd der konsentrasjonene til tider er ekstremt høye. Det vil imidlertid bli et diskusjonsspørsmål hva som er dyrevelferdsmessig akseptabelt, da dette er fisk som skal dø. Slakteprosessen vil uansett medføre noe ubehag og være litt stressende. Siden oppholdstiden i kjøletanken er relativt kort per enkeltfisk er det usikkert i hvilken grad disse registrerte konsentrasjonene i SS og oksygennivå vil påvirke fisken. Ved slakting av oppdrettsfisk må vurderingene baseres på at dyrene ikke skal lide i utrensmål (Slinde et al. 2013). Unødig belastning kan vurderes som belastninger som fører til høyt stressnivå og risiko for død før planlagt avliving (Slinde et al. 2013). Oksygen, pH og turbiditet er aktuelle måleparametere som kan måles relativt enkelt med forholdsvis rimelig utstyr. Imidlertid er det foreløpig ikke satt kriterier og anbefalte målverdier for hva som er velferdsmessig akseptabelt ved levendekjøling av fisk (Slinde et al. 2013).

### **Generell diskusjon ensretterkar**

Vannkvalitetsparameterne i ensretterkaret er generelt sett gode og imøtekommer kravet om god vannkvalitet og fiskevelferd. Sett i forhold til kjøletanken har vannet i ensretterkaret høyere temperatur, lavere CO<sub>2</sub> konsentrasjon og medfølgende høyere pH. Oksygenmetningen ligger nær opptil 100 % og vannet er ikke ved noen måletidspunkt overmettet.

Etter levendekjøling sendes fisken til ensretterkaret via en vannavskiller. En moderat mengde vann blir også ført inn med fisken fra vannavskilleren og det oppstår en blandingsone. Når to ulike vannkvaliteter blandes sammen oppstår det en ustabil vannkjemi i fra blandingsøyeblikket og en tid framover (Stefansson et al. 2005). Erfaring fra lukket transport med brønnbåt, viser at akutt ammoniakkforgiftning kan oppstå når ventilene åpnes for å ta inn friskt sjøvann med høyere pH enn transportvannet. Blandesonen som da oppstår mellom nytt og gammelt vann i brønnen kan føre til at ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) går over til ammoniakk (NH<sub>3</sub>). Giftigheten av ammoniakk øker ved synkende temperaturer (Rosten et al. 2004; Stefansson et

al. 2007), og temperaturøkningen på vannet i ensretterkaret sett i forholdet til temperaturen på vannet i kjøletanken er derfor gunstig. Mengden ammoniakk øker imidlertid ved stigende temperatur (Rosten 2004). Dette skriver seg fra fiskens metabolske aktivitet ved høye temperaturer og vil neppe være et problem med de registrerte temperaturene i ensretterkaret. Lav oksygenmetning (<70%) vil øke giftigheten for ammoniakk. For lukket brønnbåttransport er anbefalt oksygenkonsentrasjon satt til å ligge så nær 100 % metning som mulig (Rosten 2004). Gjennomsnittets oksygenmetning av målingene i enretterkaret er  $89 \% \pm 5,59$  og ligger godt over kritisk nivå for økt giftighet for ammoniakk. Konsentrasjonen av karbondioksid ligger under 10 mg/l for alle målingene. Dersom en holder en lavere pH (7) i ensretterkaret vil det muligens kunne avverge faren for akutt ammoniakkforgiftning ved å unngå en rask økning i pH og den kjemiske likevekten som forskyves mot økt konsentrasjon av den giftige u-ioniserte formen av TAN,  $\text{NH}_3$ . Til sammenligning viser erfaring fra lukket transport i sjøvann at pH i brønnvannet ofte faller til omkring 6,5, mens friskt sjøvann har en pH på 8,2 (Rosten et al. 2004). Ved inntak av friskt vann vil blandingssonen mellom friskt og gammelt vann ha en betydelig høyere pH økning enn hva som er tilfellet her.

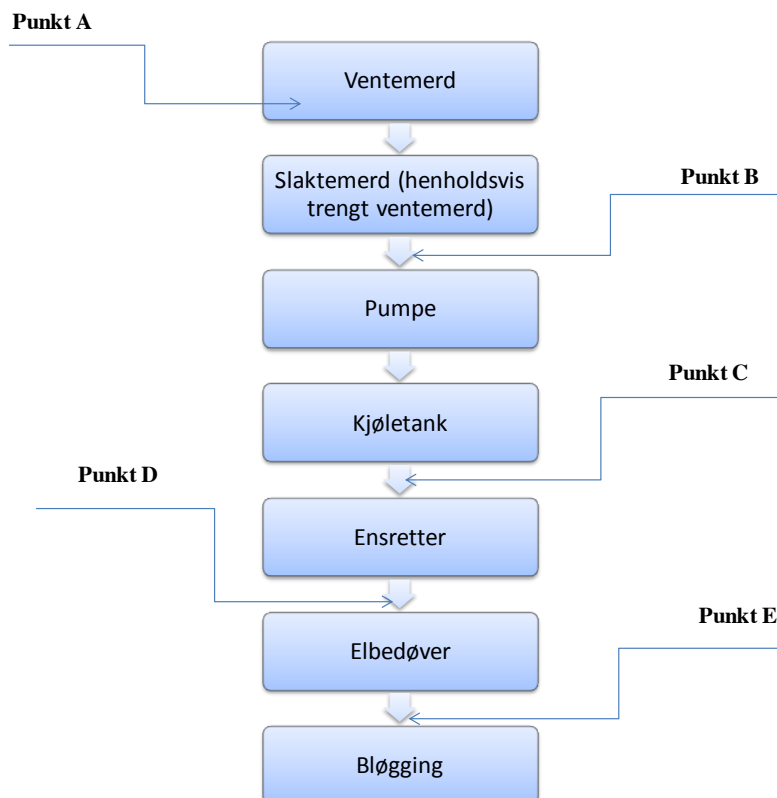
## 6 Forsøk II-Blodanalyser

For å få kunnskap om fiskens tilstand ved ulike stadier i slakteprosessen ble fisk tatt ut for fysiologisk undersøkelse på ulike punkter i slaktelinjen.

### 6.1 Material og metode

#### 6.1.1 Gjennomføring

Forsøksfisken var Atlantisk laks (*Salmo Salar*) hentet fra Bremnes Seashore AS lakseslakteri på Bømlo 20. juni 2013. Det ble til sammen plukket ut 20 fisk helt vilkårlig med snittvekt på 5,5 kg. Forsøksfisken ble hentet ut av slaktelinjen ved fem ulike punkter (Figur 27), der fire fisk ble tatt ut per punkt. Ved punkt A, ble fisken hentet med håv fra ventemerd. Merden var delvis trengt for at uttak skulle være mulig. Ved punkt B, ble fisken hentet med håv fra slaktemerd (trengt ventemerd) like ved fiskepumpa. Ved punkt C ble fisken tatt ut ved utløpet av kjøletanken på vei inn i ensretterkaret. Ved punkt D, ble fisken tatt ut på transportbåndet etter ensretterkaret, før bedøver. Ved punkt E, ble fisken tatt ut etter elektrisk bedøver. For hvert punkt ble fisken tatt ut en og en og avlivet ved slag til hodet.



Figur 27. Illustrasjon over hvor i slaktelinjen det ble tatt ut prøveuttak av fisk til blodanalyse og rigorutvikling.

Temperatur og pH på vannet, samt innhold av karbondioksid og oksygen ble målt noen timer før oppstart av forsøket (tabell 7). De samme parameterne ble igjen målt i kjøletanken og

ensretterkaret under en time etter endt forsøk (tabell 8). Målingene ble utført i forbindelse med Forsøk I Vannkvalitet, som beskrevet tidligere.

**Tabell 7. Vannkvalitetsmålinger utført kl 09.00 og tidspunkt ved avliving.**

Prøveuttak	Klokkeslett ved avliving	Temperatur (C°)	O <sub>2</sub> (mg/l)	O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (mg/l)	pH
Ventemerdd	11:15	12,9	8,9	102	1	8,03
Slaktemerd	11:45	13,0	7,4	85	1	7,91
Kjøletank	12:45	5,0	27,1	259	11	6,86
Ensretterkar	13:15	7,4	9,6	98	3	7,47
Elbedøver	13:45					

**Tabell 8. Vannkvalitetsmålinger over kjøletank og ensretterkar kl 14.30, etter endt blodprøvetaking.**

Prøveuttak	Temperatur (C°)	O <sub>2</sub> (mg/l)	O <sub>2</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (mg/l)	pH
Kjøletank	6,4	14,2	141	14	6,68
Ensretterkar	8,3	8,8	91	3	7,42

Blodprøvene for punkt A og B ble utført på merdkanten, mens de for punktene C, D og E ble utført like utenfor slakteriet. På denne måten ble det sikret at minst mulig tid gikk med mellom avliving og blodprøver. Det ble tatt blodprøver av hver enkelt fisk med VACUETTE 3 ml Lithium Heparinrør (greiner bio-one, Kremsmünster, Østerrike). Metoden for blodprøvetaking var punktering av caudal vene fra lateral side til fisken. Blodprøvene ble deretter satt i et isoporbeleg fylt med is til alle blodprøvene for uttaket var utført. Etter at alle blodprøvene var tatt for punkt A, ble prøvene tatt med inn for analyse. Under analyse av første gruppe ble blodprøver tatt av neste gruppe. På den måten ble blodprøvetaking og analyse utført fortløpende for alle uttakspunktene.

Direkte etter blodprøvetaking ble fisken lagt i isoporkasser med is (2 fisk i hver kasse). Isen ble hentet på anlegget. Kassene ble merket og satt på kjølelager med temperatur på 4°C.

#### **Måling av kjernetemperatur i fisk**

Kjernetemperaturen i fisken ble målt med TENMA 72-7715 stikktermometer (Tenma test equipment, Sprigboro, Ohio, USA) like etter avliving og blodprøve.

#### **6.1.2 Analyse av blodprøver**

Blodprøvene ble analysert ved hjelp av i-STAT 1 analyser (Abbott Point og Care Inc, Princeton, New Jersey, USA), og i-STAT EC8+ kassetter. Blod ble hentet ut av heparinrørene

med Biohit proline 200-1000 µl pipette (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finland) og forsiktig ført inn i prøvebrønnen i EC8 + kassetten. Følgene parametere ble analysert:

- Hematokrit (Hct, % røde blodceller i blodet)
- Hemoglobin konsentrasjon (Hb, g/L);
- Urea (mmol/L);
- Plasma glukose konsentrasjon (Glu, mmol/L);
- Klorion konsentrasjon (Cl<sup>-</sup>, mmol/L);
- Natriumion konsentrasjon (Na<sup>+</sup>, mmol/L);
- Kaliumion konsentrasjon (K<sup>+</sup>, mmol/L);
- pH
- Partialtrykk av karbondioksid (pCO<sub>2</sub>, kPa);
- Bikarbonat konsentrasjon (HCO<sub>3</sub>, mmol/L);
- Total karbondioksid konsentrasjon (TCO<sub>2</sub>, mmol/L);
- Anion Gap (AnGap, mmol/L);
- Base Excess/baseoverskudd (BE, mmol/L);

### 6.1.3 Måleprinsipper

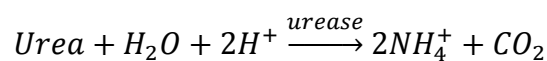
#### Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>

I-STAT maskinen måler konsentrasjonen av Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> ved ioneselektiv elektrode potensiometri. Konsentrasjonene beregnes fra det målte potensialet gjennom Nernst-ligningen (CTI-Scheets 2013b; CTI-Scheets 2013g; CTI-Scheets 2013h).

#### Urea

Urea er først hydrolysert til ammoniumioner i en reaksjon katalysert av enzymet urease.

*Ligning 6*



Ammonium-ioner måles potensiometrisk ved hjelp av en inonselektiv elektrode.

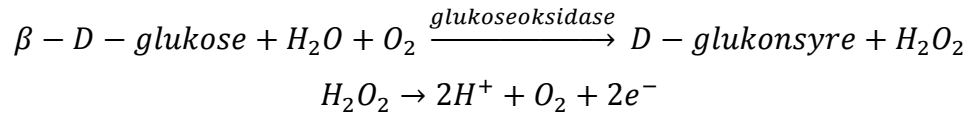
Konsentrasjonen av urea blir beregnet fra det målte potensialet gjennom Nernst-ligningen (CTI-Scheets 2013a).

#### Glukose

Glukose måles amperometrisk. Oksidasjon av glukose, katalysert av enzymet glukoseoksidase, produserer hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Det frigjorte hydrogenperoksidet blir

oksidert ved en elektrode for å produsere en elektrisk strøm som er proporsjonal med prøvens glukosekonsentrasjon (CTI-Scheets 2013c).

*Ligning 7*



### **Hematokrit**

Hematokrit bestemmes konduktometrisk. Når den målte konduktivitet (ledningsevnen) er korrigeret i forhold til elektrolyttkonsentrasjonen er den omvendt proporsjonal med hematokrit (CTI-Scheets 2013d).

### **Hemoglobin**

i-STAT systemet gir et beregnet hemoglobinresultat som bestemmes som følger:

*Ligning 8*

$$\text{hemoglobin g/dl} = \text{hematokrit (\%PCV)} \times 0,34$$

*Ligning 9*

$$\text{hemoglobin g/dl} = \text{hematokrit (desimalbrøk)} \times 34$$

Hemoglobin blir i i-STAT systemet beregnet ut fra målt hematokrit, som forutsetter en normal MCHC (CTI-Scheets 2013d). MCHC (middelcellehemoglobinkonsentrasjon) er gjennomsnittskonsentrasjonen av hemoglobin i de røde blodcellene, og har hos et voksent menneske et referanseområde 32-36 g/100 ml (Evensen 2009, 13. februar). Referanseområdet hos voksen, frisk laks er funnet å ligge på 19,4-21,7 g/100ml (Sandnes et al. 1988). Hemoglobin beregningen utført i i-STAT blir derfor feil. Justering for dette ble gjort ved å multiplisere målt hematokrit med snittet for referanseområdet til MCHC hos laks med følgende justering av *Ligning 8*:

*Ligning 10*

$$\text{hemoglobin g/dl} = \text{hematokrit (\%PCV)} \times 0,2055$$

### **PH og PCO<sub>2</sub>**

PH og PCO<sub>2</sub> måles ved hjelp av direkte potentiometri. Ved beregning av resultater for pH og PCO<sub>2</sub> relateres konsentrasjonen til potential ved hjelp av Nernst-ligningen. PH og PCO<sub>2</sub> er en temperaturavhengig variabel og resultatet rapporteres i i-STAT ved 37 °C.

Temperaturkorreksjon ble kalkulert etter følgende ligninger (CTI-Scheets 2013e; CTI-Scheets 2013f):

*Ligning 11*

$$pH(T_p) = pH - 0,0147(T_p - 37) + 0,0065(7,4 - pH)(T_p - 37)$$

*Ligning 12*

$$PCO_2(T_p) = PCO_2 \times 10^{0,019(T_p - 37)}$$

Der  $T_p$  = temperaturen til fisken

### **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, TCO<sub>2</sub> og BE**

Når pH og PCO<sub>2</sub> måles, blir bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), total kulldioksid TCO<sub>2</sub> og Baseoverskuddet (BE) beregnet etter følgende ligninger:

Baseoverskuddet (BE) (CTI-Scheets 2013e):

*Ligning 13*

$$BE_{ecf} = HCO_3 - 24,8 + 16,2(pH - 7,4)$$

*Ligning 14*

$$BE_b = (1 - 0,014 * Hb) * [HCO_3 - 24,8 + (1,43 * Hb + 7,7) * (pH - 7,4)]$$

Bikarbonatoverskudd eller – underskudd kalles henholdsvis metabolsk alkalose og metabolsk acidose. Baseoverskuddet eller Base excess (BE) brukes til å vurdere det metabolske bidraget i en syre-baseforstyrrelse. Bikarbonat er i større grad påvirket av respirasjonen enn hva tilfellet er for BE. BE regnes derfor som et metabolskparameter og den målte verdien angis som et relativt overskudd (positivverdi) eller underskudd (negativverdi) i forhold til kroppens normale mengder. En positiv BE verdi indikerer underskudd på syrer, mens en negativ BE verdi indikerer overskudd av syrer (LaboratorieHåndBok-Ahus)

Bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (CTI-Scheets 2013e):

*Ligning 15*

$$\log HCO_3 = pH + \log PCO_2 - 7,608$$



Total-CO<sub>2</sub> (TCO<sub>2</sub>) bestemmes ut fra de målte og rapporterte verdiene av pH og PCO<sub>2</sub> i følge en forenklet og standardisert form av Henderson-Hasselbalch-ligningen (CTI-Scheets 2013i):

*Ligning 16*

$$TCO_2 = HCO_3 + 0,03PCO_2$$

Nye verdier av PCO<sub>2</sub> og pH etter temperaturkorregering ble satt inn i de overnevnte ligningene. Ved beregning av HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ble PCO<sub>2</sub> konvertert fra kPa til mmHg ved å dividere resultat på 0,133.

### **Aniongapet (AnGap)**

Ved bruk av EC8+ kassett blir aniongapet beregnet av i-STAT systemet etter følgende ligning (CTI-Scheets 2013e):

*Ligning 17*

$$AnGap = (Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)$$

Anion Gap er betegnelsen som beskriver forskjellen i plasmakonsentrasjonen mellom summen av målt kationer og anioner (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>) - (Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (se *ligning 17*). Dersom alle kationer og anioner i plasma ses i forhold til hverandre vil resultatet være elektrisk nøytralt. Imidlertid er det bare de viktigste elektrolyttene natrium, kalium, klorid og bikarbonat som rutinemessig måles i klinisk laboratorium, derfor vil en ubalanse oppstå på grunn av ukomplett måling (Lolekha & Lolekha 1983). Ved metabolsk acidose vil anion gapet øke dersom det skyldes opphopning av syrer i blodet (Opdahl 2009, 13. februar).

## **6.2 Databehandling**

Alle utregninger og dataanalyse ble utført i Excel (Microsoft 2010), hvor figurer og grafer er laget. Variansanalyse en faktor (ANOVA) ble benyttet til å detektere forskjeller mellom grupper. Student T-Test to utvalg med antatt lik varians ble brukt for uparet sammenligning av de ulike gruppene. Bonferroni-korreksjon ble benyttet for å skille hvilken forskjell som ga forkastning. Signifikans nivå ble satt til P≤0,05.

## **6.3 Resultat og Diskusjon**

Kjernetemperaturen til fisken for de forskjellige uttakene er vist i tabell 9. Fisk er vekselvarme dyr og kroppstemperaturen styres i hovedsak av omgivelsene rundt (Beitinger et

al. 2000). Ettersom kroppstemperaturen til fisk normalt ligger 0,1 til 1,0 °C høyere enn temperaturen på vannet rundt (Dean 1976; Gunn 1942), var kjernetemperaturen målt hos laksen fra ventemerdene omtrent tilsvarende temperaturen målt i sjøen. Temperaturen i ventemerdene denne dagen var på ~13 °C (tabell 7), og ligger noe høyere enn temperaturen målt i fisken som var på ~12 °C. Etter levendekjølingen ble kroppstemperaturen redusert til 7 °C ± 1 °C. Temperaturen i kjøletanken denne dagen var på 5 °C før oppstart av forsøket og 6,4 °C etter forsøket var avsluttet (tabell 7 og 8).

**Tabell 9. Kjernetemperatur i fisk (°C), vist som gjennomsnitt ± standardavvik for de ulike gruppene.**

	Ventemerd	Slaktemerd	Kjøletank	Etter ensretter	Etter bedøver
Kjernetemperatur	~12 °C	~12 °C	7 °C ± 1 °C	7 °C ± 1 °C	7 °C ± 1 °C

Resultat av blodanalysen er vist i tabell 10. Høyest TCO<sub>2</sub> konsentrasjon ble målt for laks fra kjøletanken med gjennomsnitt 7,68 ± 0,54 mmol/l og det ble funnet en signifikant forskjell i TCO<sub>2</sub> konsentrasjonen for denne gruppen sammenlignet med gruppene fra ventemerd og trengt ventemerd, se figur 31. Det var ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene fra ventemerd og trengt ventemerd. Signifikant forskjell ble funnet for gruppene etter ensretter og etter bedøver sammenlignet med gruppene ventemerd og trengt ventemerd, der konsentrasjonen av TCO<sub>2</sub> lå høyere for gruppene etter ensretter og etter bedøver sammenlignet med de to ventemerdgruppene (figur 31). Ingen signifikant forskjell ble funnet mellom gruppene fra kjøletank, ensretter og etter bedøver. Konsentrasjonen av PCO<sub>2</sub> var signifikant forskjellig for gruppene; fra kjøletank, etter ensretterkar og etter bedøver sammenlignet med gruppene fra ventemerd og trengt ventemerd (figur 31). Høyeste konsentrasjonen ble funnet for gruppen fra kjøletank som hadde en gjennomsnittskonsentrasjon på 1,86 ± 0,27 mmol/l (figur 31 og tabell 10). Samme gruppe hadde også høyest gjennomsnittsverdi av glukose i blodet, men det ble imidlertid ikke funnet noen signifikant forskjell mellom gruppene for denne parameteren, se figur 28 og tabell 10.

Natriumkonsentrasjonen lå høyest for gruppen fra kjøletank og det ble funnet signifikant forskjell i konsentrasjon av natrium mellom gruppene trengt ventemerd og kjøletank og mellom kjøletank og etter bedøver, se figur 29. Lavest blod-pH ble registrert for gruppen tatt etter bedøver som hadde gjennomsnitts blod-pH på 7,32 ± 0,02, mens høyst blod-pH ble funnet for gruppen hentet fra trengt ventemerd og etter ensretterkar, se figur 32 og tabell 10. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i blod-pH for de ulike gruppene.

Kaliumkonsentrasjonen var lavest for gruppen fra ensretterkar og høyest for gruppen fra trengt ventemerde, og forskjellen var signifikant mellom disse to gruppene i henhold til  $K^+$  konsentrasjon, se figur 30. I konsentrasjonen av bikarbonat ble det funnet signifikant forskjell hos fisk tatt fra kjøletank og ensretterkar i forhold til fisk tatt fra ventemerde og trengt ventemerde, der konsentrasjonen lå høyest for de to førstnevnte gruppene, se figur 31. Videre ble det funnet signifikant forskjell i konsentrasjon av  $HCO_3^-$  for fisk tatt etter bedøvelse sammenlignet med fisk tatt fra trengt ventemerde. Høyest konsentrasjon av bikarbonat var hos fisk fra kjøletank ( $7,63 \pm 0,53$ ) og lavest hos fisk fra trengt ventemerde ( $4 \pm 1,01$ ). Av de beregnede verdiene av base excess (BE), er underskuddet størst for fisk fra trengt ventemerde og minst hos fisk hentet etter ensretterkar se figur 33 og tabell 10. Det var ingen signifikant forskjell mellom noen av gruppene. Ingen signifikant forskjell ble funnet for konsentrasjonen av hematokrit og hemoglobin, se figur 34 og 35.

