



UNIVERSITETET I
NORDLAND

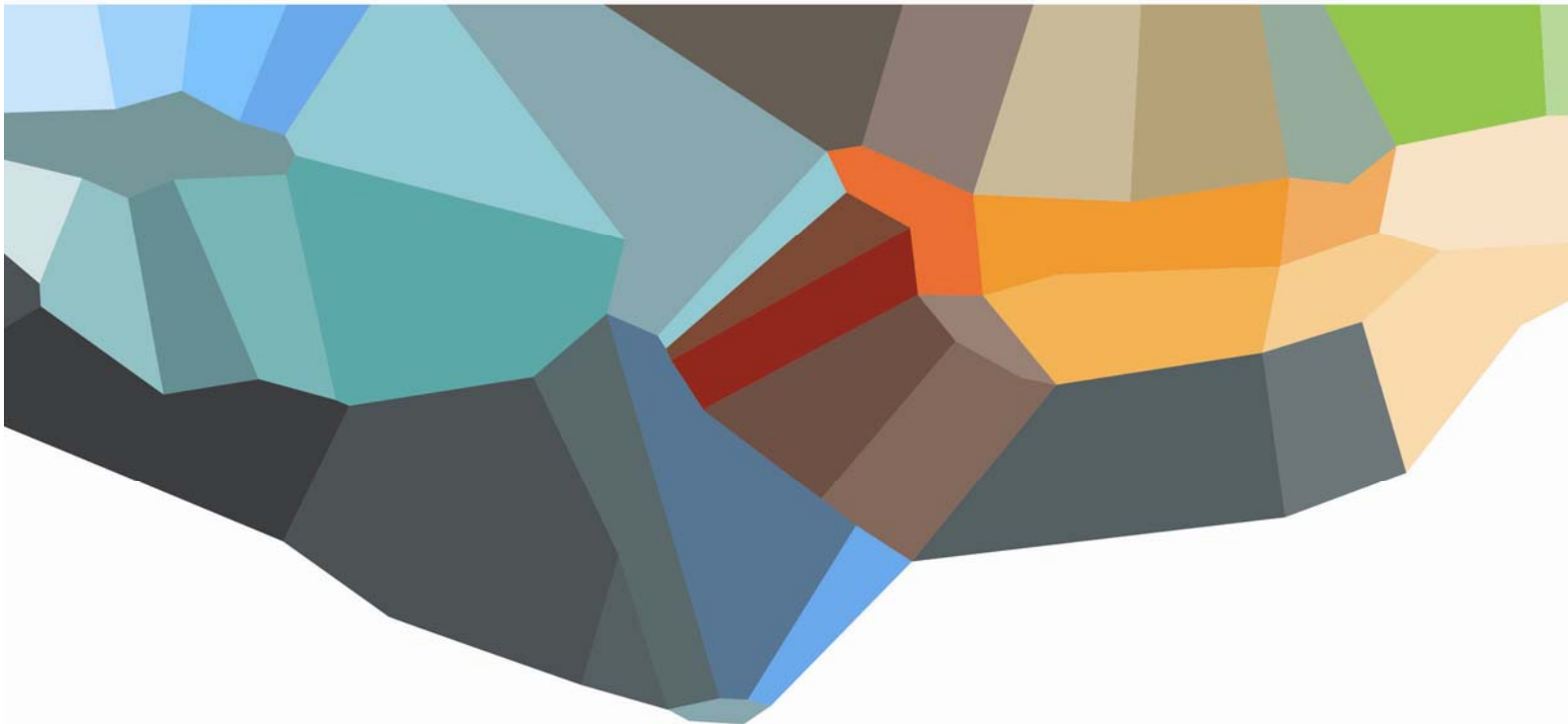
MASTEROPPGAVE

Smoltifisering hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.):
Betydning av stress, temperatur og akklimering.

Roald Jakobsen

AK306F MASTER I HAVBRUK

Fakultet for Biovitenskap og Akvakultur
Mai 2013



INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	IV
SUMMARY	V
FORORD	VI
LISTE OVER FIGURER OG TABELLER	VII
1. INNLEDNING	1
1.1. Livssyklus hos Atlantisk laks, <i>Salmo salar</i>	1
1.2. Livssyklus til atlantisk laks i norsk akvakultur	3
1.3. Regulering av vann- og saltbalanse hos Atlantisk laks	4
1.4. Temperatur	6
1.4.1 Biologiske membraner.....	6
1.5. Osmoregulatoriske organer	7
1.5.1 Gjeller.....	7
1.5.2 Gjellenes funksjon i ferskvann.....	8
1.5.3 Gjellenes funksjon i sjøvann.....	8
1.5.4 Nyrer.....	9
1.5.5 Nyrenes funksjon i ferskvann.....	9
1.5.6 Nyrenes funksjon i sjøvann.....	9
1.5.7 Den gastrointestinale trakt.....	10
1.6. Smoltifisering	10
1.6.1 Endokrine prosesser.....	10
1.6.2 Morfologiske endringer.....	11
1.6.3 Endringer i adferd.....	12
1.7. Stress	12
1.8. Manipulering av smoltifisering i oppdrett	14
1.8.1 Rogn og inkubering.....	14
1.8.2 Temperatur i yngel og parrstadium.....	14
1.8.3 Bruk av sjøvann i produksjon.....	14
1.8.4 Fotoperiode.....	15
1.9. Hovedmål	16
2. MATERIALE OG METODE	17
2.1. Forsøk 1	17
2.2. Forsøk 2	19
2.3. Prøvetaking	19
2.4. Analyser	20
2.4.1 Kondisjonsfaktor.....	20
2.4.2 Smoltindeks.....	20

2.4.3	Osmolalitet og klorid	20
2.4.4	Magnesium.....	20
2.4.5	Kortisol	21
2.4.6	Gjelle ATPase (Na ⁺ K ⁺ -ATPase)	21
2.5.	Statistisk metode	22
3.	RESULTATER	22
3.1.	Forsøk 1	22
3.1.1	Vekt (g)	22
3.1.2	Kondisjonsfaktor	23
3.1.3	Dødelighet	24
3.1.4	Smoltindeks.....	24
3.1.5	Osmolalitet.....	25
3.1.6	Plasmaklorid	26
3.1.7	Plasmamagnesium	27
3.1.8	GjelleATPase (Na ⁺ K ⁺ -ATPase)	27
3.1.9	Plasmakortisol	28
3.2.	Forsøk 2	31
3.2.1	Vekt (g)	31
3.2.2	Kondisjonsfaktor	32
3.2.3	Smoltindeks.....	33
3.2.4	Plasmaklorid	34
3.2.5	Plasmamagnesium	35
3.2.6	Plasmakortisol	36
4.	DISKUSJON.....	37
4.1.	Smoltifisering	37
4.2.	Smoltifisering i industrielt oppdrett	37
4.3.	Forsøk 1 og 2.	38
4.3.1	Vekst.....	38
4.3.2	Kondisjonsfaktor (KF) og smoltindeks	39
4.3.3	Adferd.....	40
4.3.4	Osmoregulering.....	41
4.3.5	Gjelle ATPase.....	43
4.3.6	Plasmakortisol	45
4.3.7	Dødelighet	47
4.3.8	Effekten av industriell skala på smoltifiseringen	49
5.	KONKLUSJON:	50
6.	REFERANSER.....	52

SAMMENDRAG

Smoltifisering hos Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) kan beskrives som en pre-adapting i ferskvann, til et liv i sjøvann. Som en biologisk prosess regnes smoltifisering å være under endokrin kontroll, samtidig som at forløpet av smoltifiseringen er sterkt påvirket av organismens interaksjon med miljøet rundt.

Hovedmålet med denne oppgaven var å tilegne og dokumentere kunnskap innen den industrielle styrte smoltifiseringsprosessen av laks (*Salmo salar*), og hvordan ulike håndteringsprosedyrer kan påvirke smoltkvaliteten.

Det ble utført to forsøk i 2010 og 2011. I forsøk 1 ønsket en å dokumentere effekten av transportstress, og hvordan en tilleggsstressor («sammentrengingsstressor») påvirket den osmoregulatoriske kapasitet i sjøvannstester under smoltutviklingen. Ut fra resultatene i forsøk 1 var optimalt tidspunkt for utsett til sjø ved uttak 3. juni, i henhold til morfologi og optimal osmoregulatorisk kapasitet. Plasmakortisol var også lavest ved dette uttaket, og det ble ikke registrert noen dødelighet. I tillegg var det er en korrelasjon mellom temperatur og kortisol i ferskvann, og dette kan tyde på at stressresponsen er temperaturavhengig. Ut fra dette bør man være aktsom ved all håndtering, inkludert transport, av smoltifiserende laks ved høyere temperaturer. Det var også en sammenheng mellom kortisol og dødelighet etter 72 timer i sjøvannstest. Dette kan tyde på at kombinasjonen av en ikke fullt utviklet smolt og transport stress kan gi økt dødelighet etter utsett på grunn av en kumulativ (maladaptiv) stressrespons som fisken ikke håndterer. Disse resultatene kan være med å gi en forklaring til noe av de forhøyede dødelighetstallene en ser i den Norske oppdrettsnæringa etter utsett i sjø.

I forsøk 2 så man på utfordringer knyttet til høy temperatur i ferskvann før utsett, og mulighet for å akklimere smolt til lav temperatur før utsett til sjø. Her fant man at det ved høy og lav akklimeringstemperatur i ferskvann, ikke var systematiske forskjeller i osmoregulatorisk evne etter utsett i sjø ved lave temperaturer. Forsøket tyder på at 3 dagers akklimering ved lav temperatur, ikke er tilstrekkelig, noe man ser på forhøyede stressnivåene i denne gruppen. I industriell sammenheng, kan dette føre til uheldige konsekvenser, da man i tillegg til fall i temperatur, utsetter fisken for transportrelaterte stressorer. Dette kan føre til kumulative stressresponser, og etterfølgende økende dødelighet. Forsøket tyder på at optimal akklimeringstid fra høy til lav vanntemperatur ligger mellom 3 og 11 dager.

SUMMARY

Smoltification Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) can be described as a pre-adaptation in fresh water, to a life in seawater. As biological process smoltification is considered to be under endocrine control, while the course of smoltification is strongly influenced by the organism's interaction with the environment.

The main objective of this study was to acquire and document knowledge in the industrial controlled smoltification process of salmon (*Salmo salar*), and to study how different handling procedures can affect smolt quality. Two trials were conducted in 2010 and 2011. In trial 1 the smoltification process in a commercial production unit (MN-Hopen) was followed. The effect of transport stress, and additional crowding stress on osmoregulatory capacity was studied. The trial was conducted in the period March 19. to July 1 2010. Based on the results of trial 1, optimal timing for shipping of the unit to sea, was at June 3., in regard to the morphology and optimal osmoregulatory capacity. Plasma cortisol was at the lowest at this sampling, and no mortality was recorded. In addition, there was a correlation between temperature and cortisol in freshwater (post transport) and this may indicate that the stress response is temperature dependent. Thus it is advisable to be careful when handling smoltified salmon at higher temperatures. There was also a correlation between cortisol and mortality after 72 hours in sea challenge test. This indicates that the combination of not fully developed smolts and transport stress may increase mortality after release due to cumulative (maladaptive) stress responses. These results may help to provide an explanation for some of the elevated mortality rates seen in the Norwegian aquaculture industry after sea transfer.

One of the challenges of intensive production in high temperature in fresh water and out of season smoltification, is the sudden decrease in temperature when shipped during winter months, which may be detrimental to fish welfare. In Trial 2, we examined the opportunity to acclimate smolt to low temperature prior to transfer to the sea. The results show that high and low acclimation temperature in freshwater did not affect the osmoregulatory ability. The experiment suggests that the three-day acclimation at low temperature is not sufficient, which can be seen in elevated plasma cortisol levels in this group. In industrial applications, this can lead to adverse consequences, as in addition to temperature-related stressor, exposes fish for transport-related stressors. This can lead to cumulative stress responses and subsequent increasing mortality. The experiment suggests that optimal acclimation from high to low water temperature lies between 3 and 11 days.