Det var ingen av blodprøvene som viste noen verdi ( $\diamond$ ) på blodparameteren Anion Gap. Symbolet  $\diamond$  indikerer at resultatet av testen er avhengig av et resultat markert med enten  $>$  eller  $<$ . Under blodanalysen av gruppen fra kjøletanken ble den andre blodprøven ødelagt, ved at luft kom inn i prøven.  $Cl^-$  verdiene lå høyere enn rapporteringsskalaen ( $>140$  mmol/l) for alle blodanalysene bortsett fra første prøve i fra ventemerde og fjerde prøve i fra kjøletank som ikke ga noen resultat på  $Cl^-$  innhold. For urea lå alle blodanalysene under rapporteringsskalaen ( $<1,0$  mmol/l) utenom første prøve i fra ventemerde og fjerde prøve i fra kjøletank som ikke viste noen resultat.

		Ventemerdd	Ventemerdd trengt	Kjøletank	Ensretterkar	Etter bedøver
<b>Test</b>	Måleenhet					
<b>Na<sup>+</sup></b>	mmol/L	164,5 ± 9,4 (4)	163 ± 3,3 (4)	174,7 ± 4,6 (3)	166,2 ± 2,9 (4)	161,7 ± 2,4 (4)
<b>K<sup>+</sup></b>	mmol/L	4,3 ± 0,6 (4)	4,5 ± 0,9 (4)	3,1 ± 1,1 (2)	2,6* ± 0,7 (4)	3,5 ± 0,5 (4)
<b>Cl<sup>-</sup></b>	mmol/L	>140 (3)	>140 (4)	>140 (2)	>140 (4)	>140 (4)
<b>Clu</b>	mmol/L	5,9 ± 1,1 (4)	5,7 ± 0,7 (4)	6,9 ± 0,4 (3)	6,3 ± 1,5 (4)	5,4 ± 0,7 (4)
<b>pH</b>		7,44 ± 0,09 (4)	7,477 ± 0,18 (4)	7,347 ± 0,04 (3)	7,446 ± 0,02 (4)	7,32 ± 0,02 (4)
<b>PCO<sub>2</sub></b>	kPa	0,94 ± 0,24 (4)	0,73 ± 0,24 (4)	1,86 ± 0,27 (3)	1,42 ± 0,11 (4)	1,71 ± 0,22 (4)
<b>Urea</b>	mmol/L	< 1,0 (3)	< 1,0 (4)	< 1,0 (2)	< 1,0 (4)	< 1,0 (4)
<b>Hct</b>	% PCV	33 ± 5,3 (4)	31,2 ± 2,7 (4)	34 ± 11,3 (3)	32,5 ± 3,1 (4)	32,75 ± 2,4 (4)
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	mmol/L	4,73 ± 0,88 (4)	4 ± 1,01 (4)	7,63 ± 0,53 (3)	7,4 ± 0,62 (4)	6,64 ± 0,81 (4)
<b>TCO<sub>2</sub></b>	mmol/L	4,76 ± 0,88 (4)	4 ± 1,01 (4)	7,68 ± 0,54 (3)	7,41 ± 0,62 (4)	6,69 ± 0,82 (4)
<b>BE</b>	mmol/L	-19,5 ± 1,92 (4)	-19,75 ± 3,78 (4)	-18 ± 1 (3)	-16,75 ± 0,96 (4)	-19,5 ± 1 (4)
<b>AnGa</b>	mmol/L	<	<	<	<	<
<b>p</b>						
<b>Hb</b>	g/L	68 ± 11 (4)	64 ± 6 (4)	70 ± 23 (2)	67 ± 6 (4)	67 ± 5 (4)

Tabell 10. Resultat av blodanalysen, vist som gjennomsnitt ± SD av de ulike parameterne for hvert prøveuttak. < under nedre grense for rapporteringsskalaen, > over øvre grense for rapporteringsskalaen, <> resultatet for testen er avhengig av resultat av test markert med > eller <, (n) antall fisk.

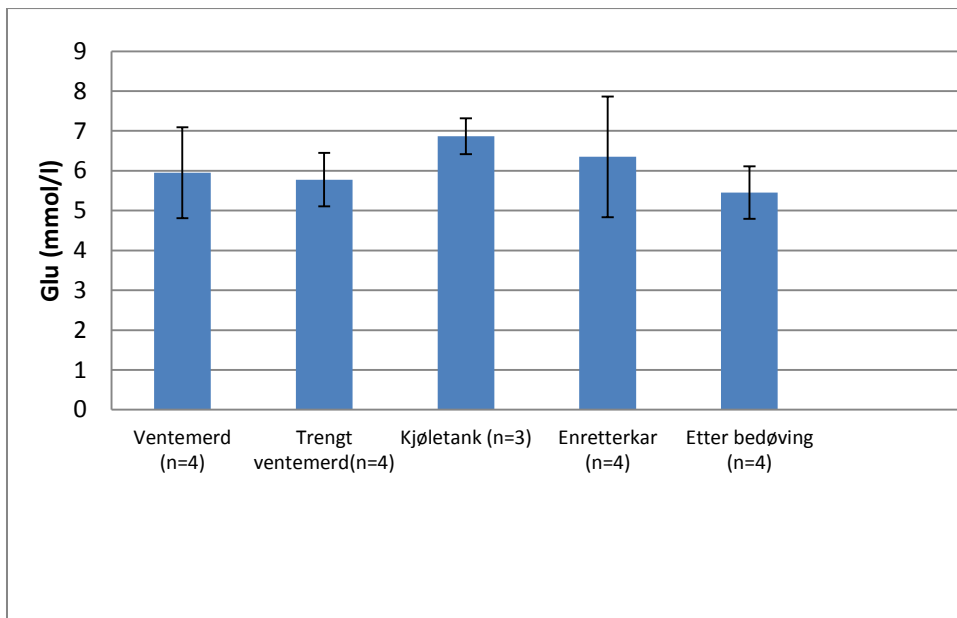
For å kunne bestemme anion gapet må verdien av kationene Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup> og anionene Cl<sup>-</sup> og HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> være kjent. Blodanalysen i dette forsøket viste på alle prøvene en Cl<sup>-</sup> konsentrasjon på > 140 mmol/l, og ligger derfor over rapporteringsskalaen. Anion gapet vil derfor ikke være mulig å beregne etter *ligning 17*.

Konsentrasjonen av urea ligger under rapporteringsskalaen. Fisk i sjøvann produserer relativt små og konsentrerte mengder urea, som kompensasjon for vanntapet til omgivelsene (McWilliams 1992), og høye ureaverdier var heller ikke ventet.

## Glukose

Det var ingen signifikant forskjell i glukosekonsentrasjonen mellom gruppene, se figur 28.

Høyest glukosekonsentrasjon ble målt hos fisk fra kjøletank med gjennomsnittskonsentrasjon på  $6,9 \pm 0,4$ , se figur 28 og tabell 10. Glukose er en av de mest anvendte og viktigste indikatorene på stress hos fisk (Gatica et al. 2010). Under stress vil fisken aktivere energikrevende prosesser og glukose som er lagret som glykogen i kroppen frigjøres og blodglukoseverdiene vil etter hvert stige (Mejdell et al. 2009). Ved stress viser laksefisk kun en moderat økning i glukose. En økning på 25 % fra basalnivå kan ventes etter stress hos denne arten. Blodglukosenivået hos ustresset laksefisk ligger rundt 5,5 mmol/l (Evensen et al. 2008). Laksen fra kjøletank viste en økning i blodglukoseverdi på 1,37 mmol/l fra basalnivået (5,5 mmol/l), som tilsvarer en økning på 25 %. Laksen var sultet, svingning i glukosenivå i blodet på grunn av fødeinntak har derfor ikke påvirket resultatet. Glukoseverdien ligger imidlertid langt under 10-12 mmol/l, som er glukosenivå ved betydelig stress (Evensen et al. 2008). Alle blodprøvene uten om de tatt av fisk etter bedøving, hadde et høyere glukosenivå enn 5,5 mmol/l (figur 28). Dette indikerer økt muskelaktivitet også for fisk i ventemerdene. Glukosereservene kan etter langvarig muskelaktivitet (utmattelse) bli oppbrukt og nivåene lavere (Mejdell et al. 2009), og kan være forklaringen på lavere glukosenivå for fisk tatt etter bedøving, disse hadde glukosenivå (5,45 mmol/l) tilsvarende ustresset laksefisk.



Figur 28. Forskjellen i glukoseinnhold i blod i mmol/l for de ulike gruppene, vist som gj. snitt  $\pm$  SD.

## Natrium og Klorid

Det ble funnet en signifikant forskjell i  $\text{Na}^+$  konsentrasjonen mellom gruppene; etter kjøletank og trengt ventemerid, og mellom gruppene; etter kjøletank og etter bedøver, se figur 29.

Konsentrasjonen av  $\text{Na}^+$  var høyest hos laksen fra kjøletanken. Ingen andre signifikante forskjeller ble funnet mellom gruppene med henhold til konsentrasjon av natrium i plasma.

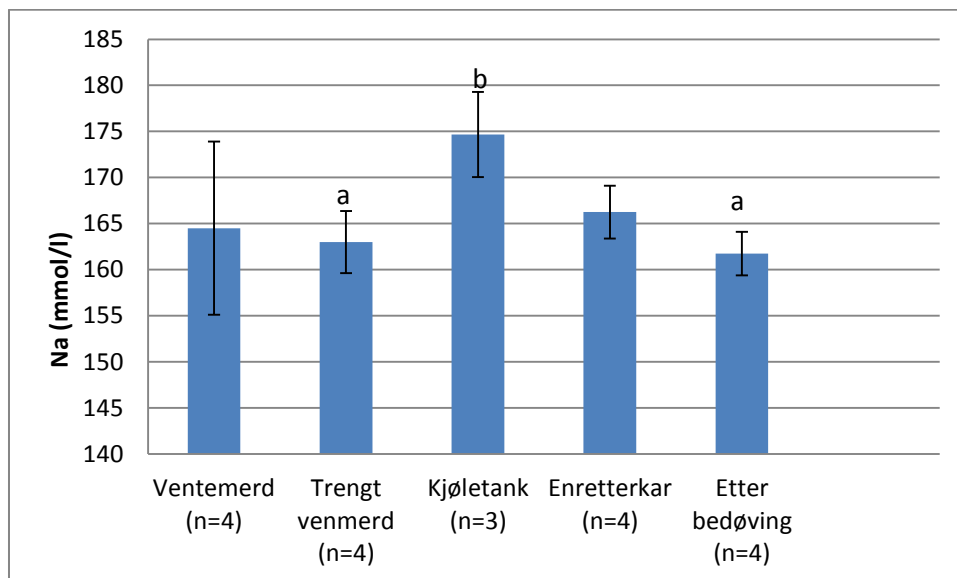
Stress hos fisk kan medføre forstyrrelser i elektrolyttbalansen (McDonald & Milligan 1997).

Det er blitt rapportert at fisk eksponert for surt vann (ferskvann) får redusert konsentrasjon av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  i plasma (McDonald & Wood 1981; Ye 1986), mens det motsatte skjer her, at fisk eksponert for lavest pH har høyest konsentrasjon av natrium i plasma. Imidlertid ble de rapporterte forholdene utført på fisk i ferskvann, mens det i dette forsøket ble utført i saltvann.

Redding og Schreck (1983), rapporterte derimot om at elektrolyttkonsentrasjonen økte under stress i sjøvann, mens den generelt ble redusert under stress i ferskvann og at forandringer i gjellepermeabiliteten under stress kan føre til at fisk i saltvann mister vann, mens det motsatte skjer i ferskvann (Redding & Schreck 1983). Dette støttes oppunder av McWilliams (1992) som skriver at graden av stress kan bestemmes ved å måle nivåene av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  i plasma, hvor nivåene øker hos sjøvannsfisk, mens de reduseres hos ferskvannsfisk. Årsaken til denne forskjellen mellom ferskvannsfisk og sjøvannsfisk er at stress påvirker den normale ionetransportmekanismen (McWilliams 1992). Gatica et al. (2010) rapporterte også om økt konsentrasjon av natrium og klorid i fisk under transport og håndtering. Muligens kan derfor den økte konsentrasjonen av natrium registrert hos fisken fra kjøletanken tilskrives stress.

Dessverre kan ikke denne forklaringen underbygges eller avkreftes ved å se på resultatet av kloridverdiene. Imidlertid lå alle kloridverdiene høyere enn rapporteringsskalaen, hvilket tyder på høye konsentrasjoner hos alle gruppene. Til sammenligning lå verdiene av  $\text{Cl}^-$  til voksen Atlantisk laks eksponert for ulike tettheter i 35 dager på;  $131,9 \pm 3,3$  (lav tetthet),  $134,7 \pm 8,4$  (middels tetthet),  $130,2 \pm 6,6$  (høy tetthet) (Kjartansson et al. 1988), der nivåene ble funnet å ligge godt innenfor verdiskalaen for laksefisk i saltvann. Det er usikkert hvor mye over rapporteringsskalaen  $\text{Cl}^-$  nivåene ligger hos de ulike gruppene i dette forsøket. Imidlertid representerer en kloridverdi på 140 mmol/l en betydelig høyere verdi enn hva som er rapportert av Kjartansson et al, (1988). For havabbor (*Dicentrarchus labrax* L.) er derimot referanseverdien til  $\text{Cl}^-$  på 147,3 -193,6 mmol/l, mens  $\text{Na}^+$  har en referanseverdi på 171,2-194,0 mmol/l (Marco 2001). Etter McWilliams (1992) ligger konsentrasjonen av  $\text{Cl}^-$  og  $\text{Na}^+$  i blodet hos laks i saltvann på henholdsvis 167mmol/l og 175 mmol/l. Derav vil muligens en  $\text{Cl}^- > 140$  mmol ligge innenfor referanseområde til laksefisk. Denne natriumkonsentrasjonen er

noe høyere enn hva som ble registrert i dette forsøket, hvor bare laks fra kjøletanken nærmet seg denne verdien. Imidlertid er de nærliggende verdiene Kjartansson et al. (1988) fant for Atlantisk laks. Ved oppstart av forsøket lå  $\text{Na}^+$  konsentrasjonen på  $164,2 \pm 6,6$  for alle gruppene (lav-, middels- og høy tetthet). Men etter 143 eksponeringsdager var  $\text{Na}^+$  konsentrasjonen på  $164,8 \pm 6,3$  mmol/l for gruppen eksponert for lav tetthet og  $175,5 \pm 10,2$  for gruppen eksponert for høy tetthet (Kjartansson et al. 1988). Verdiene ble funnet å ligge innenfor referanseverdien og årsaken til økning i konsentrasjon ble ikke tilskrevet stress. Stress vil normalt føre til økt plasma natrium nivå hos fisk holdt i saltvann (Eddy 1981; Fivelstad et al. 1998) og noe økt nivå for gruppen i kjøletank sammenlignet med gruppen fra trengt ventemerdd kan derfor være et resultat av stress.



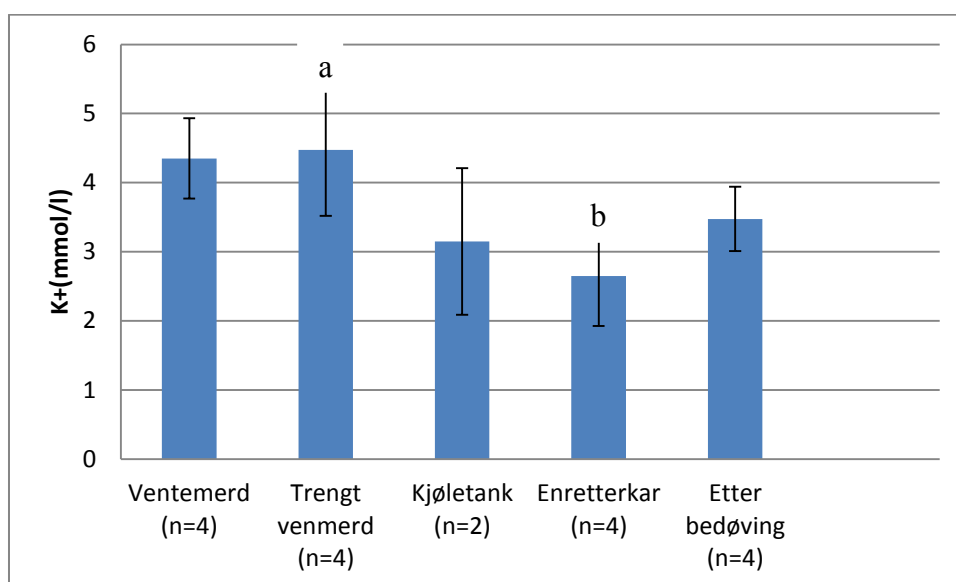
Figur 29. Forskjell i konsentrasjonen av  $\text{Na}^+$  (mmol/l) i blod for de ulike gruppene. Vist som gj.snitt  $\pm$ SD. Ulike bokstaver betyr statistiske forskjeller.

### Kalium

Den eneste signifikante forskjellen i kaliumkonsentrasjonen funnet mellom gruppene var mellom trengt ventemerdd og laks tatt ut etter ensretterkar, hvor konsentrasjonen synker fra 4,5 mmol/l (trengt ventemerdd) til 2,6 mmol/l (etter ensretterkar), se figur 30.

Tidligere studier av Redding og Schreck (1983) viste en forhøyet plasma  $\text{K}^+$  som følge av stress hos fisk (Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*), både i ferskvann og i sjøvann. Forfatterne mente at ettersom fiskeblodet blir surere som følge av laktatproduksjon og økt  $\text{CO}_2$ , på grunn av stressanstrengelse, kan dette skiftet føre til en økning i  $\text{K}^+$  i plasma på grunn av  $\text{K}^+-\text{H}^+$  utvekslingsmekanismen mellom intra- og ekstracellulærvæske. Kalium konsentrasjonen i dette forsøket var høyest for gruppene ventemerdd og trengt ventemerdd.

Dette er de gruppene som antas å ha lavest stressnivå hos fisken. Kalium konsentrasjonen sank fra 4,47 (ventemerdd trengt) til 3,15 (kjøletank), mens den økte fra 2,65 (etter enretterkar) til 3,47 (etter bedøver), se figur 30 og tabell 10. De registrerte kaliumnivåene for de ulike gruppene ligger imidlertid innenfor referanseverdien for havabbor som er på 1,54-5.34 mmol/l (Marco 2001), men om denne referanseverdien er representativ for voksen Atlantisk laks er usikkert. Carey & McCormick (1998) fant at plasma  $K^+$  hos pre-smolt og smolt utsatt for stressorer, falt fra opprinnelig nivå etter 3 timer eksponering, ble så gjenopprettet etter 24 timer eksponering og avtok deretter til deres laveste konsentrasjon etter 48 timer eksponering. Imidlertid ble samme forandring registrert for kontroll (ustresset) gruppene. Plasma  $K^+$  hos smolt var ved oppstart  $3.1 \pm 0,12$  mmol/l og lik for både kontrollgruppen og gruppen eksponert for stress, mens nivået etter 24 timer var  $0,9 \pm 0,06$  hos kontroll gruppen og  $0,7 \pm 0,05$  hos stresset smolt (Carey & McCormick 1998). Det er også blitt rapportert om økt konsentrasjon av  $K^+$  i plasma hos Atlantisk laks eksponert for høye oksygenkonsentrasjoner i vannet (Fridell et al. 2007). Dersom dette skulle vært tilfelle her burde konsentrasjonen av  $K^+$  vært høyest for gruppen fra kjøletanken der vannet var oksygenovermettet. Enzymet Na-K-ATPase er antatt å være en del av Na-transportsystemet hos fisk, og er lokalisert på de basolaterale membranene (celle-blod interfase). Dette indikerer at  $Na^+$  blir transportert ut av cellen og blir byttet ut med  $K^+$  som går i den motsatte retningen (McWilliams 1992). Denne mekanismen kan forklare redusert  $K^+$  nivå der  $Na^+$  øker i dette forsøket.



**Figur 30. Konsentrasjonen av  $K^+$  (mmol/l) vist som gj.snitt  $\pm$  SD for de ulike gruppene. Ulike bokstaver betyr statistiske forskjeller.**



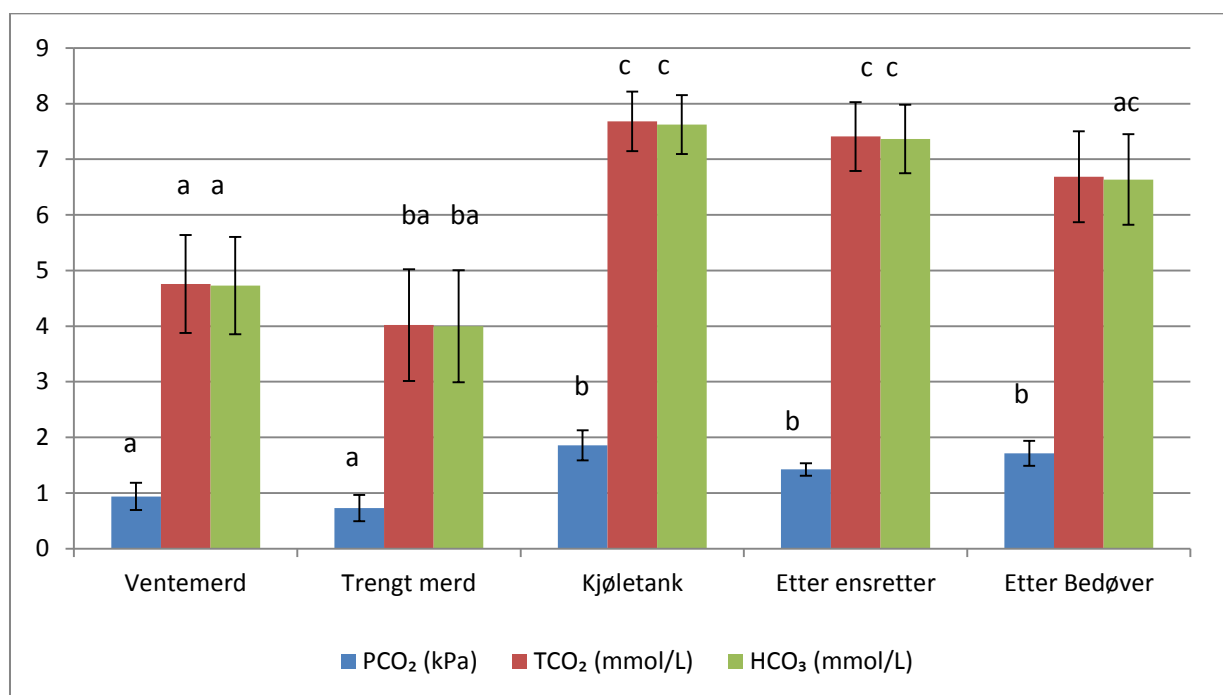
### **PCO<sub>2</sub>, TCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pH og BE**

Konsentrasjonen av PCO<sub>2</sub>, TCO<sub>2</sub> og HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> for de ulike uttakene er vist i figur 31. Høye konsentrasjoner av karbondioksid i vannet medfører akkumulering av CO<sub>2</sub> i fiskeblodet og blod-pH senkes (Fridell et al. 2007; Rosten et al. 2004). Videre vil høye oksygenverdier i vannet ofte føre til redusert ventilasjon og økt konsentrasjon av PCO<sub>2</sub> i blodet (Hosfeldt et al. 2008). Laks fra kjøletank viste både høyest konsentrasjon av PCO<sub>2</sub> og TCO<sub>2</sub> (figur 31) hvor konsentrasjonen av karbondioksid og oksygenmetningen i vannet var høyest. Videre holdt konsentrasjonen av disse to parameterne seg høyt for gruppene ensretter, og etter bedøver, men var noe redusert i forhold til konsentrasjonen for gruppen fra kjøletanken. Nivået av plasma PCO<sub>2</sub> og TCO<sub>2</sub> var signifikant høyere for gruppene kjøletank, ensretter og etter bedøver sammenlignet med gruppene, ventemerdd og trengt ventemerdd (figur 31). TCO<sub>2</sub> er summen av alle former for karbondioksid i plasma og PCO<sub>2</sub> er partialtrykket til gassen. Endringer i disse blodparameterne indikerer endringer i syre-basebalansen som ofte er et resultat av endringer i oksygentilførselen (Espmark et al. 2012).

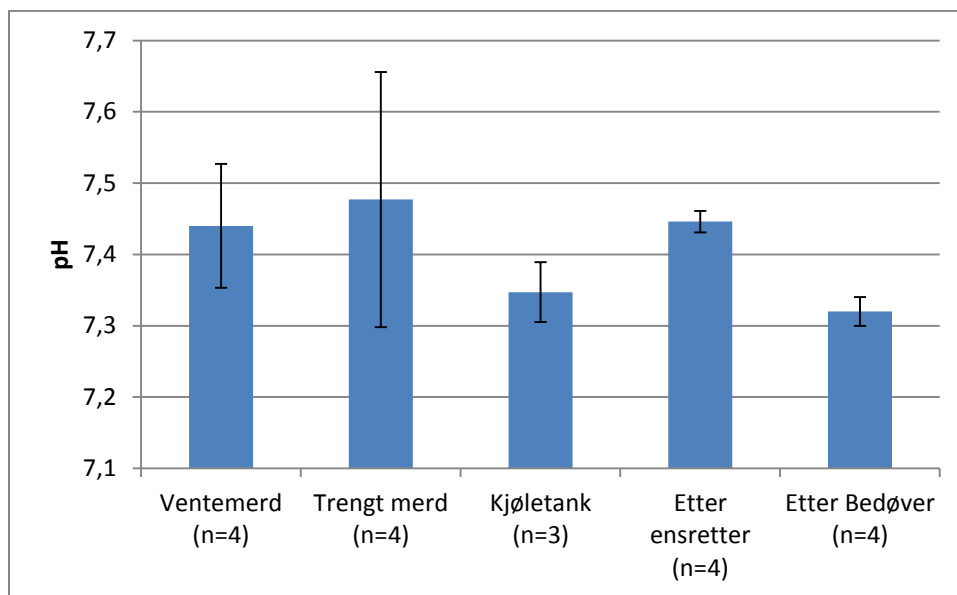
Som følge av økt CO<sub>2</sub> konsentrasjon synker pH i blodet. Lavest blod-pH ble vist for laks tatt etter bedøver og fra kjøletank, henholdsvis pH  $7,32 \pm 0,02$  og pH  $7,347 \pm 0,04$ , se figur 32 og tabell 10. Men det var ingen signifikante forskjeller i blod pH mellom gruppene. Acidose skyldes i stor grad forhøyet konsentrasjon av CO<sub>2</sub> i blodet som varierer omvendt proporsjonalt med pH (Fromm 1980). Blod hos utvilt laks kan normalt forventes å ha en pH omkring 7,7-7,8 (Mejdell et al. 2009). Det betyr at også laksen fra ventemerdene viste et lavt utgangspunkt med hensyn på blod pH ( $7,44-7,477$ , se figur 32 og tabell 10), hvilket kan tyde på at fisken var stresset.

Rask økning i PCO<sub>2</sub> fra  $0,94 \pm 0,24$  (ventemerdd) og  $0,73 \pm 0,24$  (trengt ventemerdd) til  $1,86 \pm 0,27$  (kjøletank) kan tyde på hyperkapni, som er benevnelsen for forhøyet nivå av karbondioksid i blodet og som fører til en rask økning av PCO<sub>2</sub>. Hyperkapni oppstår vanligvis som følge av akkumulering av metabolsk produsert karbondioksid i vannet og kan skje ved høye fisketettheter eller ved resirkulering av vannet der det brukes oksygenering og ikke lufting (Sigholt & Staurnes 1992), hvilket er tilfelle i kjøletanken. Økningen av PCO<sub>2</sub> i blodet vil etter en tid kompenseres. Acidose tilstand (økt syre innhold i kroppen) fører til en lavere transportkapasitet for oksygenet i blodet og følgelig kan dette medføre redusert oksygentilførsel til vevet som igjen kan føre til økt gjelleventilasjon. Økt gjelleventilasjon er ofte et resultat av hyperkapni, trolig som indirekte følge av redusert oksygentilførsel til vevet eller direkte følge av gjelleirritasjon (Sigholt & Staurnes 1992).

Økt opphoping av  $\text{CO}_2$  vil normalt kun føre til en midlertidig reduksjon i blod-pH. Fisken vil kompensere for den lave pHen ved å øke opptaket av bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Fromm 1980; Portz et al. 2006; Wood & Jackson 1980). Dette er i samsvar med resultatene fra dette forsøket, hvor det var en tydelig økning i konsentrasjonen av bikarbonat for de gruppene med lavest blod-pH og høyest konsentrasjon av  $\text{TCO}_2$  og  $\text{PCO}_2$ , se figur 31. Bikarbonat vil normalt i løpet av 24-48 timer bufre blodets pH tilbake til opprinnelig verdi (Rosten et al. 2004). Det ble funnet signifikant forskjell i konsentrasjon av plasma bikarbonat mellom gruppene; etter kjøletank, etter ensretterkar og etter bedøver sammenlignet med gruppen fra trengt ventemerdd. Der konsentrasjonen var høyest for de tre førstnevnte gruppene, se figur 31. Videre ble det funnet signifikant forskjell i konsentrasjonen av bikarbonat mellom gruppene; etter kjøletank og etter ensretterkar sammenlignet med gruppen fra ventemerdd, se figur 31. Det var ingen signifikant forskjell i konsentrasjon av  $\text{HCO}_3^-$  mellom ventemerdd og trengt ventemerdd, eller mellom gruppene fra kjøletank, etter ensretterkar og etter bedøver.

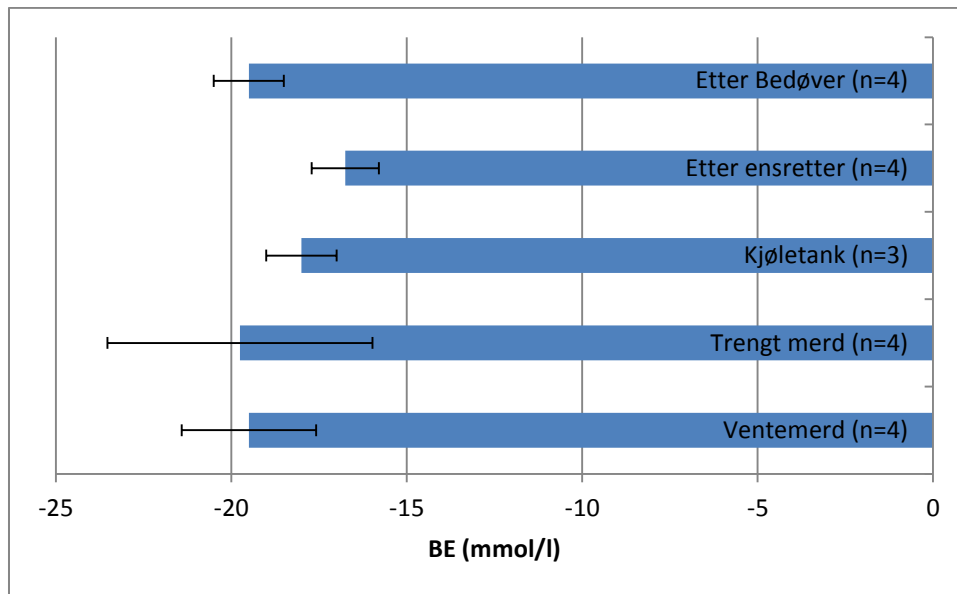


**Figur 31.** Forskjeller i plasmakonsentrasjon av  $\text{PCO}_2$  (kPa),  $\text{TCO}_2$  (mmol/l) og  $\text{HCO}_3^-$  (mmol/l) for de ulike gruppene, vist som gj.snitt  $\pm$ SD. Signifikansnivå er antydnet med bokstaver. Like bokstaver indikerer ingen forskjell.



**Figur 32.** pH i blod for de ulike gruppene, vist som gj. snitt  $\pm$  SD.

Alle blodprøvene viste negative BE verdier, se figur 33. En skulle forvente at gruppa med størst syreoverskudd, dvs. lavest BE verdi kom fra en av gruppene med lavest blod pH og høyest konsentrasjon av CO<sub>2</sub>. Det er her kun tilfellet for gruppen etter bedøver. Derimot hadde de to gruppene med høyest pH, fisk fra ventemerd og trengt ventemerd, tilsvarende syreunderskudd som for gruppen tatt etter bedøver. Økning i BE verdiene for fisken fra kjøletank og ensretterkar kan tilskrives økning i bikarbonat. BE verdien blir så stadig mer negativ for gruppen tatt etter bedøver, hvor også den laveste blod-pH er registrert. Videre får denne gruppen en liten reduksjon i bikarbonat sammenlignet med gruppen tatt etter ensretterkar, hvilket kan tyde på utvikling av en stadig mer alvorlig metabolsk acidose (Packer 1979). Årsaken til syreoverskuddet i fisk fra ventemerd og trengt ventemerd er usikker. Manglende referanseverdi for BE hos laks gjør vurdering av resultatet noe usikker. Dog avviker ikke verdiene mye med hva som er rapportert for havabbor (Marco 2001).



Figur 33. Beregnet baseoverskudd (BE) for de ulike gruppene i mmol/l, vist som gj.snitt  $\pm$  SD.

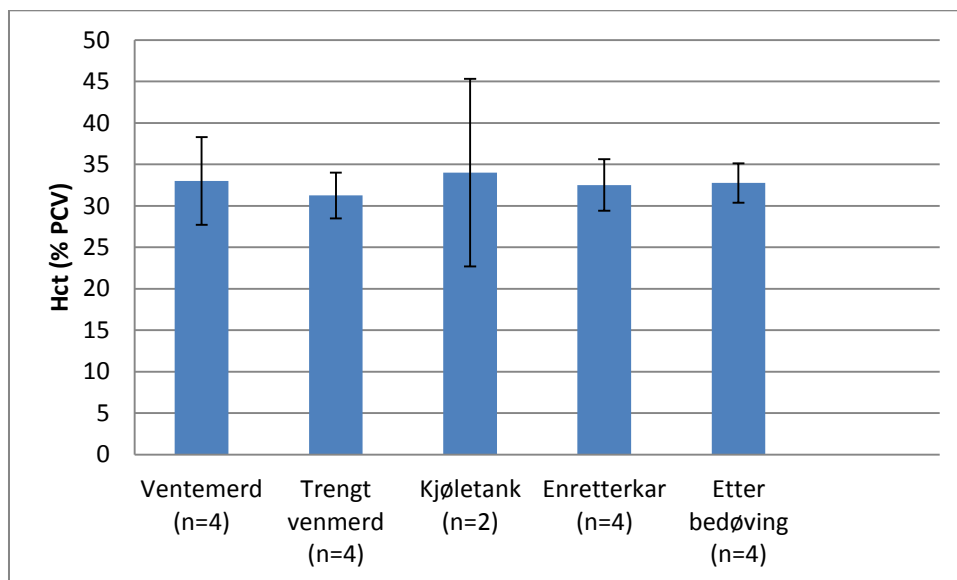
### Hematokrit og Hemoglobin

Konsentrasjonen av hematokrit for de ulike gruppene er vist i figur 34. Redding og Schreck (1983) rapporterte om økning i hematokritnivået hos fisk under stress i ferskvann, mens det ble redusert under stress i saltvann. En skulle derfor forvente lavest hematokritnivå hos laks fra kjøletank, der det er antatt at fisken var mest stresset. Det var imidlertid ingen statistisk variasjon i hematokritkonsentrasjonen mellom de ulike gruppene i dette forsøket.

Blodanalysen i dette forsøket viser kun en liten økning i hematokritnivå for gruppen tatt fra kjøletank. For denne gruppen var det bare to av blodprøveanalysene som ga resultat på hematokritkonsentrasjonen. Gjennomsnittsverdien er derfor kun basert på verdier fra to individer, med stor spredning i verdiene mellom disse to individene (SD 11,3), se figur 34.

Kjartansson et al. (1988) fant at høy tetthet førte til en økning i hematokritnivå hos atlantisk laks etter 101 dager, og i hemoglobin etter 143 dager, sammenlignet med fisk ved lav tetthet. Det motsatte er rapportert for gullfisk, der både hemoglobin og hematokrit konsentrasjonen ble redusert ved høy tetthet sammenlignet med lav tetthet (Burton & Murray 1979). De hematologiske forskjellene for disse to forsøkene kan relateres til langtidforskjeller i nivå av oksygen, karbondioksid og ammoniakk etc. i vannet, så vel som effekt av tetthet som sådan (Kjartansson et al. 1988). Imidlertid ble det ikke funnet noen fremtredende forskjeller før nærmere slutten av eksponeringsperioden. Dermed er det nærliggende å anta at disse to parameterne ikke blir påvirket av korttidseksponering som ved tilfellet i dette forsøket og at det er årsaken til at det ikke foreligger noen forskjell i konsentrasjonen av hemoglobin og hematokrit for de ulike gruppene. Derimot ble det i en annen studie observert signifikante

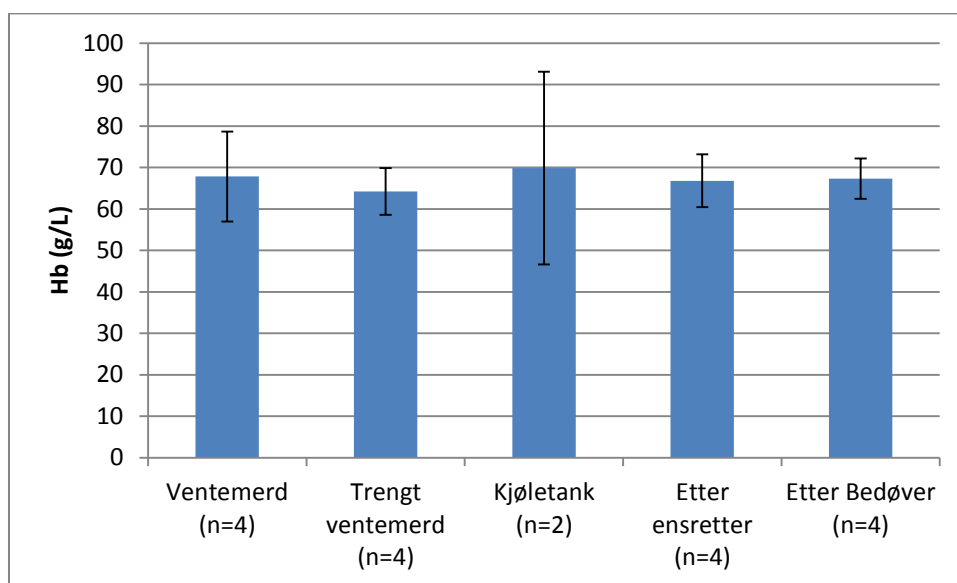
endringer i hematokritnivå hos smolt fra 0 timer (kontroll) til 12 timer sjøvanneksponering (Handeland et al. 1996). Normalt nivå for hematokrit og hemoglobin hos voksen, frisk Atlantisk laks er henholdsvis 44-49 % og 89-104 g/l (Sandnes et al. 1988). Konsentrasjonen av hematokrit i dette forsøket ligger noe lavere enn dette, men avviker ikke langt fra hva Kjartansson et al. (1988) rapporterte for smolt ved 0-35 dager eksponering ved alle gradene av fisketetthet (lav, middels, høy). Redusert hematokrit nivå er også blitt rapportert hos Atlantisk laks under hyperoksisk miljø (34,1 kPa  $\approx$  160 % metning)(Kristensen et al. 2010), og hos regnbueørret (130 %) (Caldwell & Hinshaw 1994). Så høye oksygenkonsentrasjoner var kun tilfelle i kjøletanken og vil ikke kunne forklare lave hematokrit nivåer for de andre uttakene. Økt konsentrasjon av plasmaioner kan føre til en krymping av erytrocytter (røde blodceller), (Bath & Eddy 1979; Handeland et al. 1996) med påfølgende reduksjon i erytrocyttvolum (Handeland et al. 1996). Dette kan være årsaken til lave hematokritverdier i dette forsøket, sett i forhold til normalverdi for laks. En nedgang i hematokrit er koblet til en redusert oksygen-bærerkapasitet i erytrocyttene. En reduksjon i oksygen-bærer kapasiteten vil påvirke oksygen konsentrasjonen til muskelvevet, redusere svømmekapasiteten og fisken vil skifte til anaerob metabolisme og laktatproduksjon (Handeland et al. 1996). Redusert hematokrit er en indikasjon på osmotisk stress hos fisk (Bath & Eddy 1979; Handeland et al. 1996).



**Figur 34. Hematokritnivå (%PCV) for de ulike gruppene, vist som gj. snitt  $\pm$  SD.**

Hemoglobinkonsentrasjonen har direkte sammenheng med hematokrit (*ligning 10*) og ligger følgelig også under normal referanseområde for laks hos alle gruppene, se figur. 35. I beregningen av hemoglobin ble det forutsatt at laksen hadde en normal MCHC verdi (*ligning 10*). Redusert MCHC verdier er blitt observert hos regnbueørret under hyperoksisk miljø

(Jewett et al. 1991) hvor fisken hadde en gjennomsnitt MCHC verdi på 18,2. Denne MCHC verdien ligger noe lavere enn MCHC på 20,55 som ble benyttet i utregningen av hemoglobinkonsentrasjonen i dette forsøket. Imidlertid ble det ikke påvist noen statistiske forskjeller i MCHC mellom kontrollgruppen og fisk utsatt for oksygenovermetning i forsøket til Jewett et al. (1991). Det ble heller ikke funnet noen signifikante forskjeller i MCHC hos regnbueørret utsatt for tre ulike oksygenmetninger (130 %, 100 % og 65 %) (Caldwell & Hinshaw 1994). Ut i fra dette er det sannsynlig å anta at MCHC hos laksen i dette forsøket ikke varierte i stor grad mellom de ulike gruppene.



Figur 35. Konsentrasjonen av hemoglobin (g/l) for de ulike gruppene, vist som gj. snitt  $\pm$  SD.

### Generell diskusjon

De fysiologiske undersøkelsene tyder på endringer i syrebasebalansen hos laks fra gruppene kjøletank, etter ensretterkar og etter bedøver, sammenlignet med de to ventemerddgruppene, der de tre først nevnte gruppene hadde høyest verdi av både  $\text{PCO}_2$  og  $\text{TCO}_2$ , samt lavest pH i blodet.  $\text{PCO}_2$  sammen med pH benyttes til vurdering av syrebasebalansen, der  $\text{PCO}_2$  er den respiratoriske komponenten i syrebasebalansen og måles ved spenning eller trykk av oppløst karbondioksid i blodet. Partialtrykket av karbondioksid representerer balansen mellom cellulær produksjon av  $\text{CO}_2$  og ventilatorisk fjerning av  $\text{CO}_2$ , hvor en forandring i  $\text{PCO}_2$  indikerer en endring i denne balansen (CTI-Scheets 2013e). Kombinasjon av lav pH og høy  $\text{PCO}_2$  som registrert for disse tre gruppene, tyder på respiratorisk acidose og følgelig kan dette medføre til redusert oksygentilførsel til vev (Sigholt & Staurnes 1992). Mest kritisk er det for gruppen tatt fra kjøletank med høyest  $\text{PCO}_2$  og  $\text{TCO}_2$ . Dette kan være et direkte resultat av oksygenovermetningen i vannet. Økt konsentrasjon av  $\text{HCO}_3^-$  og redusert negativ verdi av BE

tyder på kompensasjon for acidosestilstanden (Packer 1979) og derfor ingen indikasjon på utvikling av metabolsk acidose for laksen fra kjøletank og ensretterkar. Økt konsentrasjon av  $\text{Na}^+$  og redusert konsentrasjon av  $\text{K}^+$  tyder på endringer i ionebalansen hos fisk. Disse endringene var imidlertid bare tydelig for laks fra kjøletanken som hadde en signifikant høyere  $\text{Na}^+$  konsentrasjon sammenlignet med trent ventemerd og etter bedøver, mens den eneste signifikante forskjellen i  $\text{K}^+$  var mellom trent ventemerd og etter bedøver. Glukoseinnholdet forventes å stige ved stress. Forsøket viste imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i henhold til konsentrasjon av glukose. Ut ifra et basalnivå på 5,5 hos ustresset laks, tyder de registrerte glukoseverdiene her på økt mobilisering av glukose hos alle gruppene utenom hos gruppen tatt etter bedøver.

Dessverre var det ikke midler til å ta flere enn fire blodprøver fra hvert prøveuttak. I tillegg ble *en* blodprøve ødelagt fra prøveuttaket av kjøletank. Antall laks som representerer dette uttaket ble derfor ikke flere enn tre. I noen av blodprøvene var det også enkelte blodparametere som i-STAT maskinen ikke ga noen verdier. Resultatet av kalium, hematokrit og hemoglobin viser kun gjennomsnittsverdier av to blodanalyser for prøveuttaket av kjøletanken. Det å basere resultatene ut fra kun to prøver er svært marginalt og vil ikke kunne representere virkelighetsbilde. For enkelte parametere er det i tillegg også stor spredning innenfor gruppene. Det foreligger derfor ingen statistisk styrke i resultatene. Resultatene gir likevel en indikasjon på tilstanden hos laksen innenfor de ulike gruppene.