FORORD

Denne mastergradsoppgaven teller 60 studiepoeng, og inngår som det siste obligatoriske emnet i min Mastergrad i Havbruk.

Arbeidet med denne oppgaven startet med datainnsamling våren 2010, og har således vært en langvarig prosess. Valg av tema var nok påvirket både av praktisk erfaring, personlig faglig interesse, og i stor grad inspirert av mine gode kollegaer, forskningsstasjonsleder Robert Eliassen og seniorforsker Martin H. Iversen. Sistnevnte som hovedveileder igjennom databehandling og skriveprosessens ulike stadier. En stor takk til dem begge, både for veiledning og den stadig sterkere følelsen av å være del av et godt fagmiljø.

En del av arbeidet knyttet oppgaven hadde vært umulig å gjennomføre uten praktisk hjelp, og denne hjelpen har i hovedsak kommet fra Bente Sunde og Steinar Johnsen, ofte akkompagnert av latter og begeistring. Det er og på sin plass å takke Fakultet for Biovitenskap og Akvakultur for å legge til rette for avslutningen av oppgaven.

Forsøk 1 som senere omtales i teksten var del av et prosjekt finansiert av Nordland Fylkeskommune (VRI Smoltkvalitet), og er basert på fisk fra Mainstream Norway AS, avdeling MN-Hopen.

Til slutt en stor takk til min familie, Ingrid, Nora og Erik, som tålmodig har støttet opp om dette arbeidet.

Bodø

13.5.2013

Roald Jakobsen

LISTE OVER FIGURER OG TABELLER

Figur 1. Interaksjon mellom miljø og organisme som fører til smoltifisering.....	3
Figur 2. Skjematisk oversikt over de viktigste osmoregulatoriske prosessene i beinfisk i ferskvann.	5
Figur 3. Skjematisk oversikt over de viktigste osmoregulatoriske prosessene i beinfisk i sjøvann.	6
Figur 4. Osmoregulatoriske prosesser i beinfisk gjeller i ferskvann.....	7
Figur 5. Modell for sekresjon av salter i beinfisk gjeller i sjøvann.	8
Figur 6. Visuelle forskjeller mellom parr (øverst) og smolt (nederst) av atlantisk laks (<i>Salmo salar</i> L.)	12
Figur 7. Stressorer og mulige virkninger på fisk.....	13
Figur 8. Utvikling i temperatur ved anlegget fisken ble hentet fra og i sjøvann ved UiN	17
Figur 9. Døgngrader beregnet fra 1. mars 2010, ved overgang fra kortdagsperiode til langdagsperiode.	18
Figur 10. Trinnvis og forenklet modell av reaksjonsmønster i Na^+K^+ -ATPase analysen.....	21
Figur 11. Gjennomsnittlig vekt ($g \pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggs-stressor (STS).....	22
Figur 12. Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor ($KF \pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggs-stressor (STS).....	23
Figur 13. Dødelighet (%) for laksesmolt registrert i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).....	24
Figur 14. Gjennomsnittlig smoltindeks ($\pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggs-stressor (STS) (sammentrengingsstressor).	25
Figur 15. Gjennomsnittlig osmolalitet (mOsm) ($\pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).....	25
Figur 16. Gjennomsnittlig plasmaklorid (mM) ($\pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).....	26
Figur 17. Gjennomsnittlig plasmamagnesium (mM) ($\pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).....	27
Figur 18. Gjennomsnittlig Na^+K^+ -ATPase ($\mu\text{mol ADP}/\text{mg protein}/\text{time}$) ($\pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).	28
Figur 19. Gjennomsnittlig plasmakortisol (nM) ($\pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).....	29
Figur 20. Sammenhengen mellom plasmakortisol i gruppe 72 timer uten daglig stressor (STN) og dødelighet..	30
Figur 21. Sammenhengen mellom plasmakortisol i gruppe 72 timer med daglig stressor (STS) og dødelighet ..	30
Figur 22. Gjennomsnittlig vekt (g) ($\pm SD$) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder.....	31
Figur 23. Gjennomsnittlig K-faktor (KF) ($\pm SD$) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder.....	32
Figur 24. Gjennomsnittlig smoltindeks ($\pm SD$) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder	33
Figur 25. Gjennomsnittlig plasmaosmolalitet for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder.....	33
Figur 26. Gjennomsnittlig plasmaklorid (mM $\pm SD$) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder.....	34

Figur 27. Gjennomsnittlig plasmamagnesium (mM \pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder ...	35
Figur 28. Gjennomsnittlig plasmakortisol (nM \pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder	36
Tabell 1. Salg av smolt (tusen stk), salg av laks (i tonn), effektivitet (antall kg pr smolt) og tap i settefisk og matfiskfase (tusen stk) i perioden 1995 til 2011 (Fiskeridirektoratet, 2012).....	4
Tabell 2. Smoltindeks, kriterier for bedømming av ulike faktorer i smoltindeks.....	20
Tabell 3. Sammenhengen mellom plasmakortisol i FV etter transport og ulike fysiologiske målte parametere i ferskvann (signifikant sammenheng indikert med rød skrift).....	31

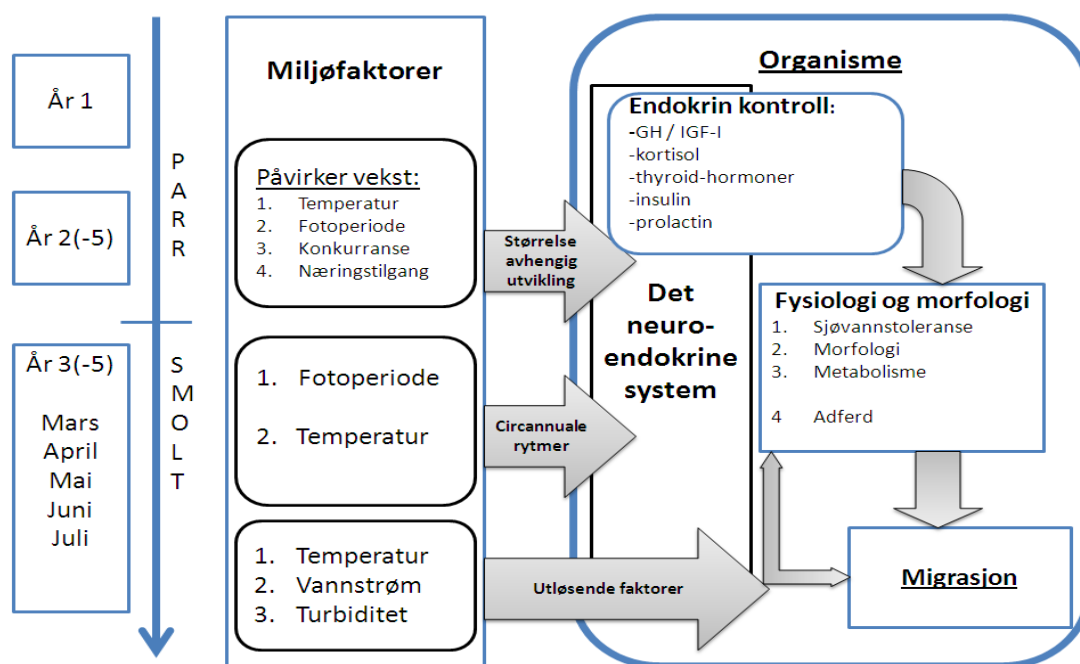
1. INNLEDNING

1.1. LIVSSYKLUS HOS ATLANTISK LAKS, *SALMO SALAR*

Livssyklusen til Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) består som hos andre salmonider (*Salmo* sp., *Oncorhynchus* sp. og *Salvelinus* sp.), av en fase i ferskvann og en fase i sjøvann. Atlantisk laks er anadrom, og har sine første leveår i ferskvann, før den vandrer ut i sjø. Livssyklusen fullføres i det gytemoden fisk returnerer til ferskvann for å gyte på høsten. Denne tilbakevandringen skjer i perioden mai til oktober, hvor større, eldre fisk oftest returnerer tidligere enn mindre yngre fisk, som ankommer senere på sommer og høst (McCormick *et al*, 1998; Staurnes *et al*, 1992). Befruktet rogn klekkes så i elva i løpet av våren, og yngelen lever den første tiden på næring i plommesekken. Yngelen er stasjonær og territoriell, og lever på relativt grunne områder med lav strømhastighet. Etter første høst og vinter begynner fisken å bevege seg til dypere og ofte mer strømutsatte områder av elva, med grovere bunnsstrat. I denne fasen fra yngel til smoltifisering benevnes laksen ofte som "parr" (McCormick *et al*, 1998; Staurnes *et al*, 1992). Parren er bunnlevende og har tydelige parr eller fingermerker på siden av kroppen. Overgangen mellom ferskvann og sjøvann innebærer en stor endring i det miljøet fisken oppholder seg i, og gjennom en pre-adapting for det marine miljø gjennomgår fisken endringer som gjør at den forandres fra parr til smolt (Staurnes *et al*, 1992). Disse endringene kalles smoltifisering eller parr-smolt transformasjon, og omfatter endringer i morfologi, etologi (atferd) og fysiologi. (Bjerknes, 2007; Björnsson & Bradley, 2007; Björnsson *et al*, 2011; Folmar & Dickhoff, 1980; Hoar, 1976; McCormick *et al*, 1998).

Populasjoner av laks finnes i svært ulike typer vassdrag, både med hensyn på vannføring, bunnsstrat og høydeprofil. Dermed er laksens fenotype, adferd i ferskvannshabitatet, lengde på ferskvannsfase, og alder ved tilbakevandring svært forskjellig (McCormick *et al*, 1998). Denne evnen til diversitet i fenotype og livssyklus er ansett å være en kritisk faktor for å sikre de mange små laksepopulasjonene. Modning av parr, eller ung fisk i sjø kan ses på som en sikring av stabiliteten i populasjonen, og er vanlig. Atlantisk laks kan gyte gjentatt ganger, spesielt hvis modning inntreffer tidlig, enten årlig eller mer spredt (McCormick *et al*, 1998). I overgangen fra ferskvann til estuarier og fjordsystemer møter smolten mange utfordringer knyttet økt salinitet, nye patogen, parasitter og predatorer, som igjen medfører økt mortalitet sammenliknet med ferskvannsfasen. Ulempene oppveies av den generelle høye næringstilgangen i sjøvann sammenliknet med ferskvann, og muliggjør hurtigere vekst og kjønnsmodning. Sammenligninger mellom anadrom og ikke anadrom laks viser større fekunditet hos den anadrome laksen enn laksen som fullfører hele livssyklusen i ferskvann (Klemetsen *et al*, 2003; McCormick *et al*, 1998).

I naturen regnes vanlig smoltstørrelse ved utvandring å være mellom 12 til 18 cm, og fisken vandrer ut i en alder fra 2 til 5 år. Fiskens vekst i elv påvirkes av flere faktorer som temperatur, næringstilgang, fotoperiode og konkurranse. Disse faktorene varierer fra vassdrag til vassdrag. Fiskens vekst synes å være sentral for igangsettelse av smoltifiseringsprosessen, da parren må nå en kritisk størrelse (ca 8-12 cm) høsten før en eventuell smoltifisering kan starte påfølgende vår (Bjornsson & Bradley, 2007; McCormick *et al*, 1998; Staurnes *et al*, 1992). Smoltifiseringen består av flere mer eller mindre uavhengige biologiske prosesser som er avhengig av endringer i miljøet rundt fisken, for å inntreffe på samme tid (synkronisering). Endringer i fotoperiode anses å være det viktigste eksterne stimulus for fisken. Endringer i fotoperiode fanges opp i lyssensitive organer som pinealkjertel og retina, og medfører lysinhiberte endringer i hormonet melatonin. Dette kobler fotoperiode med det endokrine system, og det er ansett at smoltifisering som biologisk prosess primært er under endokrin kontroll (Bjornsson & Bradley, 2007; Bjornsson *et al*, 2011; Falcon *et al*, 2010; McCormick *et al*, 1998). Temperatur er også en viktig miljøfaktor som påvirker tilveksten, og synes om våren å være et viktig signal for å starte migrasjon nedover i vassdrag. Høyere temperatur øker også hastighet på de ulike biologiske prosessene i smoltifiseringen, inkludert tidligere desmoltifisering. Svært lave temperaturer kan forsinke smoltifiseringen, trolig ved at effekten av økt fotoperiode reduseres (McCormick *et al*, 2000; McCormick *et al*, 1998). Relativt sett vil variasjoner mellom år i temperatur påvirke smoltifiseringen, og sannsynligheten for overlevelse, i større grad enn de relativt mindre variasjonene i fotoperiode i naturen (McCormick *et al*, 1998). Økt vannstrøm i vassdrag, samt høyere turbiditet i samband med økt vannstand regnes også som å være viktige faktorer som er med på å utløse migrasjon av smolt fra ferskvann til sjøvann (Bjornsson *et al*, 2011; Klemetsen *et al*, 2003; McCormick *et al*, 2000; McCormick *et al*, 1998).



Figur 1. Interaksjon mellom miljø og organisme som fører til smoltifisering. Fisken må nå en kritisk størrelse i parr-stadiet for at prosessen med smoltifisering skal starte. Veksten fram mot denne størrelsen er svært avhengig av miljøfaktorer. Hvis fisken når dette stadiet er det primært fotoperiode som regulerer neuroendokrine endringer som fører fram mot smoltifisering. Smoltifiseringsprosessen regnes å være under endokrin kontroll, allikevel er endringer i miljøfaktorer ansett som nødvendig for at selve migrasjonen skal starte. Tilpasset og modifisert etter tidligere figurer av Bjørnsson *et al.* (2011) og McCormick *et al.* (1998)

1.2. LIVSSYKLUS TIL ATLANTISK LAKS I NORSK AKVAKULTUR

På samme måte som i naturen gjennomgår laks i oppdrett de første fasene i ferskvann. Videre er tilvekst og smoltifisering avhengig av fotoperiode, temperatur, næringstilgang og konkurranse. Den store forskjellen er at dette miljøet i stor grad kan kontrolleres og manipuleres av oppdretter, som kan bruke disse faktorene som verktøy for å styre tilvekst og smoltifisering og dermed tidspunkt for levering av smolt til matfiskanlegg i sjø. Et ønske om å styre smoltifisering utover den naturlige perioden om våren, bunner i ønske om bedre utnyttelse av infrastruktur i smolt- og i sjøanlegg, etterspørsel etter ferdig produkt (matfisk) og offentlige reguleringer (Asche, 2009; Willoughby, 1999).

Smolten er ofte delt inn i to forskjellige kategorier. Vårsmolt, (også kalt vårutsett, ett-åring og 1+) angir fisk som settes ut i perioden mars til juli (>365 dg fra utklekt rogn). Høstsmolt, (også kalt høstutsett, null-åring og 0+) angir fisk som settes ut i perioden juli til november (<365 dg fra utklekt rogn) I en del tilfeller kan man ha 0+ fisk (<365dg) som settes ut i perioden januar til mars (Stefansson *et al.*, 2005; Willoughby, 1999).

Tabell 1. Salg av smolt (tusen stk), salg av laks (i tonn), effektivitet (antall kg pr smolt) og tap i settefisk og matfiskfase (tusen stk) i perioden 1995 til 2011 (Fiskeridirektoratet, 2011; 2012)

År	Salg smolt,	Salg laks, tonn	Effektivitet	Tap Settefisk	Tap matfisk
2011	287 509	1 059 958	3,78	149 277	59 988
2005	151 862	586 512	3,86	77 412	25 094
2000	129 390	440 061	3,40	51 400	17 169
1995	97 439	261 522	2,68	-	-

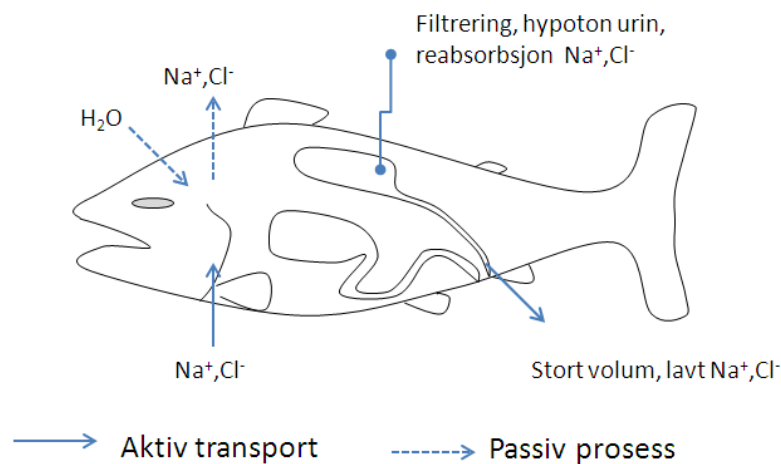
I 2011 ble solgt over 287 millioner smolt, og tall fra vaksineprodusentene viser at det ble satt ut 154 millioner på våren (55%) og om lag 127 millioner på høsten 2011 (45 %) (Tabell 1)(Fiskeridirektoratet, 2012; Pharmaq, 2011). Basis for smoltutsett over store deler av året er tilgangen på øyerogn, som kan leveres om lag 10 av 12 måneder i året. "Tidligrogn" leveres i perioden oktober til desember, og gir opphavet for leveringsklar høstsmolt i perioden juli til oktober påfølgende år. "Normalrogn" leveres i perioden desember til mars, og danner grunnlaget for leveringsklar høstsmolt i perioden august til november samme år, samt vårsmolt som leveres i perioden mars til juni påfølgende år. "Seinrogn" leveres fra april til august, og brukes for å produsere vårsmolt påfølgende år i perioden mars til juli. Kombinasjonen av smoltutsett som spenner fra (januar) mars til november, med muligheter til å regulere tilvekst i sjø ved blant annet fôringsregime, gir muligheter til å drive utslakting på sjølokalitetene større deler av året. Kombinasjoner av vårsmolt og høstsmolt er i utgangspunktet tillatt, men med en del begrensinger. Hver lokalitet i sjø skal brakklegges etter en fullført produksjonssyklus, som ikke kan overstige 30 måneder. Innen hver produksjonssyklus skal man opprettholde generasjonsskille basert på klekkesidspunkt på rogn. I tradisjonell vårsmolt og høstsmolt produksjon kan man dermed blande høstsmolt og påfølgende vårsmolt. Ved fallende temperaturer skal 0+-smolt kun settes ut på 7 °C eller høyere (AquaGen, 2012; FKD, FOR 2008-06-17; Salmobreed, 2011).

1.3. REGULERING AV VANN- OG SALTBALANSE HOS ATLANTISK LAKS

Osmolalitet angir mengden løste partikler pr kg væske og salinitet angir mengde løst salt i vann. I ferskvann og sjøvann har man en osmolalitet på henholdsvis på 0-10 mOsm kg⁻¹ og 1000 mOsm kg⁻¹, og en salinitet på henholdsvis 0 og 33-35 ‰. Salinitet og osmolalitet er blant de viktigste miljøfaktorene for fisk, og beinfisk (teleost) holder generelt osmolaliteten i blodet rundt 300 mOsm kg⁻¹. For å oppnå dette, må vann og ioner reguleres over en rekke organer i fisken (Evans, 2008; Evans, 2006; Marshall & Grosell, 2006; Varsamos *et al*, 2005)

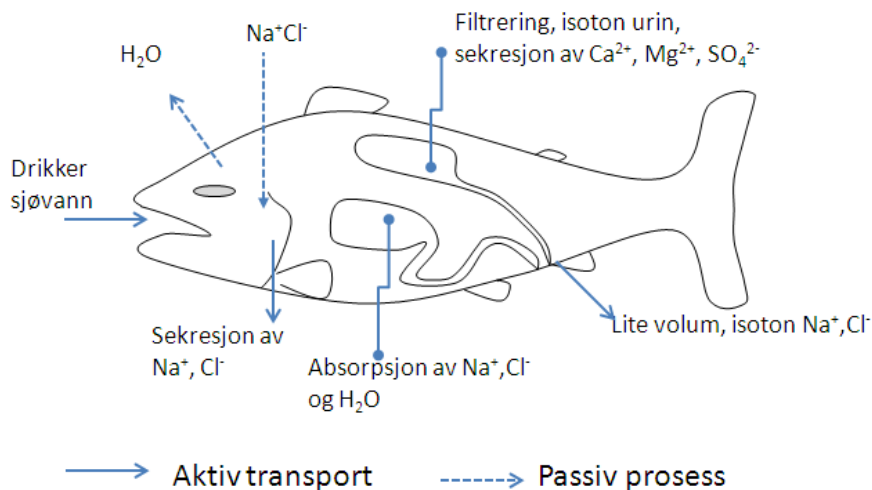
Fisk har utviklet tre hovedstrategier for regulering av vann- og saltbalanse i ekstracellulære væsker som blodplasma, lymfjevæske eller intestinalvæske. Disse tre omtales som osmokonform,

hyperosmotisk og hypoosmotisk regulering. Osmokonform vil si at osmolaliteten i kroppsvæsker er lik miljøet rundt. Hyperosmotisk regulering holder osmolaliteten i organismen høyere enn miljøet rundt (fisk i ferskvann), mens hypoosmotisk regulering holder osmolaliteten i organismen lavere enn miljøet rundt (fisk i sjøvann). Laks skifter mellom hypo- og hyperosmotisk miljø ved utvandring som smolt, og ved tilbakevandring som gytefisk (Marshall & Grosell, 2006)



Figur 2. Skjematisk oversikt over de viktigste osmoregulatoriske prosessene i beinfisk (teleost) i ferskvann. Tilpasset og modifisert etter figur av Evans (2008)

I ferskvann vil laks oppleve tap av ioner, og opptak av vann over gjelleepitelet. For å motvirke dette skilles store mengder fortynnet urin ut over nyrene og Na^+ og Cl^- må pumpes aktivt inn over gjelleepitelet (**Figur 2**). I sjøvann vil fisken osmotisk tape vann over gjellene, som må kompenseres ved å drikke (**Figur 3**). Vannet og ionene tas opp i tarmen, og ionene skilles ut, primært over gjelleepitel og nyre (Marshall & Grosell, 2006). Toleranse til sjøvann øker med størrelse og utviklingsstadium hos laks. Dette skyldes at forholdet mellom volum og overflate reduseres ved økende størrelse, samt at størrelsen i seg selv øker toleransen. til dels på grunn av størrelsesavhengig utvikling (Staurnes *et al*, 1992)



Figur 3. Skjematisk oversikt over de viktigste osmoregulatoriske prosessene i beinfisk i sjøvann. Tilpasset og modifisert etter figur av Evans (2008)

1.4. TEMPERATUR

Kroppstemperatur hos de aller fleste fiskearter, inkludert atlantisk laks, er den samme som omgivelsestemperaturen, og omtales som poikiloterme dyr. Fiskens sirkulasjonssystem er i tett kontakt med vann, og dette kombinert med den store varmekapasitet i vann, gjør at fiskens kroppstemperatur i utgangspunktet følger temperaturen i vannet (Crocket & Londrville, 2006).