## **7. Forsøk III- Rigorutvikling**

Redusert aktivitet og mindre stress hos fisk før slaktning vil gi lengere tid før fisken går inn i rigor (Erikson et al. 1997; Poli et al. 2005; Skjervold et al. 1999). Lang pre-rigortid er dermed en kvalitetsfaktor i seg selv, ved at det indikerer at fisken ikke har vært stresset (Mejdell et al. 2009). I tillegg vil lang pre-rigortid gjør det mulig å håndtere fisken under prosesseringen og pakking før fisken går inn i rigor, som igjen vil gi økt filetutbyttet og mindre skader på kjøttet (Erikson et al. 1997; Poli et al. 2005). I forbindelse med dette var det ønskelig å sammenligne de ulike punktene i slaktelinjen; ventemerdd, trengt ventemerdd, etter kjøletank, etter ensretter og etter bedøver, opp mot hverandre i henhold til tid før inntreden av rigor.

### **7.1. Material og metode**

Etter avliving og blodprøve gikk samtlige individer videre til rigor-måling ca. hver time etter avliving frem til kl 22.00 samme dag. Siste måling ble utført kl. 09.00 neste dag. Under måling av rigor kvantifiseres rigorstyrken og tidspunktet for når en rigorintensitet inntraff som hindrer pre-rigor filetering. For å detektere dette må fiskemuskelens fasthet måles. Rigor ble bestemt ved en evaluering av fiskens stivhet etter forsiktig løft av halen til fisken. Metoden er basert på tidligere anvendt metode (Skjervold et al. 2001b). Rigor score ble fastslått av en skala fra 1-5, der 1 representerer ingen stivhet og 5 representerer meget sterk rigor (Skjervold et al. 2001b). Vi var to operatører til fastsettelse av rigor score. Rigor score ble kalibrert ved gjensidig enighet. Fastsettelse av rigor ble utført mens fisken lå i isoporkasser med is inne på kjølelageret på anlegget. Kjølelageret holdt en konstant temperatur på 4 °C gjennom hele forsøket.

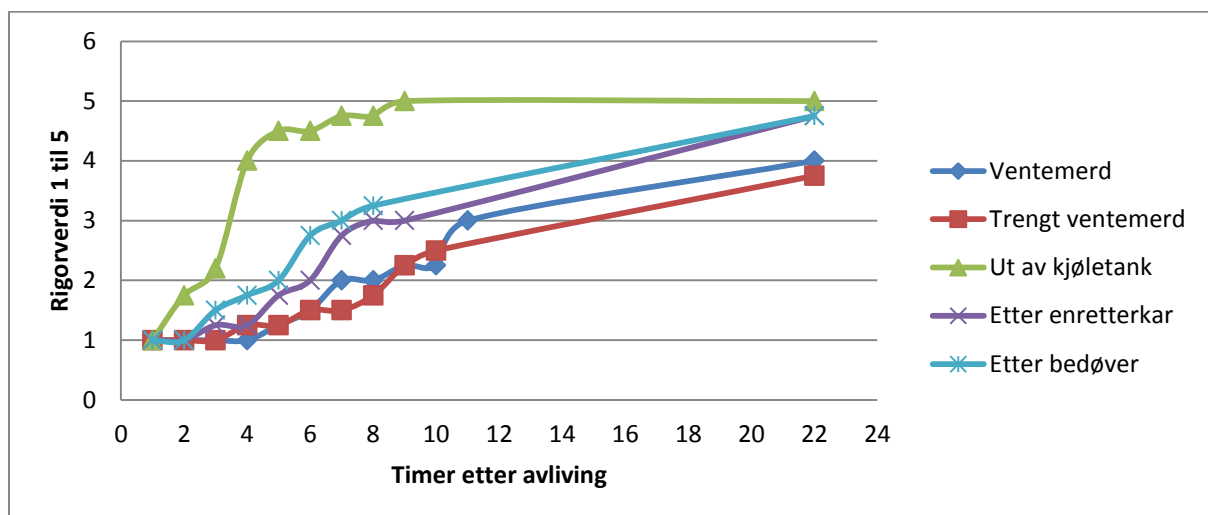
#### **7.1.2 Databehandling**

Resultatet ble behandlet Excel (Microsoft 2010), der rigorkurven er laget.

### **7.3 Resultat**

Utviklingsforløp av rigor mortis er vist i figur 36. Fisken tatt ut av kjøletank var på vei inn i rigor allerede 2-3timer etter død. Denne gruppen hadde en betydelig brattere rigorkurve, der samtlige individer var i full rigor, det vil si hadde en rigor score 5; 9 timer etter død. Kurven til gruppa tatt etter bedøver viser at fisken var på vei inn i rigor 4-5 timer etter død og viser en betydelig slakere kurve enn den førstnevnte, der fiken hadde en rigor score i overkant av 3; 8 timer etter død. Laks etter ensretterkar viste inntreden av rigor 6 timer etter død, og en rigor score på 3; 9 timer etter død. Fisken fra ventemerdd og trengt ventemerdd hadde som forventet senere inntreden av rigor først 8-10 timer etter død.





Figur 36. Rigorforløp for de ulike uttakene, blå kurve representerer ventemerð, rød kurve ventemerð trengt, grønn kurve ut av kjøletank, lilla kurve etter enretterkar og lyseblå kurve etter bedøver. Y-aksen representerer Rigorstatus som angir fiskens stivhet, der «1» representerer pre-rigor (ingen stivhet), «2» angir begynnende rigor. Stivheten øker så opptil «5» som angir en meget sterk rigor (fisken er stiv som en pinne).

#### Fisk tatt fra ventemerð og avlivet:

- 4 timer post mortem: ingen fisk i rigor.
- 9 timer post mortem: Rigor score:  $2,25 \pm 0,5$
- 22 timer post mortem: rigor score  $4 \pm 0,82$

#### Fisk tatt fra trengt ventemerð og avlivet:

- 4 timer post mortem: de fleste fisk enda ikke i rigor. Rigor score  $1,25 \pm 0,5$
- 9 timer post mortem: rigor score  $2,25 \pm 0,5$
- 21-22 timer post mortem: rigor score  $3,75 \pm 0,95$

#### Fisk tatt ut av kjøletank og avlivet:

- 4 timer post mortem: rigor score  $4 \pm 0$
- 9 timer post mortem: alle i sterk rigor, score 5

#### Fisk avlivet etter enretterkar:

- 4 timer post mortem:  $1,25 \pm 0,5$
- 9 timer post mortem: rigor score  $3 \pm 1,41$
- 20 timer post mortem: rigor score  $4,75 \pm 0,5$

#### Fisk avlivet etter bedøver:

- 4 timer post mortem: rigor score  $1,75 \pm 0,95$
- 8 timer post mortem: rigor score  $3,25 \pm 0,5$
- 19 timer post mortem; rigor score  $4,75 \pm 0,5$

### 7.3.1 Diskusjon

De fysiologiske undersøkelsene underbygger at fisken i ventemerð, både trengt og delvis trengt, er minst stresset. Faktisk viser resultatene liten forskjell både i blodparameterne og utviklingen av rigor for disse to gruppene. Dette indikerer at trengingen ikke har hatt effekt på

fisken i form av økt stress. Trenging er vel kjent å være stressende for fisk (Gatica et al. 2010; Mazur & Iwama 1993; Roth et al. 2012; Skjervold et al. 1999; Skjervold et al. 2001b) og medføre en raskere inntreden av rigor (Erikson et al. 1997; Sigholt et al. 1997; Skjervold et al. 2001b). En skulle derfor anta en større forskjell i rigorutvikling mellom disse to gruppene. Imidlertid vil faktorer som grad av trengning og tid i trengt tilstand ha betydning for stressnivået i fisken. For i det hele tatt å ha mulighet til å håve opp fisk av merden, var også ventemerdd (ikke trengt) delvis trengt, hvilket kan ha medført til liten forskjell i rigorutvikling mellom disse gruppene. Hverken tid i trengt tilstand eller tetthet ved prøveuttak er kjent i dette forsøket. Med god operasjonell håndtering ved trening kan unødvendig stress unngås, hvilket antas å være tilfellet her. Laks fra levende kjøling hadde raskest inntreden av rigor og en rigor score på 4, kun 4 timer etter avliving og «stjeler» betydelig pre-rigortid. Hard behandling under pumping (Gatica et al. 2010) fra ventemerdd til kjøletank, høy tetthet (Poli et al. 2005) under levendekjøling og dårlig vannkvalitet (Sigholt et al. 1997) er alle parametere som kan gi utslag i stress hos fisk og derav rask inntreden av rigor mortis og sterkere dødsstivhet (Skjervold et al. 1999). Laks tatt ut etter ensretterkar hadde en betydelig lengere pre-rigortid sammenlignet med gruppen fra kjøletanken, mens den ble noe redusert for gruppen etter bedøver. Elektrisk bedøver påvirker muskelen direkte, med ytterligere nedtrapping av muskulaturens energilagere under strømpåvirkningen og dermed også pre-rigortiden (Mejdell et al. 2009). Dersom fisken har en rigor score på >3 vil en få problemer med å håndtere fisken under prosesseringen. Potensiell tid til rigor ved anlegget er i underkant av 20 timer i ventemerdd, mens den reduseres til 9 timer etter ensretterkar og 8 timer etter bedøver. Pre-rigortiden for fisk i kjøletanken reduseres ytterligere til under 4 timer. Fisk som er helt ustresst når den slås i hjel vil til sammenligning ha en pre-rigorperiode på 24-30 timer under lagring på is (Midling et al. 2008).

Hensikten med levendekjøling er å få en rask temperatursenking i fisken tidlig i prosesseringslinjen og roe ned fisken ved å benytte den sedative effekten av hypotermi på fisk (se 5.1.2). Tidligere forsøk har vist at levendekjøling av fisk før slakting forsinket utbruddet av rigor mortis (Erikson et al. 2006; Skjervold et al. 2001b). Utviklingen av rigor er et resultat av en kompleks kombinasjon av biokjemiske prosesser i fiskemuskel (Watabe et al. 1990), der lav muskeltemperatur ved død er forventet å senke denne prosessen (Abe & Okuma 1991). Lav muskeltemperatur ved død, gjør at de fleste biokjemiske prosessene involvert i anaerob energinedbrytning forsinkes (Skjervold et al. 2001b). Levendekjølingen senket temperaturen på fisken, men med så rask inntreden av rigor som ble registrert hos fisk i

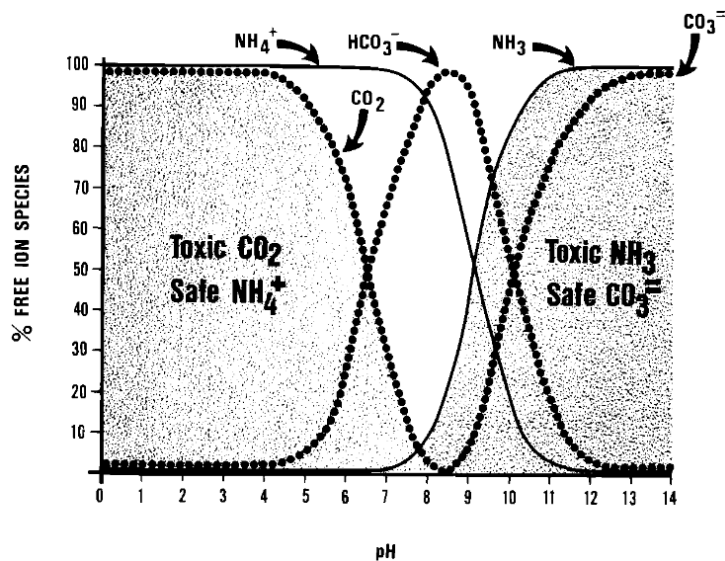
fra kjøletanken, forsvinner mye av hensikten med levendekjølingen. Imidlertid var antall individer undersøkt lavt og ikke tilstrekkelig til å trekke en slik konklusjon. I tillegg må en avdekke hvilken betydning pumping fra ventemerd til kjøletank har på fisken samt undersøke hvilken betydning det ville ha hatt uten at fisken ble levendekjølt.

Imidlertid må det påpekes at etter CO<sub>2</sub> bedøving ble forbudt, har flere gått bort fra levendekjøling av fisk (Tobiassen 2012; Tobiassen 2013). God kjøling av laksen før videre bearbeiding eller pakking er viktig for å kunne oppnå lang holdbarhet og for å redusere is-behov og avrenning av blodvann under transport. Dersom en ikke benytter seg av levendekjøling må all kjøling av fisk før pakking foregå i blødetanken eller eventuelt i en kjøletank etter sløying (Tobiassen 2013). Næringen møter stadig skjerpene krav fra markedet i forhold til kjøling (Tobiassen 2013), og i den forbindelse blir levendekjøling sentralt. Mange næringsaktører melder om at kjøling er vanskelig etter at levendekjøling ble faset ut og flere ønsker å tilbakeføre levendekjøling (Tobiassen 2012).

## 8. Forsøk IV. Effekt av rask pH-økning på laks

### 8.1 Innledning

Transport av slaktelaks i lukkede transportsystemer (stengte ventiler) har den fordel at det vil redusere smitterisikoen ved transport nær ulike oppdrettsanlegg og forkjøle/roe ned fisk før levering til slakteri (Kiessling et al. 2006). Begrensningene av lukkede transportsystemer er: (1) tilstrekkelig oksygen til fisken er nødvendig, (2) potensielt giftige metabolitter som ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) og karbondioksid ( $\text{CO}_2$ ) må reduseres; og (3) bakteriell oppblomstring må forhindres. Alvorlighetsgraden av disse begrensningene påvirkes av vanntemperatur, pH, fisketetthet, og transporttid (Amend et al. 1982). Lengere transporter kan ved bruk av lukket brønnbåt medføre en betydelig risiko for fiskedød på grunn av at vannkvaliteten gradvis forringes, der akkumulering av TAN representerer den største risikoen med hensyn til vannkvaliteten (Kiessling et al. 2006). Lange føringer ved lukket transport vil kunne kreve vannbehandling om bord (Kiessling et al. 2006). Den mest giftige formen av TAN for fisk er den u-ioniserte formen  $\text{NH}_3$  (Emerson et al. 1975; Fivelstad et al. 1993; Kiessling et al. 2006; Sigholt & Staurnes 1992; Stefansson et al. 2007), da denne lett trenger gjennom gjellene (Sigholt & Staurnes 1992; Stefansson et al. 2007). Som tidligere nevnt (se 2.1.3) opptrer ammoniakk i vann i en likevekt mellom  $\text{NH}_3$  og  $\text{NH}_4^+$ , som avhenger av temperatur, salinitet og pH (Spotte & Adams 1983; Stefansson et al. 2007). Der giftigheten av TAN i hovedsak bestemmes av pH i vannet, mens de to øvrige er mindre viktig (Randall & Tsui 2002; Spotte & Adams 1983). Under ugunstige forhold med høy pH  $> 8,0$ , kan selv små mengder føre til akutt fiskedød (Kiessling et al. 2006). Selv en liten reduksjon i pH innenfor relevant pH skala i sjøvann vil derfor ha stor betydning for giftigheten av den totale ammoniakkonsentrasjonen (Grøttum et al. 1997; Spotte & Adams 1983). Imidlertid vil pH i transportvannet fort synke som følge av akkumulering av karbondioksid produsert ved fiskens stoffomsetning (Amend et al. 1982). Giftigheten av karbondioksid er også avhengig av pH, der lav pH resulterer i at mer av  $\text{CO}_2$  foreligger som den giftige formen fritt  $\text{CO}_2$  (figur 37) (Amend et al. 1982).



Figur 37. Fordeling av de ulike kjemiske formene av ammoniakk og karbondioksid vist i prosent ved varierende pH nivåer (Amend et al. 1982).

Generelt anbefales det under lukket transport og holde en pH i vannet på 6,5 (Nilsen et al. 2011; Rosten et al. 2004), samt unngå å blande inn friskt sjøvann med høyere pH (Kiessling et al. 2006; Rosten et al. 2004).

Giftvirkningen av forhøyede konsentrasjoner av ammoniakk i vannet skyldes svekket ammoniakkutskillelse eller et netto opptak av ammoniakk fra omgivelsene. Sluttresultatet er forhøyet ammoniakknivåer i kroppen, som fører til kramper og død (Randall & Tsui 2002). Gifteffekten av ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) ser ut til å være lik for fisk som for pattedyr. Kramper, koma og død finner sted for begge dyregruppene rett etter ammoniakkforgiftning (Randall & Tsui 2002). Økt ammoniakkinnhold i blodet hemmer energimetabolismen i hjernen (Sigholt & Staurnes 1992). Data tyder på at forhøyet  $\text{NH}_4^+$  kan erstatte  $\text{K}^+$  og depolarisere nevroner, hvilket forårsaker en kraftig aktivering av NMDA-type glutaminreseptorer. Dette kan videre føre til en overdreven tilstrømming av  $\text{Ca}^{2+}$  og påfølgende celledød i sentralnervesystemet (Randall & Tsui 2002). Symptomene på forgiftning vil derfor ofte være nevrologiske som redusert svømmekapasitet, ubalanse i vannet og skjelving (Terjesen & Rosseland (u.å)).

De fleste lakseslakterier benytter seg av ventemerder som fisken overføres til etter brønnbåttransport. Dersom transporten har vært lukket, vil brønnvannet være surt (pH 6,5), mens ventemerdene vil holde en pH i sjøvannet på rundt 8,0. Dette innebærer en rask pH økning for fisken ved overføring fra brønnbåt til ventemerde.

Hensikten med forsøket var å undersøke om en mulig  $\text{NH}_3$ -giftighet kunne oppstå ved rask pH-ending i vannet, ved å konstruere en simulert lukket transportenhet for så å overføre

fisken til en tank med høyere pH i vannet, uten å blande to ulike vannkvaliteter. Dette ble undersøkt ved å observere adferden til laksen og på den måten se om eventuelle problemer for fisken ville oppstå.

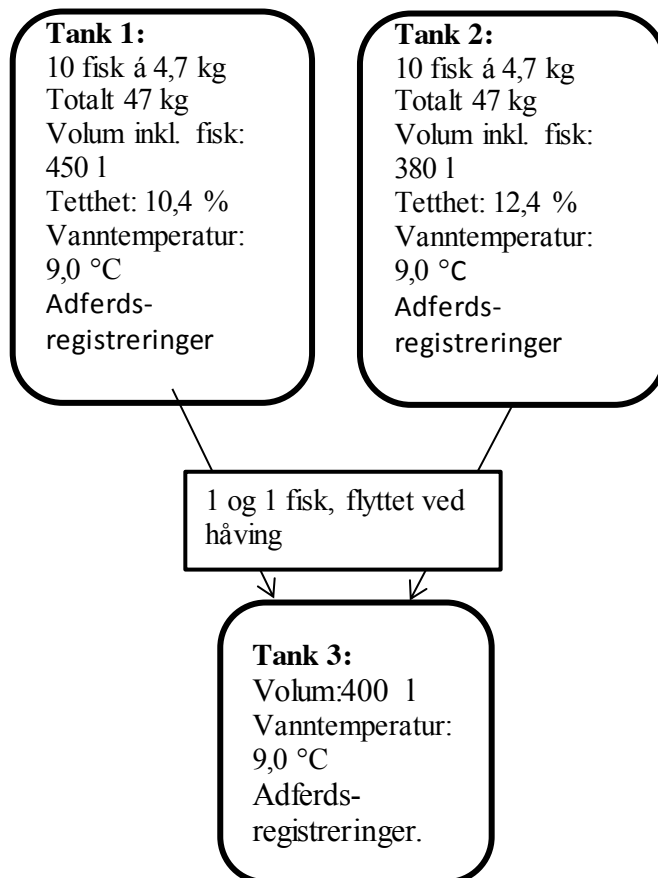
## **8.2 Material og metode**

Forsøket ble gjennomført den 13. november 2013 på Bømlo Seashore As av Svein Olav Fjæra. 3 fisketanker á 500 l ble benyttet. For alle tankene ble det brukt sjøvann med temperatur på 9 °C. Temperaturen på vannet ble holdt konstant i alle tankene under hele forsøket. Temperatur, pH og oksygen ble loggført med manuelle målinger. Det ble benyttet en OxyGuard Handy Ploaris 2 (OxyGuard International A/S, Birkerød, Danmark) til oksygenmålinger og vanntemperatur (°C). Oksygeninnholdet ble målt i prosent metning (%). Registrering av pH ble utført med Jenco pH-meter No. 34-3118 fra Clas Olson (produsert i Shanghai, Kina, hovedkontor San Diego, California, USA). Et tilfeldig utvalg av til sammen 20 Atlantisk Laks (*Salmo Salar*) á 4,7 kg ble benyttet. Fisken var slakteklar laks som ble hentet på Bømlo Seashore As. Laksen var sultet før ankomst til slakteriet. For å simulere en lukket brønnbåttransport ble fisk overført til Tank 1 og Tank 2, med oppholdstid på 4 timer. Det ble ikke foretatt vannutskiftning. Tank 3 ble fylt til volum på 400 l med oksygenmetning på 100 % og pH 8.

Tank 1: 10 fisk á 4,7 kg, totalt 47 kg, ble flyttet over i Tank 1. Volum, inkludert fisk var 450 l, med tetthet i karet på 10,4 %. Sjøvannet i tanken hadde pH 8,0 ved oppstart av forsøket og sank etter hvert til pH 6,7 som følge av fiskens egen respirasjon. Oksygen ble tilsatt og varierte fra 102 % til 153 % (gj. snitt 123 % ± 18). Etter 4 timer og 10 minutter oppholdstid ble fisken flyttet fra Tank 1 med pH 6,7 til Tank 3, med pH 8. *En* og *en* fisk ble flyttet fra Tank 1 med dårlig vannkvalitet til Tank 3 med god vannkvalitet.

Tank 2: 10 fisk á 4,7 kg, totalt 47 kg. Volum, inkludert fisk var på 380 l, med tetthet i karet på 12,4 %. Oksygen ble tilsatt og varierte fra 102 % til 135 % (gj. snitt 120 % ± 12). PH i tanken ved oppstart av forsøket var på 8,0. Som følge av fiskens respirasjon sank pH i vannet, tilsvarende som for Tank 1. I tillegg ble det tilsatt CO<sub>2</sub>-gass i Tank 2 for å senke pH i vannet ytterligere. Dette ble imidlertid kuttet da fisken reagerte negativt på CO<sub>2</sub> tilsetningen uten at det ble registrert noen pH nedgang i vannet. Etter 4 timer og 20 minutters oppholdstid i tanken ble fisken flyttet fra tank 2 med pH 6,7 til tank 3, på tilsvarende måte som beskrevet under Tank 1.