1.4.1 Biologiske membraner

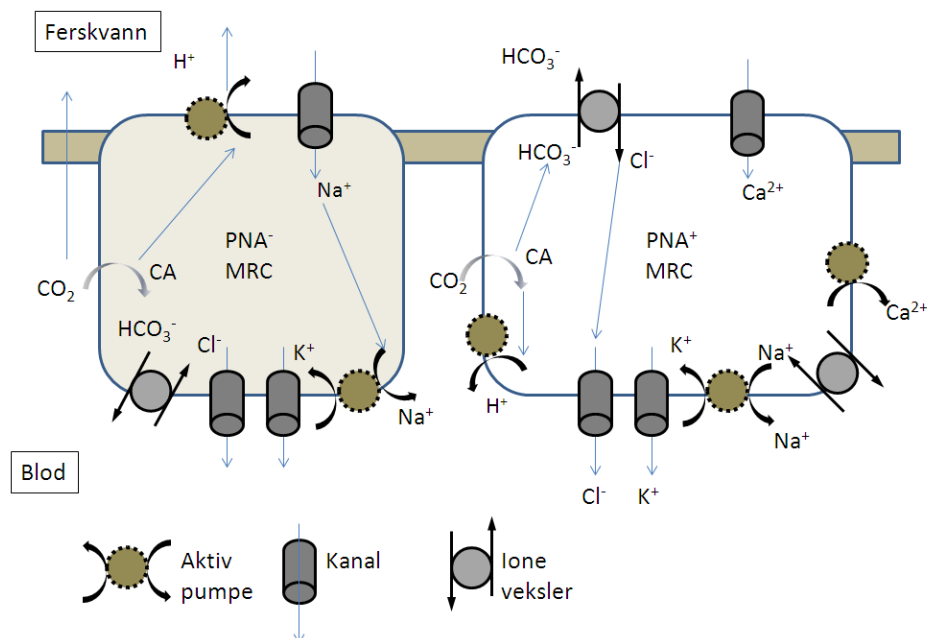
De fleste biologiske membraner består av et relativt uniformt dobbeltlag av fosfolipider, som omslutter proteiner med til dels svært ulik form og funksjon. Det doble lipidlaget, som består av molekyler som er amfipatiske, og fungerer som barriere mellom miljøet på utsiden og innsiden av en celle (Crocket & Londrville, 2006; Thommasen, 1992).

Permeabiliteten i disse membranene er avhengig av egenskapene til den hydrofobe delen av fosfolipidene, og generelt er permeabiliteten for vann større enn for ioner og polare molekyler (Crocket & Londrville, 2006; Thommasen, 1992). Membranenes fosfolipider har ulike egenskaper ved ulik temperatur, og forenklet kan man si at smeltepunkt synker med økende grad av umettete fettsyrer, og andelen av karbonatomer. Når omgivelsestemperatur endres må celledmembranene i enkelte vevstyper forandres for å opprettholde optimal funksjon, og slik tilpassing av fysiske og funksjonelle egenskaper kalles homeoviskøs tilpassning (Crocket & Londrville, 2006; Thommasen, 1992).

1.5. OSMOREGULATORISKE ORGANER

1.5.1 Gjeller

Gjellene hos laks er et multi-funksjonelt organ, og sørger for gassutveksling mellom vann og blod, kontroll av ioner og osmolalitet i blod, syre-base regulering og ekskresjon av nitrogenholdige metabolitter. Anatomisk er gjellene bygd opp med gjellebuer, hvor det sitter rekker med gjellefilamenter, og hvert filament inneholder store mengder platelignende lameller (Marshall & Grosell, 2006). Epitelet på lamellene er spesialisert for utveksling av gass, mens epitelet på filamentene er spesialisert for ione-transport. Gjellene er dekket av epitelceller, og disse cellene representerer grensen mellom det ytre miljø og det indre miljø hos fisken. På lamellene består epitelcellene av et cellelag som utgjør grensen mellom det ytre (vann) og indre miljø (blod). Epitelet består i hovedsak av plateceller og mitokondrierike celler (MRC). Platecellene regnes å være viktigst for gassutveksling, (Marshall & Grosell, 2006). MRC, utgjør en mindre andel av cellene på gjellene enn platecellene, men regnes for å være mest involvert i fysiologiske prosesser. Disse finnes i størst tetthet i basis av, og mellom lamellene. MRC er ansett som sete for regulering av ioner både i ferskvann og sjøvann, og kan også deles inn i to kategorier, MRC (kloridceller) og støtteceller (AC). Sammen danner de multi-cellulære komplekser i filament epitelet, med tubulære og tubulovesikulære systemer. I tillegg til å være mitokondrierike, kan kloridcellene også inneholde høye nivå av blant annet $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (Evans *et al*, 2005; Hwang & Lee, 2007; Marshall & Grosell, 2006).

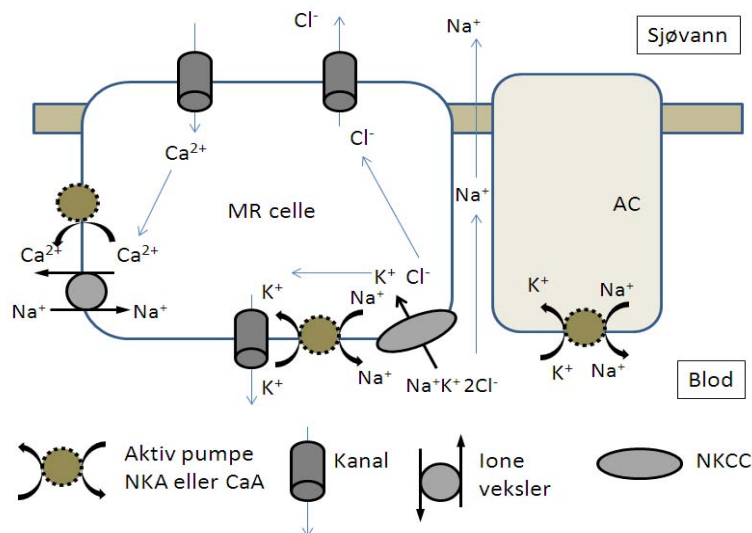


Figur 4. Osmoregulatoriske prosesser i beinfisk gjeller i ferskvann. Tilpasset og modifisert etter figur av Marshall & Grosell (2006).

1.5.2 Gjellenes funksjon i ferskvann

MRC regnes å være hovedsete for ione-transport i teleost-gjeller, og det finnes distinkte typer for regulering i ferskvann og i sjøvann (**Figur 4** og **Figur 5**). Etter en modell av Marshall & Grosell (2006) for osmoregulering i ferskvann, kan disse MRC deles inn i to undertyper, som PNA⁺ og PNA⁻ (etter sensitivitet for "peanut agglutinin") Disse to typene er funksjonelt ulike, i hovedsak skiller PNA⁺ ut base og tar opp Cl⁻ via en apikal (spisset) Cl⁻-HCO₃⁻ ioneveksler som er indirekte drevet av en protonpumpe lokalisert basolateralt. Cl⁻ går ut av cellen og over i blod via en anion kanal. Via apikale Ca²⁺ kanal og basolateral Na⁺-Ca²⁺ ioneveksler, og Ca²⁺-ATPase drives transport av Ca²⁺. Trolig er denne mekanismen til stede også i PNA⁻ celler også. PNA⁻, derimot skiller ut syre, og tar opp Na⁺ via apikal ATPase og Na⁺ ionekanaler. Na⁺ drives ut av celler ved hjelp av Na⁺K⁺-ATPase. I samme prosess går også HCO₃⁻ ut av cellen i bytte med Cl⁻ som igjen går ut via CFTR anion kanaler (Hwang *et al.*, 2011; Marshall & Grosell, 2006)

1.5.3 Gjellenes funksjon i sjøvann



Figur 5. Modell for sekresjon av salter i beinfisk gjeller i sjøvann. Tilpasset og modifisert etter figurer av Marshall & Grosell (2006) og Hwang *et al.* (2011).

Sekresjon av salter hos fisk i sjøvann kan beskrives som sekundær aktiv transport av Cl⁻, og passiv transport av Na⁺. Drivkraften for den aktive transporten er enzymet Na⁺K⁺-ATPase (NKA), som

ligger i den basolaterale membran, og som opprettholder henholdsvis lave og høye konsentrasjoner av Na^+ og K^+ intracellulært. I nær tilknytning til NKA ligger $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ Co-transporter (NKCC) som transporterer Na^+ , K^+ og Cl^- inn i cellen via den elektrokjemiske gradienten som NKA danner. Denne transporten følges av passiv utskillelse av Cl^- gjennom anion-kanaler på apikal side, og utskillelsen av Na^+ skjer gjennom såkalt lekke cellekoblinger («leaky paracellular junctions»). Kalsium (Ca^{2+}), absorberes via apikal kanaler, og drives ut basolateralt ved hjelp av $\text{Na}^+:\text{Ca}^+$ ioneveksler, og Ca^{2+} ATPase pumpe (Hwang *et al*, 2011; Marshall & Grosell, 2006).

1.5.4 Nyrer

Nyrene hos beinfisk er lokalisert ventralt for ryggraden, og er uten tydelig segmentering. I dette vevet ligger nefronene spredt blant lymfoide celler. Nyrenes primære oppgave er å produsere urin, men i den fremre (kraniale) delen av nyrene er det høy tetthet av hematopoetisk og reticuloendotheliale vev, som danner ulike typer blodceller, samt at nyrene også inneholder vev med endokrine funksjoner. Nefronene er funksjonell enhet for utskillelse av urin, og består av glomerulus, proksimal tubulus og distal tubulus. Glomerulær filtrasjonsrate beskriver nyrenes evne til å filtrere plasma, og produsere urin (Kryvi, 1992; Marshall & Grosell, 2006).

1.5.5 Nyrenes funksjon i ferskvann

I ferskvann er glomerulær filtrasjonsraten svært høy i forhold til i sjøvann, og det produseres større mengder urin, som er hypoton for å minimalisere tap av ioner. I nefronet går urinen via glomerulus gjennom proximal og distal tubulus, før oppsamling til tubulus som fører til urinblære. I proksimal tubulus reabsorberes Na^+ , Cl^- og H_2O , mens distal tubulus, oppsamlings-kanalen og urinblæren er mindre permeable for vann, og reabsorberer kun ioner. Hovedmengden ioner reabsorberes i distal tubuli, trolig i en prosess som involverer basolateral Na^+K^+ -ATPase og apikal $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ Co-transporter (Kryvi, 1992; Marshall & Grosell, 2006). Absorpsjonen sørger for at urinen som skilles ut er svært fortynnet. Nefronene er forsynt med arterielt blod, og blodstrømmen reguleres aktivt avhengig av hvilket osmotisk miljø fisken oppholder seg i. I regnbueørret for eksempel er 45% av glomerulusene aktivert i ferskvann, mens tilsvarende tall i sjøvann er 5% (Kryvi, 1992; Marshall & Grosell, 2006)

1.5.6 Nyrenes funksjon i sjøvann.

I sjøvann er glomerulær filtrasjonsraten lav, og det produseres mindre mengder urin som er isoton, og rik på divalente ioner som Mg^{2+} , SO_4^- . Tidlig i proksimale tubulus sekreseres Mg^{2+} , SO_4^- sammen med Na^+ , Cl^- og H_2O . Denne prosessen involverer basolateral Na^+K^+ -ATPase og $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ Co-transporter samt apikal anion kanaler. Sekresjon av Mg^{2+} er også en aktiv prosess, trolig drevet av

Na⁺K⁺-ATPase, eller Mg²⁺:H⁺ - ioneveksler. Senere blir Na⁺, Cl⁻ og H₂O blir reabsorbert i senere proksimale tubulus (Marshall & Grosell, 2006).