Atferdsregistreringer: For å undersøke om en mulig  $\text{NH}_3$ -giftighet kunne oppstå ved raskt pH-endring i vannet ble følgene adferdsregistreringer dokumentert: Ballanseproblem/legger seg på siden, sedatert/rolig, svømmer/aktiv, gjellebevegelse og fluktrespons. Atferdsregistreringer ble dokumentert for Tank 1 og Tank 2 før flytting til Tank 3. Videre ble adferden til fisken dokumentert ved overflytting fra Tank 1 til Tank 3 og Tank 2 til Tank 3, se figur 38.



Figur 38. Illustrasjon over forsøksoppsettet.

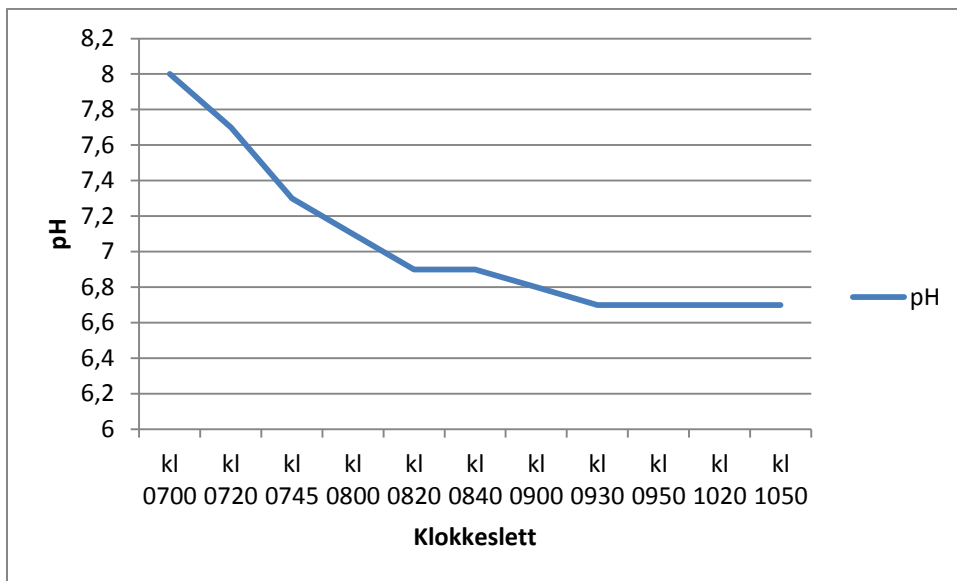
### 8.2.1 Databehandling

Alle registreringer i dette forsøket ble utført av Svein Olav Fjæra. Resultatet har jeg i etterkant behandlet i Excel (Microsoft 2010) hvor figurer og grafer er produsert. I utgangspunktet var det ment å senke pH i Tank 2 til en pH på rundt 6, mens Tank 1 skulle holde en pH i underkant av 7 og etter 4 timer flytte de ulike gruppene over i Tank 3 med pH 8. Derifra se om fisken ville få problemer, og eventuelt om det var noen forskjell mellom de to ulike pH-gruppene. Imidlertid sank ikke pH i Tank 2 lengere ned enn til pH 6,6 etter 4 timer, og slutt pH for Tank 1 og 2, skiller seg kun med 0,1 pH-enhet. Forsøket kan slik sett behandles som 2 gjentak, med ulik tetthet.

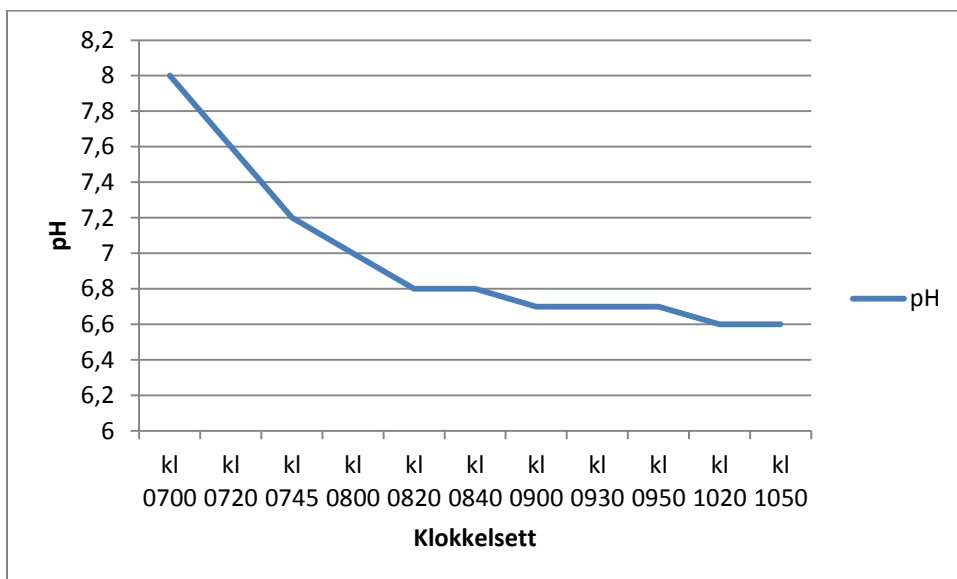
### 8.3 Resultat

Akkumulering av  $\text{CO}_2$ , er årsaken til pH senkningen i Tank 1 og 2, se figur 39 og 40.

Oksygenkonsentrasjonen ble noe høy i Tank 1 og 2, se figur 41 og 42. Dette virket antagelig ikke positivt på fisken. I begge tankene ble det observert at fisken av og til snappet luft i overflaten. Etter 2 timer og 30 minutter var pH i Tank 1 redusert fra 8 til 6,7 og gikk ikke ytterligere ned etter 4 timer. I Tank 2 sank pH i vannet til 6,6 etter 3 timer og 20 minutters oppholdstid i karet og ble ikke ytterligere redusert etter 4 timer oppholdstid. PH sank med omlagt 0,1 enheter raskere for Tank 2 med høyest tetthet, sammenlignet med Tank 1.

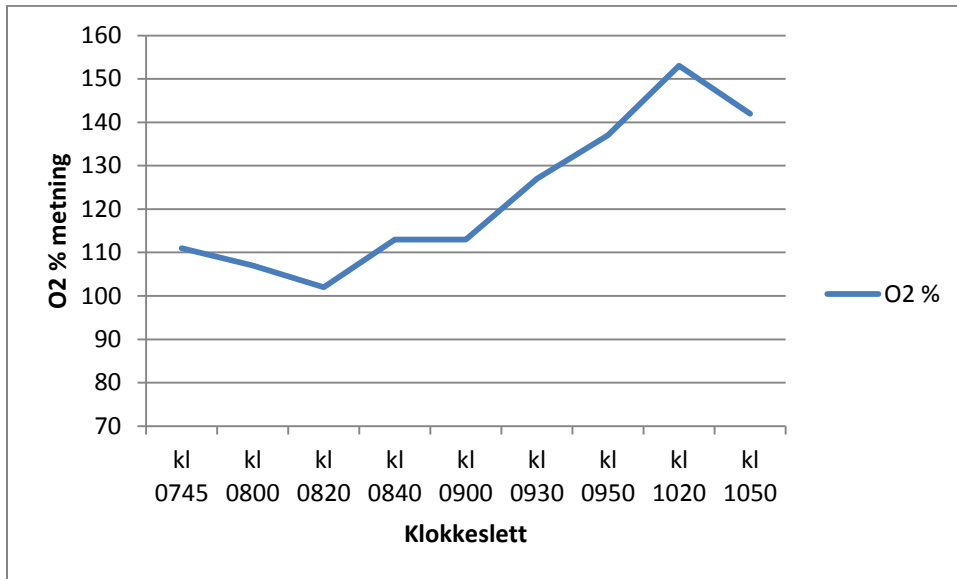


Figur 39. Utvikling av pH i Tank 1. PH synker som følge av  $\text{CO}_2$  akkumulering i tanken.

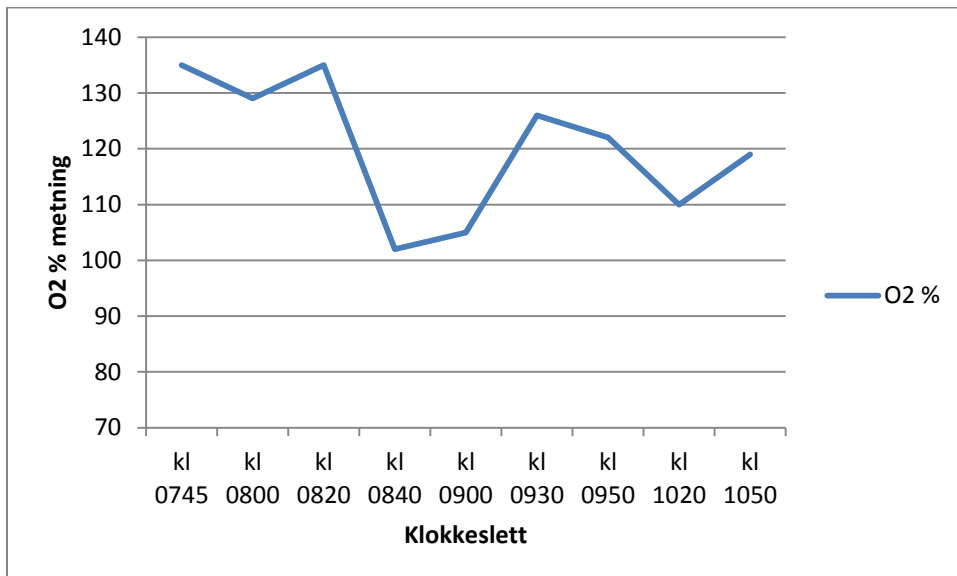


Figur 40. Utvikling av pH i Tank 2. PH synker som følge av  $\text{CO}_2$  akkumulering i tanken.





**Figur 41. Utviklingen av oksygenkonsentrasjonen i Tank 1, vist i % metning.**



**Figur 42. Utviklingen av oksygenkonsentrasjonen i Tank 1, vist i % metning**

Resultatet i fra atferdsregistreringene er vist i tabell 11. Adferdsregistreringene tyder ikke på at fisken i Tank 1 og 2 hadde balanseproblem hverken før eller etter overflytting til Tank 3. Fisken virket noe sedatert/rolig i Tank 1 og 2 før de ble flyttet til Tank 3, der den kviknet til. Ved alle adferdsregistreringene var fisken aktiv og hadde normal gjellebevegelse. Fluktrespons ble kun observert ved håving og ved skygge over karet. Fisken responderte positivt på å bli flyttet til en bedre vannkvalitet og det var ingen tegn på mulig  $\text{NH}_3$ -giftighet.

<b>Adferdsregistreringer</b>	<b>Tank 1 før flytting til Tank 3</b>	<b>Tank 1 til Tank 3</b>	<b>Tank 2 før flytting til Tank 3</b>	<b>Tank 2 til Tank 3</b>
<b>Ballanseproblem/ legger seg på siden</b>	Nei	Nei	Nei	Nei
<b>Sedatert/rolig</b>	Litt, men fluktrespons ved håving	Nei	Litt, men fluktrespons ved håving	Nei
<b>Svømmer/aktiv</b>	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Gjellebevegelse</b>	Normal	Normal	Normal	Normal
<b>Fluktrespons</b>	Ja, ved håving	Ja, ved skygge over karet	Ja, ved håving	Ja, ved skygge over karet

Tabell 11. Resultat av atferdsregistreringer hos laks ved henholdsvis, Tank 1 før overføring til Tank 3, ved overføring fra Tank 1 til Tank 3. Tank 2 før overføring til Tank 3 og ved overføring av fisk fra Tank 2 til Tank 3.

### 8.3.1 Diskusjon

Normal transport av slaktelaks ligger rundet  $115-180 \text{ kg/m}^3$  for brønnbåt som går med åpne ventiler (Rosten et al. 2004), hvilket tilsvarer en tetthet på 15-18 %. En forstudie med lukket transport av slaktelaks og kjølesystemer, viste at fisken kan transporteres i lukket brønn 8-10 timer med tetthet omkring  $120/\text{m}^3$  uten dødelighet eller forringelse av kjøttkvaliteten (Stefansson et al. 2006). I dette forsøket lå tettheten på 10,4-12,4 %, med oppholdstid i tankene tilsvarende en transporttid på ca. 4 timer. Den eneste registrerte forskjellen i henhold til fisketetthet, var noe raskere reduksjon i pH for Tank 2 i forhold til Tank 1 (figur 39 og 40), der den stort sett lå med 0,1 pH-enhet under hva det ble registrert for i Tank 1. Ved økt biomasse og redusert vannutskiftning, vil konsentrasjonen av  $\text{CO}_2$  og TAN øke i transportvannet (Forsberg 1997). Lavere pH i Tank 2 tyder på høyere konsentrasjon av  $\text{CO}_2$  i denne tanken. For transport av laksefisk i lukkede systemer anbefales det ikke at konsentrasjonen av karbondioksid kommer over 60 mg/L når TAN og TOC er høy (Rosten et al. 2004; Stefansson et al. 2006). Selv om konsentrasjonen av  $\text{CO}_2$  kan nå høye nivåer under lukkede transporter, er  $\text{NH}_3$  som representerer den største faren i en lukket transport (Stefansson et al. 2006). Høye  $\text{CO}_2$  nivåer med påfølgende pH senkning i vannet vil motvirke giftigheten av ammoniakk (Hjeltnes et al. 2008; Rosten et al. 2004). Atferdsregistreringene tyder ikke på fare for ammoniakkforgiftning i de to tankene, det ble heller ikke påvist noen forskjeller i henhold til atferd mellom de ulike tetthetsgruppene. I begge tankene var fisken noe sedatert/rolig hvilket antagelig kommer av høye  $\text{CO}_2$  konsentrasjoner (Hjeltnes et al. 2008). Det ble observert en negativ effekt av oksygenovermetningen på fisken, som til tider lå veldig høy. Imidlertid vil høye oksygenkonsentrasjoner redusere giftigheten av  $\text{NH}_3$  (Colt &

Watten 1988). Konsekvensen av høye oksygenverdier på fisk er diskutert tidligere (2.1.1 og 5.3.2).

Akutte effekter av forhøyet ammoniakknivå i vannet til fisk kan føre til hyperventilering, overaktivitet og til slutt koma og kramper (Sigholt & Staurnes 1992). Ammoniakkforgiftning i forbindelse med lukket transport, blir i litteraturen i hovedsak beskrevet som et problem dersom pH i transportvannet er høy (Grøttum et al. 1997; Kiessling et al. 2006; Rosten et al. 2004) og i tilfelle med inntak av friskt sjøvann med høyere pH (Hjeltnes et al. 2008; Kiessling et al. 2006; Rosten et al. 2004). Dette var imidlertid ikke tilfellet for dette forsøket. Her ble fisken håvet *en* og *en* over fra tank med dårlig vannkvalitet (Tank 1 og 2) til tank med god vannkvalitet (Tank 3), og det oppsto derfor ingen blandingszone. Derimot blir det i litteraturen nevnt at et plutselig pH sjokk også kan være skadelig, spesielt på ungfisk (McGee & Cichra 1997). Imidlertid blir det også nevnt at innenfor pH-skala fra 6 til 9, kan en pH-endring på mindre enn 2 enheter bli tolerert av fisk flest (McGee & Cichra 1997). Ved overflytting av fisk fra Tank 1 til Tank 3 er pH endringen på 1,3 enheter, fra henholdsvis pH 6,7 til pH 8. Overflytting fra Tank 2 til Tank 3 er pH endringen på 1,4 enheter, fra henholdsvis pH 6,6 til pH 8, hvilket betyr at ingen av overflyttingene innebar en pH-endring over 2 enheter. Begrepet «*pH sjokk*» er også brukt i ett forsøk av Witschi & Ziebell (1979), der det ble undersøkt for effekt av pH sjokk ved overføring av regnbueørret (*Salmo gairdneri*) fra vann med en pH på 7,2 til vann med pH-verdier fra 8,5 til 10,0. Fiskens adferd ble nøye studert gjennom 48-timers eksponeringstester. All fisk overlevde i kontrollen (pH 7,2), og ved pH 8,5. Overlevelse var 88 % ved pH 9,0, 68 % ved pH 9,5 og 0 ved pH 10,0. Ved slutten av 48 timers eksponeringstid ble alle gruppene matet med deres normale pellets fôr. Ørret i kontrollgruppen og de holdt ved en pH på 8,5 spiste bra, mens bare et fåtall av fisken holdt ved pH 9,0, og ingen av ørretene holdt på pH 9,5 spiste (Witschi & Ziebell 1979). Imidlertid var det kun fisken fra gruppen holdt ved pH 10, som viste endringer i atferd etter 2,5 time, mens alle de øvrige gruppene viste normal atferd. Først etter 4,5 timer begynte fisk holdt ved pH 9,0 å bli delvis svakere og ørret holdt ved pH 9,6 betydelig svakere, og viste liten respons ved veiving av hånd over karet. De letale effektene av høy pH kan således like gjerne være en følge av ammoniakkgiftighet så vel som pH sjokk i dette forsøket, da konsentrasjonen av  $\text{NH}_3$  har hatt tid til å akkumuleres i vannet. Hvilket også blir poengtert av forfatterne av dette studiet.

Høyt innhold av  $\text{NH}_3$  er vist å føre til unnvikende atferd og redusert aktivitet hos karpe (*Cyprinus carpio*) (Israeli-Weinstein & Kimmel 1998). Redusert aktivitet kan tolkes som en utmattelsesrespons og et forsøk på å spare energi som trengs for å overvinne stresstilstanden (Israeli-Weinstein & Kimmel 1998). I dette forsøket viste fisken hverken tegn på unnvikende atferd eller redusert aktivitet ved overflytting til vann med høyere pH. Økt ventilasjon er også blitt observert hos Atlantisk laksesmolt eksponert for subletale konsentrasjoner av  $\text{NH}_3$  (Fivelstad et al. 1993). Laksen i dette forsøket viste normal gjellebevegelse og ingen tegn på økt ventilasjon ved overflytting til vann med høyere pH. Balanseproblem ved at fisken legger seg på siden er også blitt observert hos fisk eksponert for forhøyet ammoniakkonsentrasjoner (Meade 1985). Ingen slik atferd ble observert i dette forsøket. Det ble heller ikke observert noen fluktreaksjon for utenom situasjoner fisken normalt vil vise slik respons, som i dette forsøket ved håving og skygge over tanken. Nedsatt fluktrespons er en vanlig adferdsforstyrrelse ved gassblæresyke hos fisk (Skjelkvåle et al. 2007) og ble også observert i studie til Witschi & Ziebell (1979) som nevnt tidligere.

Under en undersøkelse av ammoniakk giftighet på Red drum (*Sciaenops ocellatus*), fant de at ved overføring av den ammoniakkeksponerte fisken til ammoniakkfritt vann, var 90 % av ammoniakken som hadde akkumulert i plasma under ammoniakkeksponeringen ikke lenger tilstedeværende etter 3,3 minutter (Wise et al. 1989). Konsentrasjonen av  $\text{NH}_3$  i Tank 1 og 2 i dette forsøket vil som følge av den lave pH være lav og en forhøyet ammoniakkverdi i blodet hos denne laksen er derfor ikke sannsynlig. Ut i fra det som blir rapportert av Wise et al. (1989) er det heller ikke sannsynlig at fisken vil få problemer med  $\text{NH}_3$ -giftighet så lenge vannet de overføres til ikke inneholder ammoniakk. Imidlertid er det vist at regnbueørret eksponert for alkaliske forhold ( $\text{pH} > 9$ ) hemmer ammoniakk (total ammoniakk) ekskresjonen hos fisk og kan resultere i dødelighet (LIN & Randall 1990; Wilkie & Wood 1991; Wilson et al. 1998) Under alkaliske forhold vil syrefangsten av  $\text{NH}_4^+$  reduseres, hvilket vil heve både vann- og plasmanivået av  $\text{NH}_3$  (Wilson et al. 1998). Under en klar hemming av ammoniakktutskillelse fra fisk eksponert for høy pH, vil ammoniakkinnholdet inne i fisken stige og kan utøve en toksisk virkning (Yesaki & Iwama 1992). Imidlertid representerer disse alkaliske forholdene rapportert her en betydelig høyere pH i vannet, enn hva som er tilfellet for Tank 3 i dette forsøket. Denne tanken hadde en pH på 8,0, hvilket er normal pH i sjøvann som laks naturlig oppholder seg i. Det ser ut til at laksen først vil få et problem dersom akkumuleringen av ammoniakk oppstår samtidig som pH i vannet blir holdt høy, eller eventuelt om pH hadde vært enda høyere. Det er også blitt observert at regnbueørret eksponert

for høy pH får redusert produksjon av ammoniakk, sannsynligvis som en strategi for å bøte på problemet med ammoniakk toksisitet når den utsettes for høy pH (Wilson et al. 1998).

I dette forsøket responderte fisken positivt (kviknet til) på å bli flyttet til en bedre vannkvalitet, hvilket i utgangspunktet er naturlig, men her ville vi undersøke om en mulig  $\text{NH}_3$ -giftighet kunne oppstå ved rask pH-endring i vannet. Med utgangspunkt i disse forsøksbetingelsene vil ikke overføring av fisk fra brønnbåt til ventemerde med en pH i sjøvannet på rundt 8, føre til  $\text{NH}_3$  giftighet hos fisken. Problem med ammoniakkgiftning kan allikevel oppstå dersom vannet i brønnbåten blandes med friskt sjøvann, eller ved lengere periode med lukket transport (Hjeltnes et al. 2008).

## 9. Oppsummering

### Ventemerdene

Resultat fra vannmålingene viser en tilsynelatende god vannkvalitet i ventemerdene hvor alle de registrerte parameterne ligger innenfor kravet om god fiskevelferd. Dette støttes oppunder lengere pre-rigorperiode, som indikerer at fisken var mindre stresset. Blodanalysen er noe mer usikker, der gruppene viste en lav blod pH i forhold til hva en normalt kan forvente hos uthvilt laks. Glukoseverdiene ligger også noe høyere enn basalnivået for ustresst laks og kan tyde på at fisken var stresset. Årsaken til det kan komme av at fisken ikke har hatt lang nok tid til restituering etter transport, som et direkte resultat av fangst i forbindelse med prøveuttak, eller som følge av trenging. Imidlertid ble det ikke funnet store forskjeller mellom gruppene fra trengt- og utrengtmerd, hvilket tyder på at stressresponsen ikke kommer av trengingen. Lave BE verdier tyder på høyt syreoverskudd, hvilket indikerer metabolsk acidose som betyr at fisken produserte mer syre enn den kvittet seg med. Dette kan oppstå ved intens muskelaktivitet.

### Kjøletank

Vannkvaliteten i kjøletanken ligger innenfor «tålbart» nivå for karbondioksid og pH, mens oksygenkonsentrasjonen ligger til tider svært høyt, hvilket tyder på ukontrollert dosering av hydrogenperoksid. Konsentrasjon av SS ligger langt over anbefalte grenseverdier og både SS målingene og karbondioksidmålingene viser at vannkvaliteten under levendekjøling av laks forringes gjennom en produksjonsdag. Overmetning av oksygen, forhøyet nivå av karbondioksid, høyt innhold av SS og lav pH er alle potensielt stressende faktorer for fisk. Som følge av høyt O<sub>2</sub> innhold i vannet vil fisken respondere med redusert ventilering og konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> i blodet øker, mens pH faller. Det ble funnet forhøyet nivå av karbondioksid i blodet og redusert pH i blodet hos denne gruppen. Laksen fra kjøletanken hadde en økt konsentrasjon av HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> samt redusert BE underskudd, hvilket tyder på en regulering i syrebasebalansen hos fisken og at bufferkapasiteten ikke er overskredet. Det ble også registrert en økt konsentrasjon av Na<sup>+</sup> og redusert konsentrasjon av K<sup>+</sup>, antagelig som et resultat av stress. Økning i plasma-glukose støtter opp under denne antagelsen, selv om det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene, ligger den registrerte plasma glukoseverdien 25 % over basalnivået for glukose hos uthvilt laks. Dette tyder på mobilisering av energi til muskelaktivitet. Som et resultat av stress får fisken fra kjøletanken en rask inntreden av rigor mortis. Det er åpenbart at fisken ikke roes ned i kjøletanken som er noe av hensikten med levendekjøling og antagelig vil også filetkvaliteten påvirkes negativt. Nedkjølingen av fisk etter levendekjøling gikk fra 12-7 °C. Noe lavere kjernetemperatur på

fisken er ønskelig for å imøtekomme mattilsynets krav på pakketemperatur på  $<4$  °C. Videre ser det heller ikke ut til at temperaturen i kjøletanken er tilstrekkelig til å sedatere fisken. I henhold til sedasjon ved hypotermi, er det viktig at fisken ikke utsettes for temperaturendring (intervall) og nedre temperaturgrenser som stresser fisken. Økt vannutskiftning og en jevnere tilsetning av hydrogenperoksid i kjølekaret vil bedre fiskevelferden under levendekjøling, hvilket sannsynligvis vil få betydning for produktkvaliteten. Imidlertid vil pumpingen av fisk fra slaktemerd til kjøletanken være en betydelig stresspåkjenning for fisken. I og med at det ikke ble foretatt noen undersøkelse av laks direkte etter pumping, er det usikkert hvilken tilleggseffekt dette har hatt på fisken hentet fra kjøletanken. Oppholdstiden i rørene er imidlertid en svært kortvarig prosess som varer i få sekunder. Fisken vil sannsynligvis ikke utmattes av dette.

### **Ensretterkar**

Alle de målte vannparameterne i ensretterkaret imøtekommer kravet om god dyrevelferd for laksefisk. Imidlertid kan det oppstå en blandingssone i ensretterkaret når vann fra kjøletanken blandes med vannet i ensretterkaret, som fører til en ustabil vannkjemi. Risikoen ved en slik blandingssone er fare for ammoniakkforgiftning. Imidlertid vil konsentrasjonen av TAN neppe bli så høy at dette vil være et problem i ensretterkaret. De fysiologiske undersøkelsene tyder på at fisken får en viss tid til restitusjon i ensretterkaret, med en liten økning i blod pH, mindre syreoverskudd (BE) og noe lavere verdier av plasma-glukose. De ser også ut til å ha en viss kompensasjon i ionebalansen, vist med redusert konsentrasjon av  $\text{Na}^+$  i plasma. Sammenlignet med gruppen fra kjøletank hadde laks fra denne gruppen betydelig lengere pre-rigorperiode.

### **Etter elektrisk bedøver**

Laks tatt ut etter bedøver viste lavest pH i blod, mindre kompensasjon med  $\text{HCO}_3^-$  og derav økt syreoverskudd (BE), tyder på at bufferkapasiteten i blodet er oppbrukt. I utgangspunktet skulle en også her forventet en stigning i glukose. Derimot hadde denne gruppen lavest glukoseinnhold i blod, i forhold til de øvrige gruppene. Muligens kommer det av at energilagrene allerede var lave etter trenging, pumping og levendekjøling, og derfor ikke mulig å mobilisere glukose. Pre-rigortid for denne gruppen ble redusert med 1 time sammenlignet med gruppen tatt ut etter ensretterkaret.

Hematokrit og hemoglobin ligger under referanseområdet for atlantisk laks hos alle gruppene. Dette sammen med lav pH i blod og noe forhøyet verdier av glukoseinnhold sammenlignet med uthvilt laks, tyder på at fisken var stresset allerede i ventemerdene, og parameterne

påvirkes i liten grad av levendekjøling, ensretterkar og av elektriskbedøving. Ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom gruppene for noen av disse parameterne.

#### **Oppsummering av forsøk IV**

I forbindelse med lukket brønnbåttransport vil transportvannet gradvis forringes. Spesielt viktig ved hensyn til vannkvaliteten under transport er akkumulering av ammonium/ammoniakk, der ammoniakk representerer den største risikoen for dødelighet på fisk. Dersom pH holdes høy kan selv små mengder av stoffet føre til akutt giftighet. Dette forsøket viste en gradvis forringing i vannkvaliteten for Tank 1 og 2, vist ved redusert pH i tankene. Redusert pH kommer som følge av karbondioksid produsert av fiskens stoffomsetning. Lav pH har en positiv effekt på ammoniakkgiftigheten, da den forskyver likevekten mot økt andel av den ioniserte formen ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) som er mindre giftig for fisk. PH i Tank 1 og 2 ble redusert til henholdsvis pH 6,7 og pH 6,6. Ved disse pH verdiene vil det meste av TAN produsert av fisken foreligge som  $\text{NH}_4^+$ . Oksygenkonsentrasjonen i Tank 1 og 2 var noe høy, og det ble til tider observert at fisken snappet luft i overflaten. Atferdsregistreringene ved overføring av fisk fra Tank 1 og 2 til Tank 3 med pH 8, viste ingen indikasjoner på negativ virkning av rask pH-økning. PH økningen i dette forsøket var på mindre enn 2 enheter og innenfor pH verdiene 6-9, er dette ansett å tolereres av fisk flest. Akutt ammoniakkforgiftning hemmer energimetabolismen i hjernen og symptomene på forgiftning vil derfor ofte være nevrologiske, som redusert svømmekapasitet, ubalanse i vannet og skjelving. Ingen slik atferd ble observert hos fisk ved overføring til høyere pH.



## 10. Konklusjon

### Vannkvalitet

Vannkvaliteten i ventemerdene (ikke trengt og trengt) var god og imøtekommer kriteriene for god vannkvalitet og fiskevelferd.

Temperaturen i kjøletanken lå høyere enn anbefalt temperatur for levendekjøling av fisk, men ligger innenfor foretrukket temperaturintervall for laks. Konsentrasjonen av karbondioksid økte gjennom en produksjonsdag og ligger innenfor «tålbart» nivå for laksefisk.

Oksygenmetningen varierte, men lå til tider langt over anbefalt grenseverdi. Suspensert stoff akkumuleres over en produksjonsdag og ligger langt over anbefalt grenseverdi. Økt vannutskiftning og en jevnere oksygenmetning i levendekjølingskaret vil bedre fiskevelferden under kjøling.

Vannkvaliteten i ensretterkaret var generelt god. Konsentrasjonen av karbondioksid økte også her gjennom en produksjonsdag, men ligger innenfor anbefalte grenseverdier for laks.

### Blodanalyser og rigorutvikling

De fysiologiske undersøkelsene tyder på at laksen fra ventemerdene var minst stresset, men tilsynelatende ikke ustresset. Stressresponsen kan ikke tilskrives vannkvaliteten, men kan være en følge av håndtering eller for kort restitusjonstid etter transport. Potensiell pre-rigortid var i underkant av 20 timer. Endringer i syre-basereguleringen og ionebalansen viser ytterligere stressreaksjon hos fisk i kjøletank, og en rask rigorutvikling tyder på en betydelig påkjenning hos fisken i denne gruppen og kan være et direkte resultat av vannkvaliteten i kjøletanken. Videre ser ut til at fisken får noe tid til å innhente seg i ensretterkaret og får en betydelig lengere rigorutvikling som går fra 4 timer i kjøletank til 9 timer etter ensretterkar. Elektrisk bedøver forkortet tiden før rigor mortis med 1 time sammenlignet med gruppen fra ensretterkaret. Blodanalysen for dette uttaket tyder på bufferkapasiteten er overskredet og at fisken er utmattet.

Det kritiske punktet i slaktelinjen er kjøletanken. Levendekjølingen senket temperaturen på fisken, men med så rask inntreden av rigor som ble registrert hos laks i fra kjøletanken, forsvinner mye av hensikten med levendekjølingen. Derimot melder mange næringsaktører om at kjøling av fisk er vanskelig etter at levendekjøling ble faset ut og flere ønsker å tilbakeføre levendekjøling

**Effekt av rask pH økning på fisk**

Laksen responderte positivt på overflytting til tank med bedre vannkvalitet, der den kviknet til. Resultatet antyder at overføring av laks fra brønnbåt til ventemerde ikke vil medføre fare for  $\text{NH}_3$ -forgiftning, sett ut fra disse forsøksbetingelsene.

## 12. Referanseliste

- Abe, H. & Okuma, E. (1991). Rigor-mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. *Nipp. Suis. Gakk.*, 57 (1991), pp. 2095–2100.
- Agnalt, A., Ervik, A., Kristiansen, T. S. & Oppedal, F. r. (2004). Havbruksrapport 2004. *Fisken og havet, særnr. 3-2004*, 0802-0620. Bergen: Instituttet.
- Akse, L., Erikson, U., Mjedell, C. M., Midling, K., Robertsen, R. & Stenevik, I. H. (2006). Rapport-behandling av laks-viktige momenter relatert til slakting og Pre Rigor produksjon. Fiskeri- og havbruksnæringens landsforening. s. 4-39.  
[http://fhl.nsp01cp.nhosp.no/files/Rapport\\_slakting\\_versjon\\_10-1-2006.pdf](http://fhl.nsp01cp.nhosp.no/files/Rapport_slakting_versjon_10-1-2006.pdf).
- Akvakulturdriftsforskriften. (2008). *Forskrift om drift av akvakulturanlegg*.  
<http://www.lovdatab.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>.
- Amend, D. F., Croy, T. R., Goven, B. A., Johnson, K. A. & McCarthy, D. H. (1982). Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon dioxide, pH, and bacterial growth. *Transactions of the American Fisheries Society*, 111 (5): 603-611.
- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Collins, J. D., Griffin, J., Hald, T., Havelaar, A., Hope, J., Klein, G., McLauchlin, J., et al. (2009). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from The European Commission on Food Safety considerations concerning the species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish. *The EFSA Journal* 1190: 1-16.
- Bath, R. & Eddy, F. (1979). Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. *The Journal of Experimental Biology*, 83 (1): 193-202.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A. & McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental biology of fishes*, 58 (3): 237-275.
- Berg, T., Erikson, U. & Nordtvedt, T. (1997). Rigor mortis assessment of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and effects of stress. *Journal of Food Science*, 62 (3): 439-446.
- Bergheim, A., Gausen, M., Næss, A., Hølland, P. M., Krogedal, P. & Crampton, V. (2006). A newly developed oxygen injection system for cage farms. *Aquacultural engineering*, 34 (1): 40-46.
- Bernier, N. & Randall, D. (1998). Carbon dioxide anaesthesia in rainbow trout: effects of hypercapnic level and stress on induction and recovery from anaesthetic treatment. *Journal of Fish Biology*, 52 (3): 621-637.
- Bilotta, G. & Brazier, R. (2008). Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research*, 42 (12): 2849-2861.
- Boutilier, R., Dobson, G., Hoeger, U. & Randall, D. (1988). Acute exposure to graded levels of hypoxia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): metabolic and respiratory adaptations. *Respiration physiology*, 71 (1): 69-82.
- Brix, O. (1992). *Kap. 5. Regulering av kroppsvæsker. Syre-base regulering. Døving, K. & Reimers, E. (red). Fiskens fysiologi: John Grieg Forlag 1992: 215-226.*
- Bruno, D. & Raynard, R. (1994). Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Aquaculture International*, 2 (1): 10-18.
- Brunstad, A. I. & Harsvik, M. (2011). *Evaluering av slaktesystemer for Atlantisk laks (Salmo Salar L.)* Upublisert manuskript.
- Burton, C. B. & Murray, S. A. (1979). Effects of density on goldfish blood—I hematology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 62 (3): 555-558.

- Butler, P., Day, N. & Namba, K. (1992). Interactive effects of seasonal temperature and low pH on resting oxygen uptake and swimming performance of adult brown trout *Salmo trutta*. *Journal of experimental biology*, 165 (1): 195-212.
- Butler, P. & Day, N. (1993). The relationship between intracellular pH and swimming performance of brown trout exposed to neutral and sublethal pH. *Journal of experimental biology*, 176 (1): 271-284.
- Børsheim, K. Y. & Golmen, L. (2010). Forsuring av havet. Kunnskapsstatus for norske farvann. Statens forurensningstilsyn (Klima- og forurensningsdirektoratet). 96 s.
- Caggiano, M. (2000). Quality in harvesting and post-harvesting procedures-influence on quality. Fish freshness and quality assessment for sea bass and sea bream. *Cahiers Options Méditerranées*, 51: 55-61.
- Caldwell, C. A. & Hinshaw, J. (1994). Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture*, 126 (1): 183-193.
- Carey, J. B. & McCormick, S. D. (1998). Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, 168 (1): 237-253.
- Colt, J. & Watten, B. (1988). Applications of pure oxygen in fish culture. *Aquacultural Engineering*, 7 (6): 397-441.
- CTI-Scheets. (2013a). *BUN/Urea. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714176-00M* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=B4F28A29F77B4513ABE022D0F9964B17&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013b). *Chloride/Cl. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714175-00L* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=ABF7F34F24254898A5A5CC9D2F2325C5&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013c). *Glucose/Glu. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714177-00P* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=E4D1C3EB64D04502BAC9F40519B11193&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013d). *Hematocrit/Hct and calculated Hemoglobin/Hb. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714178-00M* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=E43DCF174951438E832ABF4CDC5B2A07&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013e). *PCO2 and calculated values for HCO3, Base Excess and Anion Gap. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714182-00T* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=8024C5D4DD49415E948A6A09434CB6DD&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013f). *pH. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714181-00M* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=70C9279CDE4447E6AB13E884E00DC210&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013g). *Potassium/K. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714174-00K* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=98BD7D7A01DD47E2889C009A1D4D7EDC&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013h). *Sodium/Na. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 714173-00N* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=2D4E0024227B40E6AEA31C5D92CEAAE6&lang=en>.
- CTI-Scheets. (2013i). *Total Carbon Dioxide/TCO2. Cartridge and Test Information Sheets. Abbot Point of Care: Art: 716661-00G* hentet fra <http://www.abbottpointofcare.com/Customer-Info-Center/ViewFile.aspx?id=E65E7661A64044BC93D8C95E6A6DC470&lang=en>.

- Day, N. & Butler, P. (1996). Environmental acidity and white muscle recruitment during swimming in the brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of experimental biology*, 199 (9): 1947-1959.
- Dean, J. M. (1976). Temperature of tissues in freshwater fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105 (6): 709-711.
- Donaldson, M., Cooke, S., Patterson, D. & Macdonald, J. (2008). Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology*, 73 (7): 1491-1530.
- Downing, K. M. & Merkens, J. (1955). THE INFLUENCE OF DISSOLVED-OXYGEN CONCENTRATION ON THE TOXICITY OF UN-IONIZED AMMONIA TO RAINBOW TROUT (*SALMO GAIRDNERII* RICHARDSON). *Annals of Applied Biology*, 43 (2): 243-246.
- Dunn, J. & Hochachka, P. (1986). Metabolic responses of trout (*Salmo gairdneri*) to acute environmental hypoxia. *Journal of experimental biology*, 123 (1): 229-242.
- Eddy, F. (1976). Acid-base balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) subjected to acid stresses. *The Journal of Experimental Biology*, 64 (1): 159-171.
- Eddy, F., Lomholt, J., Weber, R. E. & Johansen, K. (1977). Blood respiratory properties of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) kept in water of high CO<sub>2</sub> tension. *The Journal of experimental biology*, 67 (1): 37-47.
- Eddy, F. (1981). Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. *Stress and fish*: 77-102.
- Edsall, D. A. & Smith, C. E. (1990). Performance of rainbow trout and Snake River cutthroat trout reared in oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*, 90 (3): 251-259.
- Eilertsen, S. (2008). Islagring av torsk (*Gadus morhua*) og brosme (*Brosme brosme*): Har brosme spesiell lang holdbarhet?
- Ellis, M. M. (1937). Detection and measurement of stream pollution. *Bulletin of the Bureau of Fisheries;(United States)*, 48 (22).
- Emerson, K., Russo, R. C., Lund, R. E. & Thurston, R. V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32 (12): 2379-2383.
- Erikson, U., Sigholt, T. & Seland, A. (1997). Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 149 (3): 243-252.
- Erikson, U. (2001). Excess mucus on gill surfaces can also occur at low water pH levels (see Shepard, 1994). S. Kestin, P. Wariss (Eds.), *Farmed Fish Quality*, Blackwell Science, Oxford (2001), pp. 202–219.
- Erikson, U., Hultmann, L. & Erik Steen, J. (2006). Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia: I. Establishing a method for large-scale processing of farmed fish. *Aquaculture*, 252 (2): 183-198.
- Espmark, Å. M., Humborstad, O.-B. & Midling, K. Ø. (2012). *Pumping av torsk og laks, faktorer som påvirker velferd og kvalitet*, b. 6/2012. Tromsø: Nofima. 56, 20 s. : ill. s.
- Evensen, S. A. (2009, 13. februar). *Mchc. I Store medisinske leksikon*. Hentet 24. oktober 2013 fra <http://sml.snl.no/MCHC>.
- Evensen, T. H., Kristiansen, F. & Midling, K. Ø. (2008). Levende Hyse: Overlevelse, utmattelse og restitusjon hos hyse fanget med snurrevad. .
- Fivelstad, S., Kallevik, H., Iversen, H. M., Møretrø, T., Våge, K. & Binde, M. (1993). Sublethal effects of ammonia in soft water on Atlantic salmon smolts at a low temperature. *Aquaculture International*, 1 (2): 157-169.
- Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G. & Olsen, A. B. (1998). Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. *Aquaculture*, 160 (3): 305-316.

- Fivelstad, S., Waagbø, R., Stefansson, S. & Olsen, A. B. (2007). Impacts of elevated water carbon dioxide partial pressure at two temperatures on Atlantic salmon (< i> Salmo salar</i> L.) parr growth and haematology. *Aquaculture*, 269 (1): 241-249.
- Forsberg, O. (1997). The impact of varying feeding regimes on oxygen consumption and excretion of carbon dioxide and nitrogen in post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture research*, 28 (1): 29-41.
- Foss, A., Røsnes, B. & Øiestad, V. (2003). Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (< i> Anarhichas minor</i> Olafsen): effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquaculture*, 220 (1): 607-617.
- Foss, A., Grimsbø, E., Vikingstad, E., Nortvedt, R., Slinde, E. & Roth, B. (2012). Live chilling of Atlantic salmon: physiological response to handling and temperature decrease on welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38 (2): 565-571.
- Fossum, S. (2009). *Mitokondrie. I Store medisinske leksikon (2009, 13. februar). Hentet 5. desember 2013 fra <http://sml.sn.no/mitokondrie>.*
- Fridell, F., Gadan, K., Sundh, H., Taranger, G., Glette, J., Olsen, R., Sundell, K. & Evensen, Ø. (2007). Effect of hyperoxygenation and low water flow on the primary stress response and susceptibility of Atlantic salmon< i> Salmo salar</i> L. to experimental challenge with IPN virus. *Aquaculture*, 270 (1): 23-35.
- Fromm, P. O. (1980). A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Environmental Biology of fishes*, 5 (1): 79-93.
- Gatica, M., Monti, G., Knowles, T. & Gallo, C. (2010). Muscle pH, rigor mortis and blood variables in Atlantic salmon transported in two types of well-boat. *The Veterinary record*, 166 (2): 45.
- Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. & Anderson, L. G. (1999). *Methods of seawater analysis*. Weinheim: Wiley-VCH. XXXII, 600 s. : ill. s.
- Green, A. A. & Root, R. W. (1933). The equilibrium between hemoglobin and oxygen in the blood of certain fishes. *Biological Bulletin*, 64 (3): 383-404.
- Grøttum, J., Staurnes, M. & Sigholt, T. (1997). Effect of oxygenation, aeration and pH control on water quality and survival of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), kept at high densities during transport. *Aquaculture Research*, 28 (2): 159-164.
- Grøttum, J. A. & Sigholt, T. (1998). A model for oxygen consumption of Atlantic salmon (< i> Salmo salar</i>) based on measurements of individual fish in a tunnel respirometer. *Aquacultural engineering*, 17 (4): 241-251.
- Gunn, D. (1942). Body temperature in poikilothermal animals. *Biological Reviews*, 17 (4): 293-314.
- Handeland, S., Järvi, T., Fernö, A. & Stefansson, S. (1996). Osmotic stress, antipredatory behaviour, and mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53 (12): 2673-2680.
- Harmon, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture*, 1 (1): 58-66.
- Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M. (2007). *Alcohols, Phenols, and Thiols. In Organic chemistry: a short course: 207-233*. Boston: Houghton Mifflin. XXIV, 577 s. : ill. s.
- Heath, A. G. & Pritchard, A. W. (1965). Effects of severe hypoxia on carbohydrate energy stores and metabolism in two species of fresh-water fish. *Physiological Zoology*, 38 (4): 325-334.
- Helle, K. B. (1990). *Kap. 2 Anatomi og fysiologi hos fisk. Fysiologi. Poppe, T. (Red.)Fiskehelse: sykdommer, behandling, forebygging: 63-83. . [Bergen]: John Grieg. 422 s. : ill. s.*

- Helsness, H. (2005). *Prøvetakning og karakterisering av avløpsvann for primærrensing. SINTEF Vann og miljø. TEKNA 12-13. april 2005. Manus.ppt. fra [www.tenkna.no](http://www.tenkna.no)*
- Hjeltnes, B., Waagbø, R., Finstad, B., Rosseland, B. O., Rosten, T. & Stefansson, S. e. (2008). Transportation of fish within a closed system. Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. 14 May 2008. Vitenskapskomiteen for mattrygghet (Norwegian Scientific Committee for Food Safety) 07/806-Final: 63 pp. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, [Oslo]. ISBN: 978-82-8082-242-0
- Hosfeld, C. D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T. M., 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): 146-153.
- Hovland, E., Møller, D. & Vik, S. (2010). *Åkeren kan òg være blå: et riss av havbruksnæringens utvikling i Norge*. [Oslo]: [ABM-utvikling]. 38 s. : ill. s.
- Huss, H. H. (1988). *Fresh Fish-Quality and Quality Changes: A Training Manual Prepared for the FAO/DANIDA Training Programme on Fish Technology and Quality Control*: Food & Agriculture Org.
- ILAB. (2005). Bedøving og avliving av store mengder oppdrettsfisk utenfor slakteri. Utredning for Vitenskapskomiteen for Mattrygghet (VKM). Gjennomført av Stiftelsen Industrielaboratoriet (ILAB). Bergen 4. april 2005; 3-46.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M. & Kikkawa, T. (2008). Fishes in high-CO<sub>2</sub>, acidified oceans. *Marine Ecology Progress Series*, 373: 295-302.
- Israeli-Weinstein, D. & Kimmel, E. (1998). Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture*, 165 (1): 81-93.
- Jewett, M. G., Behmer, D. J. & Johnson, G. H. (1991). Effects of hyperoxic rearing water on blood hemoglobin and hematocrit levels of rainbow trout. *Journal of aquatic animal health*, 3 (3): 153-160.
- Jobling, M. (1992). Kap. 6. *Ernæring og metabolisme. Energiomsetning og vekst. Døving*, K. & Reimers, E. (red). *Fiskens fysiologi: John Grieg Forlag 1992*: 258-276.
- Jobling, M. (1994). *Fish bioenergetics*. London: Chapman & Hall. XIV, 309 s. : ill. s.
- Jørgensen, J. B. & Mustafa, T. (1980). The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder (*Platichthys flesus* L.)—I. Utilization of glycogen and accumulation of glycolytic end products in various tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 67 (2): 243-248.
- Kiessling, A., Espe, M., Ruohonen, K. & Mørkøre, T. (2004). Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO<sub>2</sub> anaesthesia. *Aquaculture*, 236 (1): 645-657.
- Kiessling, A., Bjørnevik, M., Thomassen, M., Rørå, M. B., Mørkøre, T., Roth, B., Erikson, U. & Jordheim, O. (2006). Fra merd til kjøkkenbord. I *Havbruksforskning: fra merd til mat : havbruk - produksjon av akvatiske organismer (2000-2005)*. Oslo, Norges forskningsråd: 43-60. . I.
- 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 (1): 261-274.
- Kristensen, T., Rosseland, B. O., Kiessling, A., Djordevic, B. & Massabau, J. (2010). Lack of arterial PO<sub>2</sub> downregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during long-term normoxia and hyperoxia. *Fish physiology and biochemistry*, 36 (4): 1087-1095.
- Kristiansen, T. S. & Samuelsen, O. B. (2006). Fiskevelferd ved bruk av slaktemerd for oppdrettsfisk. Utredning for Mattilsynet. Havforskningsinstituttet, Bergen.