1.5.7 Den gastrointestinale trakt

Den gastrointestinale trakt omfatter munn, gjellehule, spiserør (oesophagus), magesekk (ventrikkel), blindsekker (pylorus), midttarm og baktarm. I sjøvann skjer osmoregulatorisk reguleringen ved avsalting, og drikkereflex i spiserøret, samt absorpsjon og sekresjon i tarmsystemet. I spiserøret tas Na⁺ og Cl⁻ opp, mens vann i stor grad tas opp bakre deler av tarmsystemet. Her er osmolaliteten i tarmvæsken redusert til isotone nivå, og de viktigste osmolyttene i tarmvæske er Mg²⁺, So₄⁻ og HCO₃⁻. Indirekte vil fordøyelse av næring påvirke osmoregulering i form av opptak av væske, samt sekresjon og absorpsjon av elektrolytter. I ferskvann tas vann opp i forbindelse med fordøyelse, og skilles ut over nyrene, mens det gjennom næring til en viss grad tilføres salter (Hwang & Lee, 2007; Marshall & Grosell, 2006).

1.6. SMOLTIFISERING

Smoltifisering er en pre-adapting til overgangen fra opphold i ferskvann til sjøvann, og omfatter endringer i morfologi, fysiologi og adferd. De ulike prosessene er i større eller mindre grad uavhengige, men synkroniseres av ytre miljøforhold. Perioden hvor fisken er smolt, og optimalt tilpasset overgangen til sjøvann, kalles ofte for smoltvinduet, og varigheten på smoltvinduet reguleres av omgivelsestemperaturen (Handeland *et al*, 2004). Hvis fisken ikke kommer ut i sjøvann, vil den etter periode de-smoltifisere, og tilpasse seg opphold i ferskvann igjen.

Smoltifisering som biologisk prosess er ansett å være under endokrin kontroll, og de viktigste endokrine prosessene er knyttet endringer i nivåer av melatonin, veksthormon (GH), kortisol, thyroïd-hormoner (TH), insulin og prolaktin (**Figur 1**) (Bjornsson *et al*, 2011; McCormick *et al*, 1998; Staurnes *et al*, 1992).

1.6.1 Endokrine prosesser

Melatonin produseres i all hovedsak i pinealkjertel og i retina, som begge er lyssensitive, og som omdanner lyset til biologiske signal, via melatonin eller nerveimpulser. Syntesen av melatonin øker i perioder med lite lys eller mørke, mens perioder med mer lys, inhiberer syntesen (Falcon *et al*, 2010; Porter *et al*, 2001). Lysintensiteten i lys-perioden påvirker melatoninsyntesen i mørkeperioden negativt, ved at høy lysintensitet i lysperioden gir mindre melatoninsyntese under mørkeperioden (Porter *et al*, 2001).

Videre er syntesen påvirket av andre miljøfaktorer, som temperatur. Økende temperaturer gir større amplituder i syntesen, slik at eksempelvis samme fotoperiode på vår og høst kan gi

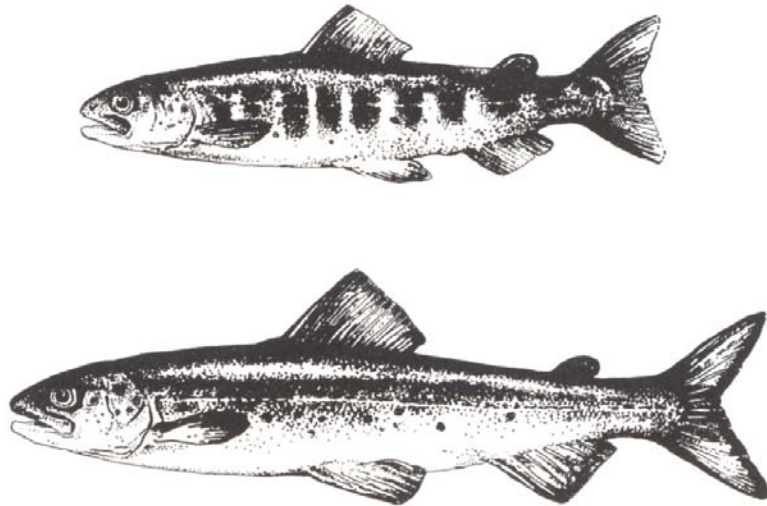
forskjellige nivå av melatonin i blodplasma signal når vanntemperaturen følger naturlige årssyklus. Lave temperaturer er vist å gjøre fotosensitive neuroner inn-sensitive, som gjør at signalet via melatonin er det eneste systemet som ved lave temperaturer bringer informasjon om fotoperiode. Lave temperaturer begrenser, mens høye temperaturer vil øke eller framskynde, den fysiologiske effekten av endringer i fotoperioder som for eksempel økning i daglengde (Falcon *et al*, 2010; Porter *et al*, 2001).

Kortisol har blitt sett på som svært viktig for utviklingen av sjøvannstoleranse hos smolt, men virker trolig synergisk med både veksthormon (GH) og prolaktin. Kortisol og GH regnes for å stimulere dannelsen av sjøvannstype MRC, i tillegg til å utvikle den osmoregulatoriske evnen i den gastrointestinale trakt (Björnsson *et al*, 2011; McCormick *et al*, 2000).

Det er også en korrelasjon mellom nivå av plasma GH og aktivitet av gjelle Na^+ , K^+ -ATPase under smoltifisering. På samme måte som GH, ser man også en utvikling i insulin-lignende vekstfaktor 1 (IGF-1) gjennom smoltifiseringen, og selv om økningen er i mindre omfang, regnes også IGF-1 som viktig for utvikling av den osmoregulatoriske kapasitet (Björnsson *et al*, 2011). Thyroide hormoner (T_3 og T_4) øker også i løpet av smoltifiseringen, og er regnet for å regulere morfologiske endringer, som sølvfarging, og adferd (Björnsson *et al*, 2011). Prolaktin, som virker synergisk med kortisol, regnes for å være inhiberende for effektene av GH, samt stimulere dannelsen av ferskvannstype MRC, men avviker fra de andre hormonene ved at plasmanivå faller, mens nivå av de andre hormonene når toppen mot sluttfasen av smoltifiseringen. Denne mekanismen kan være nødvendig for at pre-adaptingen til det marine miljø, mens fisken enda er i ferskvann (Björnsson & Bradley, 2007; Björnsson *et al*, 2011; McCormick *et al*, 2000; Tipsmark & Madsen, 2009).

1.6.2 Morfologiske endringer

Morfologisk endrer parren seg fra å være grønn(-brun)-farget med mørkere felt (parr-/fingermerker) til å bli sølvblank, med finner som mørkner i ytterkant. Videre kan man også se nedgang i kondisjonsfaktor hos smolten, som medfører en mer langstrakt kroppsform, reduksjon av brystfinneareal, samt at skjellene i huden sitter mer løst (Hoar, 1976; Iversen & Eliassen, 2011; Staurnes *et al*, 1992).



Figur 6. Visuelle forskjeller mellom parr (øverst) og smolt (nederst) av atlantisk laks (*Salmo salar* L.) (Staurnes *et al*, 1992).

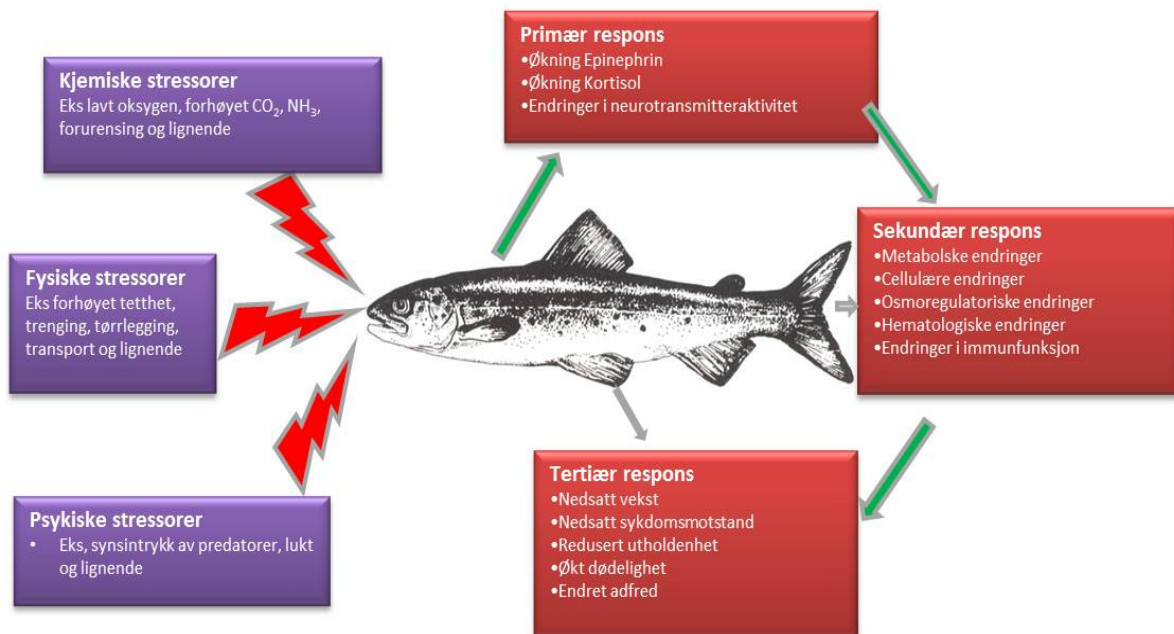
1.6.3 Endringer i adferd

I løpet av smoltifiseringen, parallelt med fysiologiske og morfologiske endringer, endres også adferden, spesielt tydelig er det at evnen og instinktet til å svømme mot strømmen reduseres, slik at svømmeretning blir mer vilkårlig, og ofte lar den seg passivt føre med strømmen. Dette kan også observeres til en viss grad i oppdrettssammenheng (Hoar, 1976; Staurnes *et al*, 1992).

1.7. STRESS

Stress er definert som en tilstand der den dynamiske likevekten («equilibrium») til en organisme, homeostasen, er truet eller forstyrret, som følge av interne eller eksterne stimuli (stressorer) (Barton, 2002; Chrousos & Gold, 1992; Selye, 1950; 1973; Wendelaar Bonga, 1997). Effekten av stress er todelt, på ene siden skapes effekter som truer eller forstyrrer homeostasen, og på den andre siden utløses både adferdsmessige og fysiologiske responser som regnes som kompensatoriske og adaptive, og som sørger for at organismen overviner trusselen mot homeostasen. Langvarige, eller overveldende stressorer kan medfører at de ulike responsene mot stressoren blir maladaptive og dermed skadelig for organismen. Stressresponsen kan deles inn i 3 ulike nivå. Den primære stressrespons, omfatter blant annet utskillelse av katekolaminer som adrenalin og noradrenalin, og kortiskosteroider som hos fisk primært er kortisol. Adrenalin (epinephrine) blir lagret i såkalt kromaffine vev lokalisert i fremre del av nyre på fisken (hodenyren), og skilles raskt ut i blodbanen ved stimulering via sympatiske nervefibre (Barton, 2002). Utskillelse av kortisol er aktivert gjennom hypotalamus-hypofyse interrenal aksens, og starter med frigjøring av corticotropin-releasing hormone (CRH) fra hypotalamus. CRH stimulerer så stimulerer så frigjøring av adenokortikotropin (ACTH) fra hypofysen. Sirkulerende ACTH stimulerer så interrenalceller, lokalisert

i fremre del av nyre, til å syntetisere og frigjøre kortisol til blodbane. Kortisol vil så feste seg til og påvirke vev og celler med spesifikke reseptorer for kortisol (intracellulært) (Barton, 2002; Reid *et al*, 1998). Dannelsen av kortisol omfatter en enzymatisk omdannelse av kolesterol, via flere steg, til kortisol, og den enzymatiske delen vil være påvirket av fiskens omgivelsestemperatur (Barton, 2002; Mommsen *et al*, 1999). Disse to primære neuroendokrine responsene (adrenalin og kortisol) fører så til sekundære og tilslutt til tertiære effekter, som oppsummert i **Figur 7**.



Figur 7. Stressorer og mulige virkninger på fisk. Tilpasset og modifisert etter figurer av Barton (2002) og Iversen & Eliassen (2012).