- LaboratorieHåndBok-Ahus. *Base Excess (BE)* (v. 1.2). utarbeidet ved: Ahus/Divisjon for diagnostikk og teknologi/Tverrfaglig laboratoriemedisin og medisinsk biokjemi. hentet 14. oktober 2013 fra [http://old.ahus.no/eqs/labhbok/docs/doc\\_22250/index.html](http://old.ahus.no/eqs/labhbok/docs/doc_22250/index.html).
- Lekang, O.-I. & Fjæra, S. O. (1997). *Teknologi for akvakultur*. [Oslo]: Landbruksforlaget. 419 s. : ill. s.
- Lekang, O.-I. & Fjæra, S. O. (2002). *Vannkvalitet i akvakultur: teknisk fagskole, linje for naturbruk : fordypningsområde akvakultur*. Oslo: Gan. 58 s. : ill. s.
- Liao, P. B. (1971). Water requirements of salmonids. *The Progressive Fish-Culturist*, 33 (4): 210-215.
- LIN, H. & Randall, D. (1990). The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 149 (1): 149-160.
- Lloyd, R. (1961). Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Journal of Experimental Biology*, 38 (2): 447-455.
- Lolekha, P. H. & Lolekha, S. (1983). Value of the anion gap in clinical diagnosis and laboratory evaluation. *Clinical Chemistry*, 29 (2): 279-283.
- Love, R. M. (1975). Variability in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the northeast Atlantic: a review of seasonal and environmental influences on various attributes of the flesh. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32 (12): 2333-2342.
- Love, R. M. (1980). *The Chemical Biology of Fishes (Volume 2)*: Academic Press London.
- Lowe, T., Ryder, J., Carragher, J. & Wells, R. (1993). Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. *Journal of Food Science*, 58 (4): 770-773.
- Lucena, J. J. (2000). Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *Journal of Plant Nutrition*, 23 (11-12): 1591-1606.
- Lund, V. (2005). Utredning om CO<sub>2</sub>-bedøving av gris. Veterinærinstituttet 11.
- Lushchak, V. I. & Bagnyukova, T. V. (2006). Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144 (3): 283-289.
- Lygren, B., Hamre, K. & Waagbø, R. (2000). Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed three different levels of dietary vitamin E. *Aquaculture Research*, 31 (4): 401-407.
- Lynum, L. (2005). *Videreforedling av fisk*: Tapir Akademisk Forlag.
- Lynum, L. & Rustad, T. (2005). *Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring*. Trondheim: Tapir. 261 s. : ill. s.
- Marco, D. (2001). Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 17 (3): 115-120.
- Massabuau, J.-C. (2003). Primitive, and protective, our cellular oxygenation status? *Mechanisms of ageing and development*, 124 (8): 857-863.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2000). *Carbohydrate Metabolism I: Anaerobic Processes in Generating Metabolic Energy*. In *Biochemistry*: 446-482. San Francisco, Calif.: Benjamin/Cummings. 1186 s.
- Mathews, C. K., Ahern, K. G. & Van Holde, K. E. (2000). *Electron Transport, Oxidative Phosphorylation, and Oxygen Metabolism*. In *Biochemistry*: 522-559. San Francisco, Calif.: Benjamin/Cummings. .
- Mazur, C. F. & Iwama, G. K. (1993). Handling and crowding stress reduces number of plaque-forming cells in Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5 (2): 98-101.



- McDonald, D. & Wood, C. (1981). Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. *Journal of Experimental Biology*, 93 (1): 101-118.
- McDonald, G. & Milligan, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. *Fish stress and health in aquaculture*, 62: 119-145.
- McGee, M. & Cichra, C. (1997). Fish Handling and Transport1. University of Florida. IFAS Extension. FA3: 1-2.
- McWilliams, P. (1992). Kap. 5. *Regulering av kroppsvæsker. Inoeregulering. Døving*, K. & Reimers, E. (red). *Fiskens fysiologi: John Grieg Forlag 1992: 198-214*.
- Meade, J. W. (1985). Allowable ammonia for fish culture. *The Progressive Fish-Culturist*, 47 (3): 135-145.
- Mejdell, C. M., Midling, K. Ø., Erikson, U., Evensen, T. H. & Slinde, E. (2009). Slaktesystemer for laksefisk i 2008 – fiske-velferd og kvalitet. . *Veterinærinstituttets rapportserie 01-2009*. Oslo; Veterinærinstituttets 2009.
- Merknad-til-akvakulturdriftsforskriften. (2004). *Merknader til Forskrift 22. desember 2004 nr. 1785 om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften)* [http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00012/Merknader\\_til\\_forskr\\_12075a.pdf](http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00012/Merknader_til_forskr_12075a.pdf).
- Midling, K. Ø., Mejdell, C., Olsen, S. H., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., Aas, K., Harris, S., Oppedal, K. & Femsteinevik, Å. (2008). Slaktning av oppdrettslaks på båt, direkte fra oppdrettsmerd. . *Nofima rapport 6, 2008. 59s*.
- Muller-Feuga, A., Petit, J. & Sabaut, J. (1978). The influence of temperature and wet weight on the oxygen demand of rainbow trout (< i> *Salmo gairdneri*</i> R.) in fresh water. *Aquaculture*, 14 (4): 355-363.
- Nawata, C. M., Hung, C. C., Tsui, T. K., Wilson, J. M., Wright, P. A. & Wood, C. M. (2007). Ammonia excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for Rh glycoprotein and H<sup>+</sup>-ATPase involvement. *Physiological genomics*, 31 (3): 463-474.
- Nilsen, A., Gismervik, S. & Biering, E. (2011). Utvikling av fremtidens brønnbåtteknologi – smittehygiene og fi skevelferd. Veterinærinstituttets rapportserie 13-2011. Oslo: Veterinærinstituttet; 2011. ISSN 1890-3290 elektronisk utgave. .
- Norskfiskeoppdrett. (2009). *Lakselus. Norsk fiskeoppdrett. Nr 6a. 1 juni 2009 i årgang 43*. [http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/06/Lakselus\\_NF\\_nr\\_6A\\_2009.pdf](http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/06/Lakselus_NF_nr_6A_2009.pdf).
- Olaisen, A. (2007). Vurdering av vannprøver fra transport av torskeyngel. NIVA rapport: Rekv.nr.2007-1424. <http://www.nceaquaculture.com/sites/nceaquaculture.com/files/273946061.pdf>.
- Olsen, S. H., Sorensen, N. K., Stormo, S. K. & Elvevoll, E. O. (2006). Effect of slaughter methods on blood spotting and residual blood in fillets of Atlantic salmon (< i> *Salmo salar*</i>). *Aquaculture*, 258 (1): 462-469.
- Olsen, S. H. & Elvevoll, E. O. (2011). pH-induced shift in hemoglobin spectra: a spectrophotometric comparison of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and mammalian hemoglobin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (4): 1415-1422.
- Opdahl, H. (2009, 13. februar). *Anion Gap. I Store medisinske leksikon. Hentet 10. oktober 2013 fra* [http://sml.snl.no/anion\\_gap](http://sml.snl.no/anion_gap).
- Packer, R. K. & Dunson, W. A. (1970). Effects of low environmental pH on blood pH and sodium balance of brook trout. *Journal of Experimental Zoology*, 174 (1): 65-71.
- Packer, R. K. & Dunson, W. A. (1972). Anoxia and sodium loss associated with the death of brook trout at low pH. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 41 (1): 17-26.

- Packer, R. K. (1979). Acid-base balance and gas exchange in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to acidic environments. *Journal of Experimental Biology*, 79 (1): 127-134.
- Poleo, A. B. S. (1992). Kap. 10. Miljørelatert fysiologi. *Fisk i surt vann*. Døving, K. & Reimers, E. (red). *Fiskens fysiologi: John Grieg Forlag 1992: 391-400*.
- Poli, B., Parisi, G., Scappini, F. & Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13 (1-2): 29-49.
- Portz, D. E., Woodley, C. M. & Cech Jr, J. J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16 (2): 125-170.
- Powell, M. & Perry, S. (1997). Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout blood during exposure to chloramine-T under hypoxia and hyperoxia. *Journal of fish biology*, 50 (2): 418-428.
- Proctor, M. R. & McLoughlin, J. (1992). *The Effects of Anaesthesia and Electrical Stunning on Chemical Changes in the Myotomal Muscle of Salmo salar Post-Mortem*. Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science: JSTOR. 53-59 s.
- Rach, J., Schreier, T., Howe, G. & Redman, S. (1997). Effect of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish. *The Progressive fish-culturist*, 59 (1): 41-46.
- Randall, D. (1970). 7 Gas Exchange in Fish. *Fish physiology*, 4: 253-292.
- Randall, D. (1991). The impact of variations in water pH on fish. *Aquaculture and water quality*, 3.
- Randall, D. & Tsui, T. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine pollution bulletin*, 45 (1): 17-23.
- Redding, J. M. & Schreck, C. B. (1983). Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112 (6): 800-807.
- Robb, D., Kestin, S. & Warriss, P. (2000). Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture*, 182 (3): 261-269.
- Robb, D. & Kestin, S. (2002). Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Animal welfare*, 11 (3): 269-282.
- Robertson, M. J., Scruton, D. A. & Clarke, K. D. (2007). Seasonal effects of suspended sediment on the behavior of juvenile Atlantic salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 136 (3): 822-828.
- Rohn, T. T., Hinds, T. R. & Vincenzi, F. F. (1993). Ion transport ATPases as targets for free radical damage: Protection by an aminosteroid of the Ca<sup>2+</sup> pump atpase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump ATPase of human red blood cell membranes. *Biochemical pharmacology*, 46 (3): 525-534.
- Rohn, T. T., Hinds, T. R. & Vincenzi, F. (1996). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-pump ATPase and the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump ATPase by iron-generated free radicals: Protection by 6, 7-dimethyl-2, 4-di-1-pyrrolidinyl-7H-pyrrolo [2, 3-d] pyrimidine sulfate (U-89843D), a potent, novel, antioxidant/free radical scavenger. *Biochemical pharmacology*, 51 (4): 471-476.
- Rosseland B. O., Jacobsen, P. & Grande, M. (1990). *Miljørelaterte tilstander*. In: Poppe T. (red.) *Fiskehelse: sykdommer, behandling, forebygging: 279-293*. [Bergen]: John Grieg. 422 s. : ill. s.
- Rosten, T., Åtland, Å., Kristensen, T., Braaten, B., Rosseland, B. O. & Winther, U. (2004). Vannkvalitet og dyrevelferd. Utredning for Mattilsynet. KPMG Senter for havbruk og fiskeri. 85 s.

- Rosten, T., Kristensen, T., Rosseland, B. O. & Grøttum, J. A. (2007). Kap. 6. Transport av levende fisk. Brønnbåttransport av smolt i åpent, lukket og kombinert system. Bjercknes, V. (red) *Vannkvalitet og smoltproduksjon*. Juul Forlag 2007: 205-208.
- Rosten, T. W., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Terjesen, B. F., Biering, E. & Winther, U. (2011). Oppdrett av laks og ørret i lukkede anlegg – forprosjekt. Rapport SINTEF Fiskeri og havbruk, nr. A21169. 74 s. .
- Roth, B., Moeller, D., Veland, J., Imsland, A. & Slinde, E. (2002). The effect of stunning methods on rigor mortis and texture properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 67 (4): 1462-1466.
- Roth, B., Slinde, E. & Arildsen, J. (2006). Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture*, 257 (1): 504-510.
- Roth, B., Slinde, E. & Robb, D. H. (2006). Field evaluation of live chilling with CO<sub>2</sub> on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. *Aquaculture Research*, 37 (8): 799-804.
- Roth, B., Grimsbø, E., Slinde, E., Foss, A., Stien, L. H. & Nortvedt, R. (2012). Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. *Aquaculture*, 326: 178-180.
- Russo, R. C. & Thurston, R. V. (1991). *Toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to fishes*. Brune, David E., Tomasso, Joseph R. (edit) *Aquaculture and water Quality. Advances in World Aquaculture, Volume 3, s. 58-89*. . Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society. 606 s. : ill. s.
- Sandnes, K., Lie, Ø. & Waagbø, R. (1988). Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 32 (1): 129-136.
- Schreiner, K. (1992). Kap. 8. Bevegelse. Bevegelsesmekanikk. Døving, K. & Reimers, E. (red). *Fiskens fysiologi: John Grieg Forlag 1992: 338-343*.
- Sigholt, T. & Staurnes, M. (1992). Kap. 10. Miljørelatert fysiologi. Stress. Døving, K. & Reimers, E. (red). *Fiskens fysiologi: John Grieg Forlag 1992: 382-390*.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. & Seland, A. (1997). Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science*, 62 (4): 898-905.
- Skjelkvåle, B. L., Bjercknes, V., Hindar, A., Kaste, Ø., Kristensen, T., Rosseland, B. O., Salbu, B., Teien, H. C. & Åtland, Å. (2007). Kap. 2. Vannkjemi. Bjercknes, V. (red) *Vannkvalitet og smoltproduksjon*. Juul Forlag 2007: 57-93.
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O. & Østby, P. B. (1999). Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture*, 175 (1): 93-101.
- Skjervold, P. O., Bencze Rørå, A. M., Fjæra, S. O., Vegusdal, A., Vorre, A. & Einen, O. (2001a). Effects of pre-, in-, or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. *Aquaculture*, 194 (3): 315-326.
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., Østby, P. B. & Einen, O. (2001b). Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192 (2): 265-280.
- Skuladottir, G., Schiöth, H., Gudmundsdottir, E., Richards, B., Gardarsson, F. & Jonsson, L. (1990). Fatty acid composition of muscle, heart and liver lipids in Atlantic salmon, *Salmo salar*, at extremely low environmental temperature. *Aquaculture*, 84 (1): 71-80.
- Slakteriforeskriften. (2006). Forskrift om slakterier og tilvirkingsanlegg for akvakulturdyr <http://www.lovdatabasen.no/dokument/SF/forskrift/2006-10-30-1250>.

- Slinde, E., Grimsbø, E. & Kristiansen, T. S. (2013). Slakting av oppdrettfisk. Svar på spørsmål fra mattilsynet knyttet til fiskevelferd og slakteprosessen. . *Rapport fra Havforskningen, Nr. 15-2013*.
- Smart, G. (1978). Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations. *Journal of Fish Biology*, 12 (1): 93-104.
- Spotte, S. & Adams, G. (1983). Estimation of the allowable upper limit of ammonia in saline waters. *Marine Ecology Progress Series*, 10: 207-210.
- SSB. (2012). *Statistisk sentralbyrå. Akvakultur 2011, endelige tall. Publisert: 3. desember 2012* <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar>.
- SSB. (2013). *Statistisk sentralbyrå. Akvakultur 2012, foreløpige tall. Publisert: 6. juni 2013* <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-forelopige>.
- Stefansson, S., Bæverfjord, G., Finn, R. N., Finstad, B., Fivelstad, S., Handeland, S., Kristensen, T., Kroglund, F., Rosseland, B. O., Rosten, T., et al. (2006). Vannkvalitet-laksefisk. I *Havbruksforskning: fra merd til mat : havbruk - produksjon av akvatiske organismer (2000-2005)*. Oslo: Norges forskningsråd: 95-112.
- Stefansson, S., Bjerknes, V., Bjørn, P. A., Bæverfjord, G., Finn, R. N., Finstad, B., Fivelstad, S., Handeland, S., Hosfeld, C. D., Kristensen, T., et al. (2007). Kap. 3. Fysiologiske egenskaper ved rogn, yngel og smolt. Bjerknes, V. (red) *Vannkvalitet og smoltproduksjon*. Juul Forlag 2007: 94-124.
- Stefansson, S. O., Holm, J. C., Taranger, G. L., Hávarðsson, B. & Ingvill Berge, Å. I. (2002). Oppdrett av laks og aure i Norge: forelesningskompendium BFM240 "Grunnkurs i akvakultur". Bergen: Universitetet i Bergen. Institutt for fiskeri- og marinbiologi. Utgave januar 02. s. 105.
- Stefansson, S. O., Bæverfjord, G., Handeland, S. O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B. O., Rosten, T., Toften, H. & Havardsson, B. (2005). Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt.
- Stevens, E. & Sutterlin, A. (1976). Heat transfer between fish and ambient water. *Journal of Experimental Biology*, 65 (1): 131-145.
- Sybakmoen, S. (2011). *Resirkulering vs gjennomstrømningsanlegg. Medlemsmøte i Fhl Nordnorsk Havbrukslag. Bodø, Thon hotell 18-19. oktober 2011. Presentert den 19. oktober 2011 fra* <http://www.fhl.no/getfile.php/DOKUMENTER/GSA%20vs%20RAS%20Bod%C3%B8%20Revidert%2011011.pdf>.
- Terjesen, B. F. & Rosseland, B. O. ((u.å)). Produksjon og giftighet av ammoniakk hos fisk. <http://www.nofima.no/filearchive/produksjon-og-giftighet-av-ammoniakk.pdf>.
- Thorarensen, H. & Farrell, A. P. (2011). The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture*, 312 (1): 1-14.
- Thurston, R. V., Phillips, G. R., Russo, R. C. & Hinkins, S. M. (1981). Increased toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38 (8): 983-988.
- Tobiassen, T. (2012). *Bedøvelse av laksefisk: status i forhold til forskrift og produktfeil*, b. 32/2012. Tromsø: Nofima. 33 s. : diagr. s.
- Tobiassen, T. (2013). *Workshop om utblødning og kjøling av laks, med fokus på kvalitet*, b. 37/2013. Tromsø: Nofima. 10 s. s.
- Tveranger, B. & Johnsen, G. H. (2012). Dokumentasjonsvedlegg til søknad om produksjon av postsmolt i lukket anlegg i sjø for Marine Harvest Norway AS ved Molnes i Etne kommune. Rapport nr. 1529. s. 25. ISBN: 978-82-7658-905-4.
- Vaala, S. & Mitchell, R. (1970). Blood oxygen-tension changes in acid-exposed brook trout.

- Watabe, S., Hwang, G. C. & K., H. (1990). Changes in rigor-mortis progress of carp induced by temperature acclimation. *Agricult. Biol. Chem.*, 54 (1990), pp. 219–221.
- Wedemeyer, G. A. (1996). *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*: Springer.
- Weihrauch, D., Wilkie, M. P. & Walsh, P. J. (2009). Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. *Journal of Experimental Biology*, 212 (11): 1716-1730.
- Westfall, B. (1945). Coagulation film anoxia in fishes. *Ecology*, 26 (3): 283-287.
- Wilkie, M. P. & Wood, C. M. (1991). Nitrogenous Waste Excretion, Acid-Base Regulation, and Ionoregulation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Extremely Alkaline Water. *Physiological zoology*: 1069-1086.
- Wilkie, M. P. (1997). Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118 (1): 39-50.
- Wilson, J. M., Iwata, K., Iwama, G. K. & Randall, D. J. (1998). Inhibition of ammonia excretion and production in rainbow trout during severe alkaline exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121 (1): 99-109.
- Wise, D., Weirichand, C. & Tomasso, J. (1989). Toxicity of Ammonia to Red Drum *Sciaenops ocellatus* Fingerlings with Information on Uptake and Depuration1. *Journal of the World Aquaculture Society*, 20 (4): 188-192.
- Witschi, W. A. & Ziebell, C. D. (1979). Evaluation of pH shock on hatchery-reared rainbow trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 41 (1): 3-5.
- Wood, C. M. & Jackson, E. B. (1980). Blood acid-base regulation during environmental hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respiration physiology*, 42 (3): 351-372.
- Wood, C. M. (1989). The physiological problems of fish in acid waters. *Acid toxicity and aquatic animals*, 34: 125-152.
- Ye, X. (1986). The effect of water pH on swimming performance, blood pH, red cell pH, ion concentrations and catecholamine concentrations in plasma, and gill potential in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
- Yesaki, T. Y. & Iwama, G. K. (1992). Survival, acid-base regulation, ion regulation, and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline hard water. *Physiological Zoology*: 763-787.