Ved å måle nivå på plasmakortisol har man mulighet til å kvantifisere den primære stressresponsen som fisk utsettes for gjennom normal produksjon, og spesielle episoder som håndtering, sortering, vaksinerings og utsett i sjø (Barton, 2002; Iversen & Eliassen, 2012; Wendelaar Bonga, 1997). I industriell smoltproduksjon vil vanlige stressorer omfatte pumping, sortering, vaksinerings, flytting, og livssyklusen til laks dikterer også at man i kombinasjon til andre stressorer, vil ha en overføring av større fiskegrupper fra ferskvann til sjøvann i forbindelse med transport og utsett på sjølokalitet. Det er også kjent at flere stressorer i samme tidsperiode vil kunne opptre kumulative, slik at stressresponsen totalt blir større enn det hver enkelt stressor skulle tilsi. Kumulative stressresponsen kan unngås ved å gi fisken tid mellom hver enkelt stressor, hvor dette er mulig. Uten tid til å gjenopprette homeostase, kan sekundære, ikke-dødelige stressorer vise seg å bli dødelige (Finstad *et al*, 2003; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen & Eliassen, 2012; Iversen *et al*, 1998; Iversen *et al*, 2009; Iversen *et al*, 2005; Mommsen *et al*, 1999; Wendelaar Bonga, 1997). I løpet av smoltifiseringsprosessen skjer det en naturlig økning av basal-nivået av kortisol, som følge av den

endokrine smoltifiseringsprosessen (se kapittel 1.6), og at dette kan medføre at laksesmolten blir mer følsom for stressorer sammenliknet med andre livsstadier til laksen faser (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen & Eliassen, 2012; Iversen *et al*, 1998)

1.8. MANIPULERING AV SMOLTIFISERING I OPPDRETT

I oppdrettssammenheng kan smoltifiseringsprosessen i hovedsak manipuleres gjennom valg av øyerogn, inkuberingstemperatur, gjennom temperaturavhengig tilvekst i yngel- og parrfasen, gjennom strategi for sortering og vaksinerings, bruk av sjøvannstilsetting, og fremfor alt gjennom manipulering av fotoperiode.

1.8.1 Rogn og inkubering

Som nevnt tidligere nevnt leveres rogn som såkalt tidligrogn, normalrogn og seinrogn. Dette gir et fleksibelt grunnlag for videre produksjon. Rogn leveres i øyerognstadiet som inntreffer ved ca. 230-250 døgngader (dgr) etter befruktning, og man regner normal klekking vil skje ca. 500-550 dgr (ca 300 dgr etter øyerognstadiumet), avhengig av temperaturen. Det anbefales at inkuberingen skjer på 4-8°C for å redusere risiko for deformiteter, og dermed kan lengden på inkuberingsperiode grovt sett reguleres fra om lag 35 til 75 dager (Salmobreed, 2011; Willoughby, 1999).

1.8.2 Temperatur i yngel og parrstadium.

Siden fisk er vekselvarm vil vanntemperaturen ha en direkte virkning på de fleste fysiologiske prosesser, og vanntemperaturen er tidligere beskrevet som den viktigste abiotiske faktoren for fisk (Brett, 1971). Innenfor spennet av toleransetemperaturen har temperaturen sterk effekt på enzymatiske prosesser, og økning av temperatur fører med seg økning av hastigheten på enzymatiske prosesser. Dette gir blant annet effekter på metabolisme, slik at høyere temperaturer over tid vil gi høyere tilvekst (Crocket & Londrville, 2006; Donaldson *et al*, 2008). På den andre siden vil lavere temperatur redusere enzymatiske prosesser og ved hurtig nedgang i temperatur, ned mot toleransegrensen, kan fisken i enkelte tilfeller få såkalt kuldesjokk. Kuldesjokk kan omfatte både fysiologiske og adferdsmessige endringer, og i ekstreme tilfeller dødelighet (Donaldson *et al*, 2008).

1.8.3 Bruk av sjøvann i produksjon

I følge Toften (2011) bruker 45 % av smoltanlegg sjøvann i sin produksjon. Sjøvann brukes som bufring i vannkilder som er ionefattige (0,2-3%), som ekstra vannkilde for å øke produksjonen, samt for manipulere temperatur, og i noen tilfeller som sjøvanns-akklimering. Bruk av sjøvannsinnblanding under 15 ‰ er ikke kjent å gi større fysiologiske forandringer eller være negativ for fiskevelferd, og er, under forutsetning av at tilsetningen ikke uløser problemer med metaller fra

ferskvannskilde, en god måte å øke produksjonskapasiteten (Toften, 2011) . For enkelte anlegg vil sjøvannet i perioder gi signifikant temperaturøkning som framskynder tilvekst og smoltifisering. Når fisken er ferdig smoltifisert kan høyere saliniteter (15-34 ‰) brukes for å holde fisken fram mot utsett i sjøanlegg, men helst over kortere perioder (2-4 uker), da risiko for å utvikle blant annet større utbrudd av vintersår øker etter 2-4 uker (Iversen & Eliassen, 2012; Toften, 2011).

1.8.4 Fotoperiode

Som tidligere nevnt, er fotoperiode ansett som den viktigste faktoren for å regulere smoltutvikling hos laks. Manipulering av fotoperioden kan også brukes til å produsere sjøklar smolt utover store deler av året. Lakseparr, over en viss størrelse, er avhengig av at fotoperioden signaliserer vinter (kort dag, lys : mørke 12L:12M), som deretter etterfølges av signal om vår (lang dag 24L:0M). Den gradvise naturlige økningen i daglengde synes ikke å være nødvendig, mens perioden med 12L:12M varierer fra 5 til 12 uker. (Berrill *et al*, 2003; Døving, 1992; Handeland & Stefansson, 2001; Porter *et al*, 2001; Sigholt *et al*, 1995). Lysintensiteten i lysperioden bør ligge over 20-40 lux for å sikre optimal utvikling, og redusere risiko for utvikling av deformiteter i ryggrad og finneslitasje (Handeland *et al*, 2013) . Etter overgangen fra kort dag til kontinuerlig lys, synes det som at fisken fullfører smoltifiseringen, og har optimal hypo-osmoregulatorisk evne, etter omlag 400 døgngrader (Handeland & Stefansson, 2001; Sigholt *et al*, 1998; Sigholt *et al*, 1995).

1.9. HOVEDMÅL

Hovedmålet med denne oppgaven er å tilegne og dokumentere kunnskap innen den industrielle styrte smoltifiseringsprosessen av laks (*Salmo salar*), og hvordan ulike håndteringsprosedyrer kan påvirke smoltkvaliteten. Dette ble forsøkt dokumentert i to ulike forsøk i våren 2010 og 2011.

Stress kan ha en negativ effekt på osmoregulatoriske kapasiteten til laksesmolt og kan påvirke ionebalansen til laksesmolt (Iversen *et al*, 1998). I forsøk 1 ønsket en å dokumentere effekten av transportstress, og hvordan en tilleggsstressor («sammentrengingsstressor») påvirket den osmoregulatoriske kapasitet i sjøvannstester under smoltutviklingen.

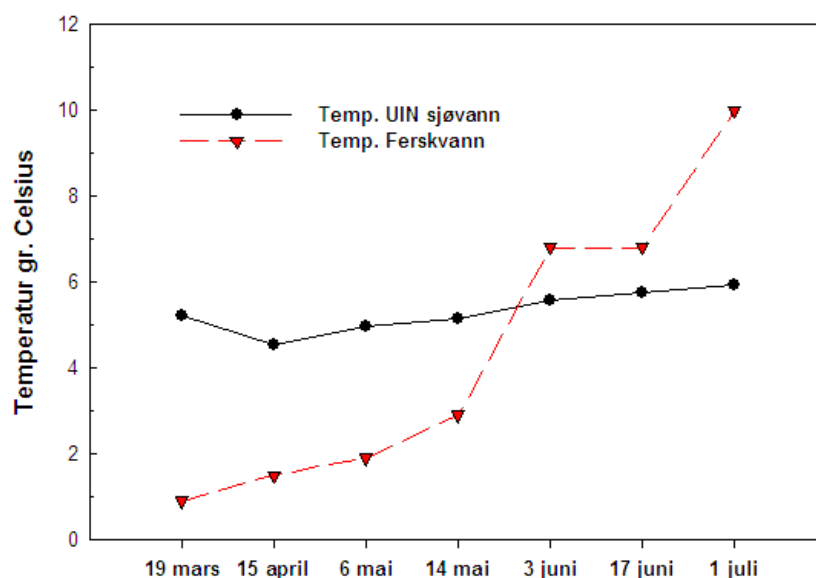
Med introduksjonen av resirkuleringsteknologi i smoltanlegg vil høye temperaturer ferskvannsfasen om vinteren gjøre det mulig å levere smolt på et tidspunkt hvor temperaturene i sjø fremdeles er lave. Flere settefiskanlegg i Nordland har i 2011-12 søkt om dispensasjon for å få lov til å sette ut sjøvannsdyktig settefisk i januar og februar måned (Truls Theting, smoltkoordinator, Mainstream Norway AS). En ønsket derfor i forsøk 2 å se på hvordan en brå overgang fra høy temperatur i ferskvann til lav temperatur i sjøvann påvirket osmoreguleringen på sjødyktig smolt under sjøvannstester, og hvordan akklimering til lav temperatur i ferskvann påvirker disse.

2. MATERIALE OG METODE

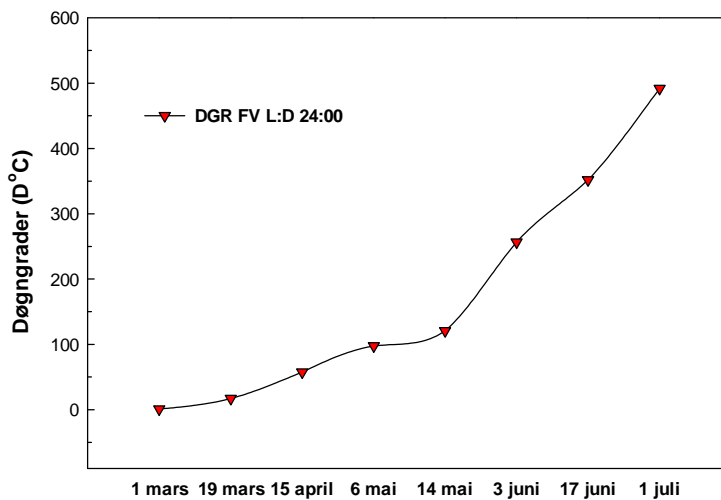
Det ble gjennomført to forsøk i forbindelse med dette arbeidet. Forsøk 1 ble gjennomført våren 2010, og en fulgte en gruppe laksesmolt i vanlig kommersiell produksjon igjennom smoltifisering i perioden mars til juli. Forsøk 2 ble gjennomført vinteren 2011, som et eksperimentelt oppsett i lokalene til Universitetet i Nordland, med fokus på effekt av temperatur-akklimering ved utsett fra høye ferskvanns- til lave sjøvannstemperaturer.

2.1. FORSØK 1

Fisk i forsøk 1 kom fra øyerogn (AquaGen AS) som ble klekket februar 2009 ved Mainstream Norway AS, avdeling MN-Hopen. MN-Hopen (N/B0005) har en produksjonstillatelse på 2.500.000 sjødyktig settefisk. Anlegget er et rent ferskvannsanlegg med naturlige vanntemperaturer fra 0,5- 12 °C. Ved anlegget benytter man ferskvann fram til utsett i mai, juni og juli (1+), eller til utsett i september og oktober (0+). Ved sortering i november ble forsøksgruppen sortert som tredje sortering, dvs. fisk som var relativt små innen den opprinnelige gruppen. Gruppen ble vaksinert desember 2009 og 198.840 stk. ble overført til kar for påvekst og smoltifisering fram til tidlig juli 2010. Temperaturene varierte fra 0,9 til 10 °C. Smoltifiseringen ble kontrollert gjennom en lysstyringsperiode med en kortdagsperiode (12M:12L) på fem uker, etterfulgt av langdagsperiode (24:00) fra 1 mars 2010 fram til utsett av fiskegruppen i sjø.



Figur 8. Utvikling i temperatur ved anlegget fisken ble hentet fra og i sjøvann ved UiN sine forsøkslokaler.



Figur 9. Døgngrader beregnet fra 1. mars 2010, ved overgang fra kortdagsperiode til langdagsperiode.

Snittvekten var 39 g ved vaksinerings og 54,8 g ved utsett, som gir gjennomsnittlig daglig tilvekst på 0,16 %. Dødeligheten i perioden fra vaksinerings til utsett var totalt på 0,93 %, og etter utsett i sjø ble det registrert en akkumulert dødelighet på 1,39 % de første 30 dagene.

Det ble tatt ut fisk i syv prøveuttak (perioden mars til juli 2010), og ved hvert prøveuttak ble ca. 50 fisk tatt ut av karet ved smoltanlegget, og transportert til UINs forsøkslokaler i Mørkvedbukta ved hjelp av bil. Transporttid var ca. 70 minutt. Ved ankomst Mørkvedbukta ble 12 fisk håvet ut fra transportkar, og over i bedøvelse for uttak av blodprøver (FV, etter transport). Resterende fisk i transportkaret ble det fordelt ut til to 450 L kar med sjøvann (33.5 ‰) 16 i hvert kar. Vannstrøm ble satt til 10 L/min, og temperatur i forsøksperioden var $5,2 \pm 0,8$ °C. Som kontroll på uforstyrret fisk i anlegget benyttet man fisk som ble målt i samme kar i samme tidsperiode ved MN-Hopen i prosjektet «stressmapping» (Iversen & Eliassen, 2012). Kort fortalt ble hvilenivåene av plasmakortisol i dette karet overvåket hver 14de dag i perioden november 2009 til juli 2010. Målingene ble foretatt mandags morgen klokka 08.00 før første røkterunde ble igangsatt.

Fisk i de to karene med sjøvann ble eksponert i 72 timer. Fisk i det ene sjøvannskaret ble skjermet, og holdt uforstyrret, mens laksesmolten i det andre karet ble eksponert for en daglig stressor (3 ganger i løpet av 72 timer). Den tilførte stressoren (såkalt «sammentrengingsstress» eller «crowding stress») besto av at vannstand ble senket til fisken berørte karbunnen med buken. Tapping ble stengt og vannstanden økte sakte i 5 minutt før en gjentok nedtapping, til buken igjen berørte karbunnen. Dette ga varighet på stressoren på ca., 15 minutter med vannstand lavere enn 10 cm. Denne behandlingen førte til fluktreaksjon, og forhøyet aktivitetsnivå hos fisken. Etter 72 timer

ble det tatt ut blodprøver av 12 fisk fra hver av disse to gruppene (for prøvetakingsmetode se kap. 2.3).

2.2. FORSØK 2

Fisk i forsøk 2 kom fra øyerogn (AquaGen AS) som ble klekket februar 2010 ved MN-Hopen (for nærmere beskrivelse av anlegget se kap. 2.1). Lakseparren ble overført fra smoltanlegget i november 2010, og holdt i ferskvann (0 ‰) i et resirkuleringsanlegg (13.6 ± 1.6 °C) i lokalene til Universitet i Nordland (UIN), fram til forsøket startet i mars 2011. Smoltifiseringen ble kontrollert gjennom en lysstyringsperiode med en fem uker lang kortdagsperiode (12L:12M) etterfulgt av langdagsperiode (24L:0M) ($13,6 \pm 1,6$ °C, totalt ca 700 dgr)

Etter smoltifisering (verifisert med 48 timers sjøvannstest), ble forsøket igangsatt hvor en skulle studere osmoreguleringen hos laksesmolt etter 0, 24, 48 og 72 timer i sjøvann akklimert i 3 og 11 dager ved temperaturene 4.0 og 13 °C i ferskvann. Prøveuttak ved 0 timer var uforstyrret fisk med den hensikt å kartlegge hvilenivå ved aktuell temperatur og akklimeringslengde (kontroll). Den 17.03.2011 ble all fisk overført fra høy temperatur ferskvann (13.6 °C) til enten høy temperatur (13.6 °C) eller lav temperatur (4.0 °C). Disse to temperaturgruppene blir videre i oppgaven omtalt som henholdsvis 13 gr. akklimering og 4 gr. akklimering. Disse to gruppene ble deretter etter tre dager og 11 dagers akklimering ved sine respektive temperaturer (4 og 13 °C) satt over i kar med 4.0 °C sjøvann for sjøvannstester. Det ble tatt ut blodprøver av fisken etter 0 (kontroll, ferskvann), 24, 48 og 72 timer i sjøvann. Alle gruppene i sjøvannstest sto i egne skjermede kar.

2.3. PRØVETAKING

All fisk sto skjermet og uforstyrret før prøvetaking. Fisken ble raskt håvet over i bønne med Metomidate 5 mg/l. Blodprøver ble deretter tatt fra kaudalårekomplekset, helblod ble sentrifugert i 5 minutter ved 5000G, og plasma pipettert over i merkede eppendorfrør. Plasma ble lagret i -36 °C fryser fram til analyse.

I forsøk 1 ble det i tillegg tatt ut gjellelev for analyse av Na^+K^+ -ATPase. En liten mengde gjellelev, ca 2 x 2 mm, ble klippet av gjellebue nummer 2 på venstre side, og deretter overført til eppendorfrør med SEI-buffer. Dette røret ble umiddelbart overført til flytende nitrogen for raskt innfrysing. Ved prøvetaking ble fisken veid og gaffellengde målt. Morfologisk utvikling ble vurdert ved prøvetaking for beregning av smoltindeks.

2.4. ANALYSER

2.4.1 Kondisjonsfaktor

Kondisjonsfaktor ble regnet ut etter formelen:

$$KF = \frac{Vekt (g) * 100}{Lengde^3}$$

2.4.2 Smoltindeks

Smoltindeks ble beregnet som gjennomsnittet av de tre faktorene sølvfarge, parrmerker og sorte finnekanter satt som smoltindeks. Smoltindeks ble vurdert samtidig som man målte vekt og lengde, på fisk som var nylig avlivet. Kriterier for smoltindeks i tabell under (Folmar & Dickhoff, 1980; Havbruksinstituttet, 2003; Hoar, 1976)

Tabell 2. Smoltindeks, kriterier for bedømming av ulike faktorer i smoltindeks

Faktor	Morfologisk vurdering			
Sølvfarge	Ingen	Svakt synlig	Synlig	Sølvblank
Score	1	2	3	4
Parrmerke	3. Sterke	4. Synlige	5. Svakt synlige	6. Ingen
Score	1	2	3	4
7. Sorte Finnekanter	8. Ingen	9. Svakt synlig	10. Synlig	11. Markert sorte
Score	1	2	3	4

2.4.3 Osmolalitet og klorid

Osmolalitet og klor i plasma ble målt med henholdsvis en Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, Norwood, MA, USA) og en Sherwood Chloride analyse 926s (Sherwood Scientific LTD, UK).

2.4.4 Magnesium

Magnesium (Mg^{2+}) i plasma ble analysert med et analysekit, Fluitest[®] Mg-XB levert av Biocon[®] (Biocon[®] Diagnosemittel GmbH & Co, Tyskland). Dette er en kolorimetrisk metode, hvor magnesium danner et lilla kompleks med xylidyl blått, og konsentrasjonen av magnesium kan leses fotometrisk som avtakende xylidyl blå absorbanse. 10 µl blodplasma fortynnes i 1 ml reagens og inkuberes i 10 minutter ved 22°C, før avlesing i plateleser ved 520 nm. Ved å regne mot blank prøve og magnesium

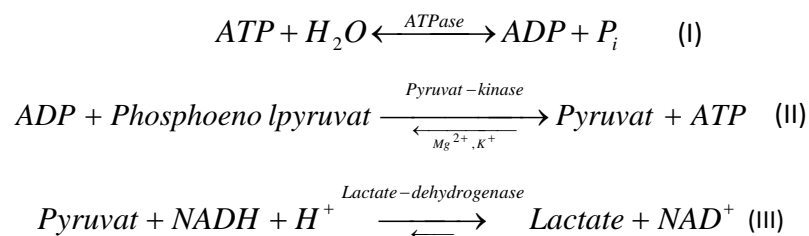
standard får man prøvens magnesiuminnhold som mmol L^{-1} (mM). Deteksjonsgrense for analysen var på 0,4 mM.

2.4.5 Kortisol

Konsentrasjonen av kortisol i plasmaet ble analysert etter en RIA-metode beskrevet av Ivesen *et al* (1998). Kort beskrevet benyttet en [^3H]-kortisol (TRK 407, Institutt for energiteknikk, Kjeller) som tracer. Standard- rekke ($0\text{-}137,5 \text{ nmol L}^{-1}$) ble laget av hydrocortison (H 4001, Sigma). Antistoffet ble skaffet fra (F3-314) Endocrine Science, Tarzana USA. Prøvene ble sentrifugert (Haraeus sepatech Omnifuge 2.ORS radius 154 mm, rotor 3360) og inkubert ved $1\text{-}2 \text{ }^\circ\text{C}$ i 24 timer. Antistoff-antigen komplekset ble telt i en scintilasjonsteller type Packard Tri Carb 1900 TR. Sensitiviteten var på assayen var $1,68 \text{ nmol L}^{-1}$ (nM). Prøver under "detection limit" ble satt lik sensitiviteten til assayen. Intraassay var mindre enn 10 %, og interassay var 12,5 % ved henholdsvis 80 nmol L^{-1} . NSB varierte fra 2.1 til 4,8 % av den totale aktivitet. Tidligere kvalitetstester ved laboratoriet til Universitet i Nordland gav følgende resultat. Måling av 4, 17, 34 og 69 nM radiomerket kortisol tilsatt plasma viste en gjenvinning på henholdsvis 90, 94, 96 and 95 % (gjenvinningstest). En serie fortykning av blodplasma av stresset atlantisk laks gav en tilnærmet parallell line til dose respons kurven (parallellitetstest= immunologisk identitet).

2.4.6 Gjelle ATPase ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$)

$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ aktivitet i gjellelev ble analysert etter en metode beskrevet av McCormick (1993b). (1993b) Metoden angir $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ aktivitet som hastigheten en gitt mengde enzym hydrolyserer Adenosintrifosfat (ATP) til Adenosindifosfat (ADP) og fosfor (P_i). Oubain er en spesifikk hemmer for $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ aktivitet. Mengden $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ kan kalkuleres ut fra mengde ADP produsert. Ved å korrigere total $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ aktivitet for proteininnhold og et stigningstall fra en ADP standardkurve, kan man uttrykke $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ som $\mu\text{mol ADP/ mg protein/ time}$ (Figur 10).



Figur 10. Trinnvis og forenklet modell av reaksjonsmønster i $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ analysen. (McCormick, 1993)

For å standardisere prøvetaket ble gjellelev fra gjellebue nummer 2 på venstre side ble tatt, og øyeblikkelig frosset på SEI – løsning. Gjellelev i buffer ble etter tining homogenisert, og sentrifugert. Supernatanten fra denne sentrifugeringen ble analysert for $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ og total-protein.