## Vedlegg

### Vedlegg 1. Rådata: Forsøk I Vannkvalitet

Vannkvalitet

Dato: 19.06.2013

Dag 1.	Klokkelsett	Temperatur	O2	O2	CO2	pH
Uttak	(°C)	(mg/l)	(%)	(mg/l)		
Uten for merd, 3 meters dyp	17:00	12,3	8,9	102		
Ventemerdd	17:00	12,7	8,5	98	1	7,9
Trengt ventemerdd	17:00	12,7	8,7	100	1	7,94
Kjøletank	17:00	6,1	15,7	155	16	6,62
	18:45	6	12,6	124	16	6,66
	20:30	6,1	12,9	128	19	6,61
Ensretterkar	17:00	7,3	8	80	2	7,28
	18:45	7,8	8,8	90	2	7,62
	20:30	8,1	8,4	87	4	7,35

Dato: 20.06.2013

Dag 2.	Klokkelsett	Temperatur	O2	O2	CO2	pH
Uttak	(°C)	(mg/l)	(%)	(mg/l)		
Uten for merd, 3 meters dyp	09:00	12,9	7,5	85		
Ventemerdd	09:00	12,9	8,9	102	1	8,03
Trengt ventemerdd	09:00	13	7,4	85	1	7,91
Kjøletank	09:00	5	27,1	259	11	6,86
	14:30	6,4	14,2	141	14	6,68
	17:00	6,5	20,6	204	19	6,56
	19:00	5,9	8,8	86	18	6,61
Ensretterkar	09:00	7,4	9,6	98	3	7,47
	14:30	8,3	8,8	91	3	7,42
	17:00	8,2	8,2	85	6	7,14
	19:00	7,8	8,8	90	4	7,39

## Statistikk: Forsøk I Vannkvalitet

### Sammenheng mellom karbondioksidkonsentrasjonen og tid for kjøletanken

---

<i>Regresjonsstatistikk</i>	
Multipel R	0,93511452
R-kvadrat	0,87443916
Justert R-kva	0,81165874
Standardfeil	1,60436817
Observasjon	4

---

#### Variansanalyse

---

	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans-F</i>
Regresjon	1	35,8520055	35,8520055	13,928533	0,06488548
Residualer	2	5,14799447	2,57399723		
Totalt	3	41			

---

---

	<i>Koeffisienter</i>	<i>Standardfeil</i>	<i>t-Stat</i>	<i>P-verdi</i>	<i>Nederste 95%</i>	<i>Øverste 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øverste 95,0%</i>
Skjæringspunkt	10,04426	1,66747913	6,02361965	0,02647093	2,86967641	17,2188436	2,86967641	17,2188436
tid	0,89073306	0,23866838	3,73209499	0,06488548	-0,13617409	1,9176402	-0,13617409	1,9176402

---

#### AVVIK (UTDATA)

---

<i>Observasjon</i>	<i>emskrevet cc</i>	<i>Residualer</i>	<i>tandardrester</i>
1	10,9349931	0,06500692	0,04962507
2	14,9432918	-0,94329184	-0,72009147
3	17,1701245	1,82987552	1,39689299
4	18,9515906	-0,95159059	-0,72642659

---

## Vedlegg 2. Forsøk II Blodanalyser. Rådata: iSTAT Blodverdier

Uttak	pH	PCO2	HCO3	BE	Glu	Urea	Na	K	Cl	TCO2	AnGap	Hct	Hb	
Ventemerid														
1	7,188	1,92	5,5	-23	4,6	***		155	3,7	***	6	***	30	102
2	7,071	2,7	5,9	-24	5,4	<1.0		159	5,1	>140	6	<>	28	95
3	7,039	3,69	7,5	-23	6,9	<1.0		168	4,2	>140	8	<>	40	136
4	7,176	2,9	8	-20	6,9	<1.0		176	4,4	>140	9	<>	34	116
Trengt ventemerid														
5	7,132	1,91	4,8	-24	5,1	<1.0		161	4	>140	5	<>	33	112
6	6,947	3,21	5,3	-27	5,7	<1.0		161	4,7	>140	6	<>	34	116
7	7,311	1,92	7,3	-19	5,6	<1.0		162	3,5	>140	8	<>	30	102
8	7,21	1,66	5	-23	6,7	<1.0		168	5,7	>140	5	<>	28	95
Kjøletank														
9	6,987	6,36	11,4	-20	6,9	<1.0		172	3,9	>140	13	<>	26	88
11	7,022	6,29	12,3	-19	6,4	<1.0		172	2,4	>140	14	<>	42	143
12	6,951	8,07	13,3	-19	7,3	<>		180	<>	<>	15	<>	<>	<>
Enretterkar før bedøving														
13	7,066	4,77	10,3	-20	6,7	<1.0		166	2	>140	11	<>	36	122
14	7,086	5,19	11,7	-18	8,3	<1.0		166	3,5	>140	13	<>	34	116
15	7,056	5,4	11,4	-19	5,6	<1.0		170	3	>140	13	<>	29	99
16	7,069	5,79	12,5	-18	4,8	<1.0		163	2,1	>140	14	<>	31	105
Etter bedøving														
17	6,941	7,05	11,4	-21	5,6	<1.0		162	3,8	>140	13	<>	36	122
18	6,975	5,3	9,3	-22	6,2	<1.0		165	2,9	>140	10	<>	31	105
19	6,979	7	12,3	-19	5,4	<1.0		160	3,3	>140	14	<>	31	105
20	6,962	6,12	10,4	-22	4,6	<1.0		160	3,9	>140	12	<>	33	112



### Vedlegg 3: Forsøk II Blodanalyser. Korrigerte blodverdier

Tp	Uttak	pH	BE	TCO2	PCO2	Hb	HCO3
Ventemerd							
Tp=12	1	7,52105	-19	4	0,64313364	61,65	4
	2	7,3850375	-21	4	0,90440669	57,54	4,1
	3	7,3478375	-21	5	1,23602247	82,2	5,1
	4	7,5071	-17	6	0,97139977	69,87	5,8
Trengt merd							
Tp=12	5	7,45595	-21	3	0,63978399	67,815	3,4
	6	7,2408875	-24	4	1,07523906	69,87	3,5
	7	7,6640375	-15	6	0,64313364	61,65	5,5
	8	7,546625	-19	4	0,55604263	57,54	3,6
Kjøletank							
Tp=7	9	7,347465	-19	7	1,71181614	53,43	7,1
	11	7,38929	-17	8	1,69297539	86,31	7,7
	12	7,304445	-18	8	2,17206859		8,1
Etter enretter							
Tp=7	13	7,44187	-18	7	1,2838621	73,98	6,6
	14	7,46577	-16	8	1,39690656	69,87	7,6
	15	7,42992	-17	7	1,45342879	59,595	7,3
	16	7,445455	-16	8	1,55839865	63,705	8,1
Etter Bedøver							
Tp=7	17	7,292495	-20	7	1,89753204	73,98	6,9
	18	7,333125	-20	6	1,42651345	63,705	5,7
	19	7,337905	-18	8	1,88407436	63,705	7,6
	20	7,31759	-20	6	1,6472193	67,815	6,3

Korrigerings ble utført etter følgende formler:

$$\text{hemoglobin g/dl} = \text{hematokrit (\%PCV)} \times 0,2055$$

$$\text{pH}(T_p) = \text{pH} - 0,0147(T_p - 37) + 0,0065(7,4 - \text{pH})(T_p - 37)$$

$$\text{PCO}_2(T_p) = \text{PCO}_2 \times 10^{0,019(T_p - 37)}$$

$$\text{BE}_{\text{eff}} = \text{HCO}_3 - 24,8 + 16,2(\text{pH} - 7,4)$$

$$\log \text{HCO}_3 = \text{pH} + \log \text{PCO}_2 - 7,608$$

$$\text{TCO}_2 = \text{HCO}_3 + 0,03 \text{PCO}_2$$

Ved beregning av  $\text{HCO}_3^-$  ble  $\text{PCO}_2$  konvertert fra kPa til mmHg

$$\text{PCO}_2(\text{mmHg}) = \frac{\text{PCO}_2(\text{kPa})}{0,133}$$

## Vedlegg 4. Forsøk II Blodanalyse. Statistikk av blodparametere

Alle de statistiske analysene som ble utført med Anova er vedlagt. Student t-test er kun vedlagt for de sammenligningene som ga statistisk signifikans.

### BE

Variansanalyse: en-faktor

#### SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varsians
Ventemerdd	4	-78	-19,5	3,66666667
Trengt merdd	4	-79	-19,75	14,25
Kjøletank	3	-54	-18	1
Etter enstrett	4	-67	-16,75	0,91666667
Etter Bedøve	4	-78	-19,5	1

#### Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grup	26,1842105	4	6,54605263	1,49015832	0,25803687	3,11224985
Innenfor gru	61,5	14	4,39285714			
Totalt	87,6842105	18				

### Glukose

Variansanalyse: en-faktor

#### SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varsians	Std. avvik
Ventemerdd	4	23,8	5,95	1,31	1,14455231
Trengt merdd	4	23,1	5,775	0,44916667	0,67019898
Kjøletank	3	20,6	6,86666667	0,20333333	0,45092498
Etter enretter	4	25,4	6,35	2,29666667	1,51547572
Etter Bedøver	4	21,8	5,45	0,43666667	0,66080759

#### Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	4,14004386	4	1,03501096	1,04364589	0,41968971	3,11224985
Innenfor grupper	13,8841667	14	0,99172619			
Totalt	18,0242105	18				

### pH

Variansanalyse: en-faktor

#### SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varsians
Ventemerdd	4	29,761025	7,44025625	0,00752868
Trengt merdd	4	29,9075	7,476875	0,03200761
Kjøletank	3	22,0412	7,34706667	0,00179979
Etter enretter	4	29,783015	7,44575375	0,00022218
Etter Bedøver	4	29,281115	7,32027875	0,00041829

#### Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	0,07073185	4	0,01768296	1,99437504	0,15071662	3,11224985
Innenfor grupper	0,12412985	14	0,00886642			
Totalt	0,19486171	18				

### Hematokrit

Variansanalyse: en-faktor

#### SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Sjennomsnitt	Varians
Ventemerd	4	132	33	28
Trengt merd	4	125	31,25	7,58333333
Kjøletank	2	68	34	128
Etter enretter	4	130	32,5	9,66666667
Etter Bedøver	4	131	32,75	5,58333333

#### Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	11,9444444	4	2,98611111	0,13839374	0,96502338	3,17911705
Innenfor grupper	280,5	13	21,5769231			
Totalt	292,444444	17				

### Hemoglobin

Variansanalyse: en-faktor

#### SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Sjennomsnitt	Varians
Ventemerd (n=4)	4	271,26	67,815	118,2447
Trengt ventemerd	4	256,875	64,21875	32,0246063
Kjøletank (n=2)	2	139,74	69,87	540,5472
Etter ensretter (n=)	4	267,15	66,7875	40,822575
Etter Bedøver (n=4)	4	269,205	67,30125	23,5785563

#### Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	50,4416875	4	12,6104219	0,13839374	0,96502338	3,17911705
Innenfor grupper	1184,55851	13	91,1198856			
Totalt	1235,0002	17				

K<sup>+</sup>

Variansanalyse: en-faktor

SAMMENDRAG

<i>Grupper</i>	<i>Antall</i>	<i>Sum</i>	<i>Gjennomsnitt</i>	<i>Varians</i>
Ventemerd	4	17,4	4,35	0,33666667
Trengt merd	4	17,9	4,475	0,90916667
Kjøletank	2	6,3	3,15	1,125
Etter enretter	4	10,6	2,65	0,52333333
Etter Bedøver	4	13,9	3,475	0,21583333

Variansanalyse

<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
Mellom grupper	9,29611111	4	2,32402778	4,26728264	0,0201373	3,17911705
Innenfor grupper	7,08	13	0,54461538			
Totalt	16,3761111	17				

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	<i>Ventemerd</i>	<i>Etter enretter</i>
Gjennomsnitt	4,35	2,65
Varians	0,33666667	0,52333333
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,43	
Antatt avvik mellom	0	
fg	6	
t-Stat	3,66631429	
P(T<=t) ensidig	0,0052501	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,0105002	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

Na+

Variansanalyse: en-faktor

SAMMENDRAG

<i>Grupper</i>	<i>Antall</i>	<i>Sum</i>	<i>Gjennomsnitt</i>	<i>Varians</i>
Ventemerd	4	658	164,5	88,3333333
Trengt merd	4	652	163	11,3333333
Kjøletank	3	524	174,666667	21,3333333
Etter enretter	4	665	166,25	8,25
Etter Bedøver	4	647	161,75	5,5833333

Variansanalyse

<i>Variasjonskilde</i>	<i>SK</i>	<i>fg</i>	<i>GK</i>	<i>F</i>	<i>P-verdi</i>	<i>F-krit</i>
Mellom grupper	339,464912	4	84,8662281	3,10081042	0,05053406	3,11224985
Innenfor grupper	383,166667	14	27,3690476			
Totalt	722,631579	18				

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	<i>Trengt merd</i>	<i>Kjøletank</i>
Gjennomsnitt	163	174,666667
Varians	11,3333333	21,3333333
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	15,3333333	
Antatt avvik mellom	0	
fg	5	
t-Stat	-3,90094749	
P(T<=t) ensidig	0,0056992	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,01139841	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	<i>Kjøletank</i>	<i>Etter Bedøver</i>
Gjennomsnitt	174,666667	161,75
Varians	21,3333333	5,5833333
Observasjoner	3	4
Gruppevarians	11,8833333	
Antatt avvik mellom	0	
fg	5	
t-Stat	4,90594771	
P(T<=t) ensidig	0,00222571	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00445141	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Variansanalyse: en-faktor

SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians
Ventemerd	4	19	4,75	0,73666667
Trengt merd	4	16	4	1,00666667
Kjøletank	3	22,9	7,63333333	0,25333333
Etter ensretter	4	29,6	7,4	0,39333333
Etter Bedøver	4	26,5	6,625	0,6625

Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	39,6558333	4	9,91395833	15,587693	4,681E-05	3,11224985
Innenfor grupper	8,90416667	14	0,6360119			
<b>Totalt</b>	<b>48,56</b>	<b>18</b>				

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Kjøletank
Gjennomsnitt	4,75	7,63333333
Varians	0,73666667	0,25333333
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	0,54333333	
Antatt avvik mellom μ	0	
fg	5	
t-Stat	-5,12157198	
P(T<=t) ensidig	0,00185112	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00370223	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Kjøletank
Gjennomsnitt	4	7,63333333
Varians	1,00666667	0,25333333
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	0,70533333	
Antatt avvik mellom μ	0	
fg	5	
t-Stat	-5,66434428	
P(T<=t) ensidig	0,00119243	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00238487	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Etter ensretter
Gjennomsnitt	4,75	7,4
Varians	0,73666667	0,39333333
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,565	
Antatt avvik mellom μ	0	
fg	6	
t-Stat	-4,9858206	
P(T<=t) ensidig	0,00124362	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00248724	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Etter ensretter
Gjennomsnitt	4	7,4
Varians	1,00666667	0,39333333
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,7	
Antatt avvik mellom μ	0	
fg	6	
t-Stat	-5,74704893	
P(T<=t) ensidig	0,00060382	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00120764	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Etter Bedøver
Gjennomsnitt	4	6,625
Varians	1,00666667	0,6625
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,83458333	
Antatt avvik mellom μ	0	
fg	6	
t-Stat	-4,06358597	
P(T<=t) ensidig	0,00331181	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00662361	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

pCO2

Variansanalyse: en-faktor

SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians
Ventemerd	4	3,75496257	0,93874064	0,05933514
Trengt merd	4	2,91419932	0,72854983	0,05504249
Kjøletank	3	5,57686012	1,85895337	0,0736196
Etter ensretter	4	5,6925961	1,42314903	0,01309961
Etter Bedøver	4	6,85533915	1,71383479	0,04990579

Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	3,51077613	4	0,87769403	18,0864415	2,0223E-05	3,11224985
Innenfor grupper	0,67938828	14	0,04852773			
<b>Totalt</b>	<b>4,19016441</b>	<b>18</b>				

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Kjøletank
Gjennomsnitt	0,93874064	1,85895337
Varians	0,05933514	0,0736196
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	0,06504892	
Antatt avvik mellom	0	
fg	5	
t-Stat	-4,72399884	
P(T<=t) ensidig	0,00261198	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00522397	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Etter Bedøver
Gjennomsnitt	0,93874064	1,71383479
Varians	0,05933514	0,04990579
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,05462047	
Antatt avvik mellom	0	
fg	6	
t-Stat	-4,69020426	
P(T<=t) ensidig	0,00168006	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00336013	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Etter ensretter
Gjennomsnitt	0,93874064	1,42314903
Varians	0,05933514	0,01309961
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,03621738	
Antatt avvik mellom	0	
fg	6	
t-Stat	-3,59971526	
P(T<=t) ensidig	0,0056852	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,01137039	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Kjøletank
Gjennomsnitt	0,72854983	1,85895337
Varians	0,05504249	0,0736196
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	0,06247333	
Antatt avvik mellom	0	
fg	5	
t-Stat	-5,92144615	
P(T<=t) ensidig	0,00097907	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00195813	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Etter Bedøver
Gjennomsnitt	0,72854983	1,71383479
Varians	0,05504249	0,04990579
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,05247414	
Antatt avvik mellom	0	
fg	6	
t-Stat	-6,08280924	
P(T<=t) ensidig	0,00044875	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00089749	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Etter ensretter
Gjennomsnitt	0,72854983	1,42314903
Varians	0,05504249	0,01309961
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,03407105	
Antatt avvik mellom	0	
fg	6	
t-Stat	-5,32177512	
P(T<=t) ensidig	0,00089607	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00179214	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

TCO<sub>2</sub>

Variansanalyse: en-faktor

SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians
Ventemerd	4	19	4,75	0,91666667
Trengt merd	4	17	4,25	1,58333333
Kjøletank	3	23	7,66666667	0,33333333
Etter ensretter	4	30	7,5	0,33333333
Etter Bedøver	4	27	6,75	0,91666667

Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	37,872807	4	9,46820175	11,1234818	0,00028455	3,11224985
Innenfor grupper	11,9166667	14	0,85119048			
<b>Totalt</b>	<b>49,7894737</b>	<b>18</b>				

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Kjøletank
Gjennomsnitt	4,75	7,66666667
Varians	0,91666667	0,33333333
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	0,68333333	
Antatt avvik mellom :	0	
fg	5	
t-Stat	-4,61968218	
P(T<=t) ensidig	0,00286853	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00573706	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Kjøletank
Gjennomsnitt	4,25	7,66666667
Varians	1,58333333	0,33333333
Observasjoner	4	3
Gruppevarians	1,08333333	
Antatt avvik mellom :	0	
fg	5	
t-Stat	-4,29796783	
P(T<=t) ensidig	0,00386517	
T-kritisk, ensidig	2,01504837	
P(T<=t) tosidig	0,00773035	
T-kritisk, tosidig	2,57058184	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Ventemerd	Etter ensretter
Gjennomsnitt	4,75	7,5
Varians	0,91666667	0,33333333
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,625	
Antatt avvik mellom :	0	
fg	6	
t-Stat	-4,91934955	
P(T<=t) ensidig	0,00132927	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00265854	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN

t-Test: To utvalg med antatt like varianser

	Trengt merd	Etter ensretter
Gjennomsnitt	4,25	7,5
Varians	1,58333333	0,33333333
Observasjoner	4	4
Gruppevarians	0,95833333	
Antatt avvik mellom :	0	
fg	6	
t-Stat	-4,69504827	
P(T<=t) ensidig	0,00167164	
T-kritisk, ensidig	1,94318028	
P(T<=t) tosidig	0,00334328	
T-kritisk, tosidig	2,44691185	
	0,0125	SANN



## Vedlegg 5. Forsøk III Rigorutvikling. Rådata

### Rigor score

Uttak	Fisk	Avliving	Kl. 15:00	Kl.16:00	Kl.17:00	Kl. 18:00	Kl. 19:00	Kl. 20:00	Kl. 21:00	Kl. 22:00	Kl. 09:00
Ventemerid		Kl. 11:30									
1		1	1	1	2	2	2	2	2	3	4
2		1	1	1	1	1	2	2	2	2	4
3		1	2	2	2	2	3	3	4	4	5
4		1	1	1	1	1	1	2	2	3	3
Trengt merd		Kl.11:45									
5		1	1	1	1	1	1	1	2	2	3
6		1	2	2	3	3	3	3	3	4	5
7		1	1	1	1	1	1	2	2	2	3
8		1	1	1	1	1	1	1	2	2	4
Kjøletank		Kl. 12:45									
9		2	3	4	4	4	4	4	4	5	5
10		1	2	4	5	5	5	5	5	5	5
11		1	1	4	4	4	5	5	5	5	5
12		3	4	4	5	5	5	5	5	5	5
Etter ensretter		Kl. 13:15									
13		1	1	1	1	1	2	2	2	2	5
14		1	1	1	2	2	3	3	3	3	5
15		1	2	2	3	4	4	5	5	5	5
16		1	1	1	1	1	2	2	2	2	4
Etter Bedøver		Kl. 13:45									
17		1	1	3	3	3	4	4	4	4	4
18		1	1	1	2	2	3	3	3	3	5
19		1	1	1	1	1	2	3	3	3	5
20		1	1	1	1	2	2	2	2	3	5

## Vedlegg 6. Forsøk IV. Rådata

Loggført oksygenmetning og pH for Tank 1 og 2

Klokkeslett	Tank 1		Tank 2		Tank 3	
	O2 %	pH	O2 %	pH	O2 %	pH
07:00		8		8	100	8
07:20		7,7		7,6		
07:45	111	7,3	135	7,2		
08:00	107	7,1	129	7		
08:20	102	6,9	135	6,8		
08:40	113	6,9	102	6,8		
09:00	113	6,8	105	6,7		
09:30	127	6,7	126	6,7		
09:50	137	6,7	122	6,7		
10:20	153	6,7	110	6,6		
10:50	142	6,7	119	6,6		
11:10	Flyttet til TANK 3					
11:20	Flyttet til TANK 3					