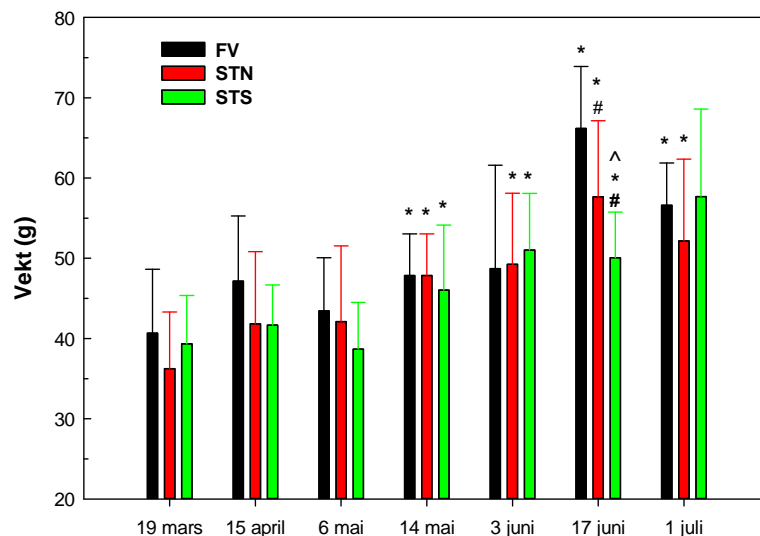
2.5. STATISTISK METODE

Alle statistiske analyser ble utført med Sigmaplot 12 (Systat Software Inc. US). Normalitet og homogenitet ble testet med Kolmogorov-Smirnov test og Levene test. Enveis ANOVA (eventuelt etterfulgt av Tukey eller Dunn`s post-hoc test) eller Student`s T-test ble brukt for å finne signifikante forskjeller innad i og mellom uttak, og materiale som ikke besto normalitetstesten ble analysert ved å benytte ikke-parametriske tester som Kruskal-Wallis ANOV oneway (eventuelt etterfulgt av Tukey eller Dunn`s post-hoc test), og Mann-Whitney U test. Signifikant forskjell ble bestemt på 0.05 nivå. Alle resultater er uttrykt i gjennomsnitt med standard avvik ($\bar{x} \pm SD$)

12. RESULTATER

3.1. FORSØK 1

3.1.1 Vekt (g)



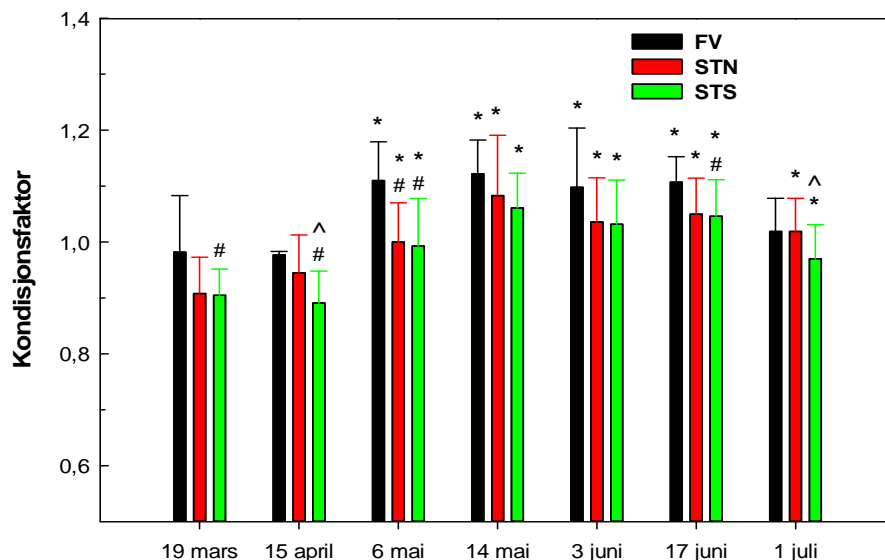
Figur 11. Gjennomsnittlig vekt ($g \pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggs-stressor (STS) (sammmentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS(n=12).

Figur 11 viser utviklingen i vekt i fra 19. mars til 1. juli. Den gjennomsnittlige vekten varierte fra henholdsvis FV etter transport (FV); $40,6 \pm 8,0$ g til $66,2 \pm 7,7$ g, 72 t SV-test Normal (STN); $39,3 \pm 6,0$ g til $57,7 \pm 9,5$ g, og 72 t SV-test Stress (STS); $36,3 \pm 7,1$ g til $57,7 \pm 10,9$ g (STS). Høyeste og laveste målte vekt i forsøksperioden var henholdsvis $86,3$ og $24,6$ g (FV), $72,8$ og $25,2$ g (STN) og $82,8$ og $26,0$

g (STS). Den 14. mai, 3. juni (unntatt FV), 17. juni og 1. juli (unntatt STS) var det en signifikant økning i gjennomsnittlige vekt sammenliknet med forsøksstart (19. mars). Den 17. juni var den gjennomsnittlige vekt i FV etter transport signifikant høyere enn de to SV-test gruppene ($p=0,001$), og gruppen STS var ved samme tidspunkt (17.06) signifikant lavere enn STN ($p=0,026$).

3.1.2 Kondisjonsfaktor

Figur 12 viser utviklingen i kondisjonsfaktor i forsøksperioden. De gjennomsnittlige nivåene for kondisjonsfaktor varierte fra henholdsvis $0,98 \pm 0,06$ til $1,12 \pm 0,06$ (FV), $0,91 \pm 0,06$ til $1,08 \pm ,10$ (STN) og $0,89 \pm 0,06$ til $1,06 \pm 0,06$ (STS). Høyeste og laveste enkeltverdi var henholdsvis 1,28 og 0,71 (FV), 1,15 og 0,82 (STN), og 1,15 og 0,8 (STS).

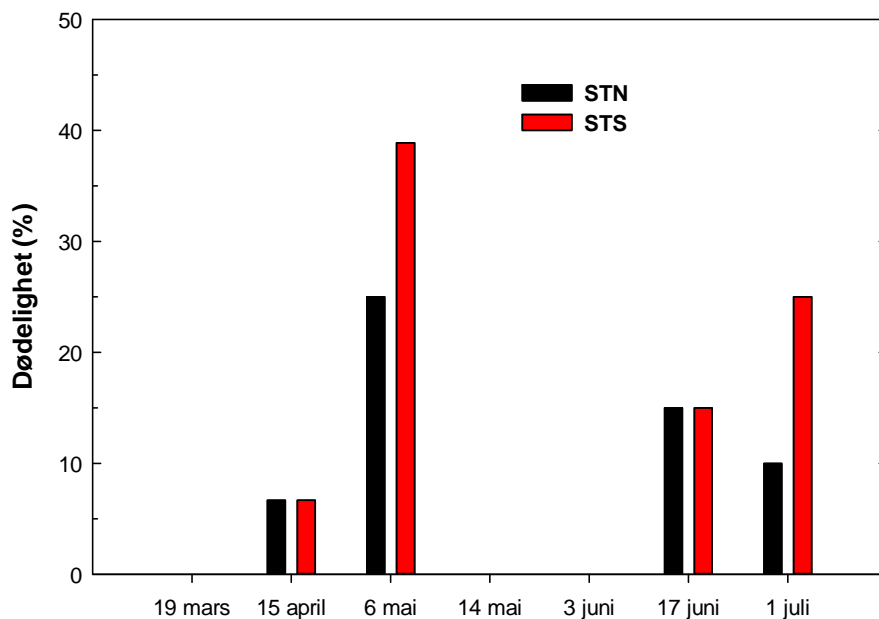


Figur 12. Gjennomsnittlig kondisjonsfaktor ($KF \pm SD$) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggs-stressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS ($n=12$).

Det var en signifikant forskjell i kondisjonsfaktoren i forhold til forsøksstart (19.03.10) den 6. mai , 14.mai, 3.juni, 17. juni og 1. juli (unntatt FV). 19 mars er STS signifikant lavere enn FV ($p=0,024$), og den 15. april er STS signifikant lavere enn både FV ($p=0,007$) og STN ($p=0,045$). Den 6. mai er begge SV-test (STN og STS) gruppene signifikant lavere enn FV-gruppen ($p=0,001$), 17. juni er STS signifikant lavere enn FV-gruppen ($p= 0,026$) og 1.juli er STS signifikant lavere enn STN ($p=0,030$) (**Figur 12**).

3.1.3 Dødelighet

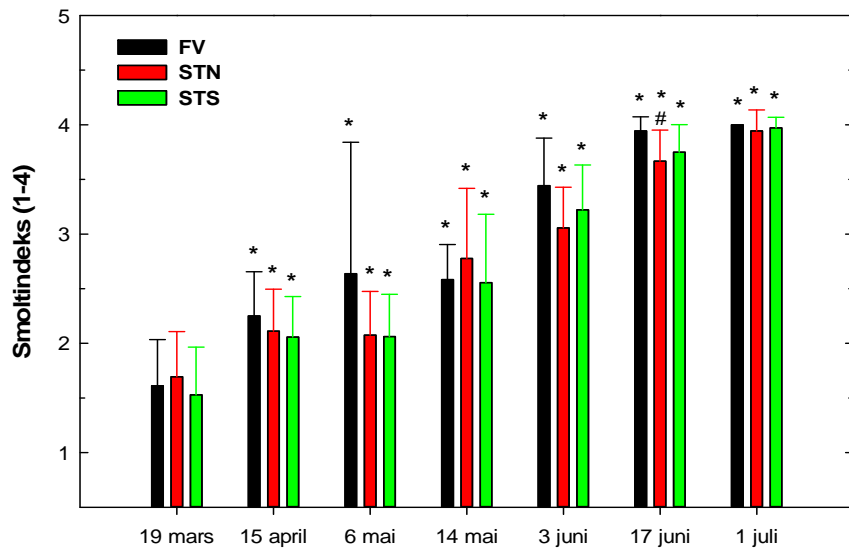
Figur 13 viser dødelighet registrert i forbindelse med forsøk 1. I gruppen FV etter transport ble det ikke registrert noen dødelighet. Ved uttakene 6.mai og 1.juli er dødeligheten i gruppen STS noe høyere enn for gruppen STN, høyeste dødelighet ble registrert den 6.mai med 25 % (STN) og 38,9 % (STS).



Figur 13. Dødelighet (%) for laksesmolt registrert i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor).

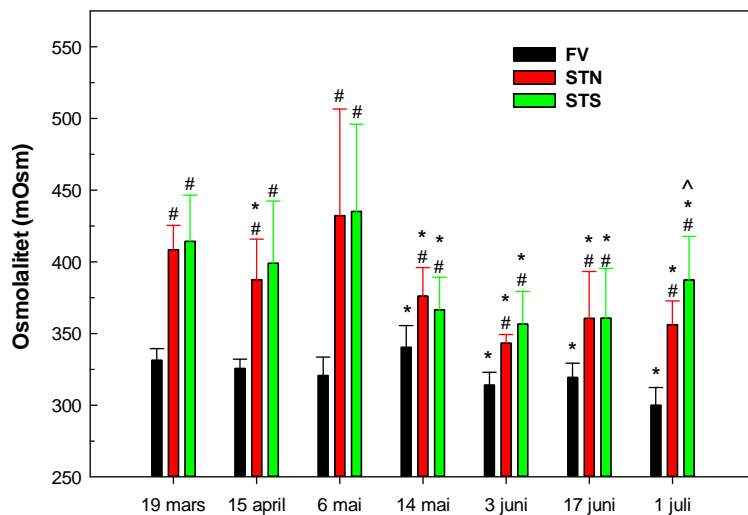
3.1.4 Smoltindeks

Figur 14 viser utviklingen i smoltindeks i forsøksperioden. De gjennomsnittlige nivåene for smoltindeks varierte fra henholdsvis $1,61 \pm 0,42$ til $4,00 \pm 0,00$ (FV), $1,69 \pm 0,41$ til $3,94 \pm 0,19$ (STN) og $1,53 \pm 0,44$ til $3,97 \pm 0,09$ (STS). Høyeste og laveste enkelt verdi var 4 og 1 (FV), 4 og 1 (STN), og 4 og 1 (STS). I perioden fra og med 15. april og ut forsøksperioden var gjennomsnittlig smoltindeks for de ulike gruppene signifikant større enn forsøksstart den 19.mars. 17. juni var STN signifikant lavere enn FV ($p=0,014$).



Figur 14. Gjennomsnittlig smoltindeks (\pm SD) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggs-stressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), mens # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt (n=12).

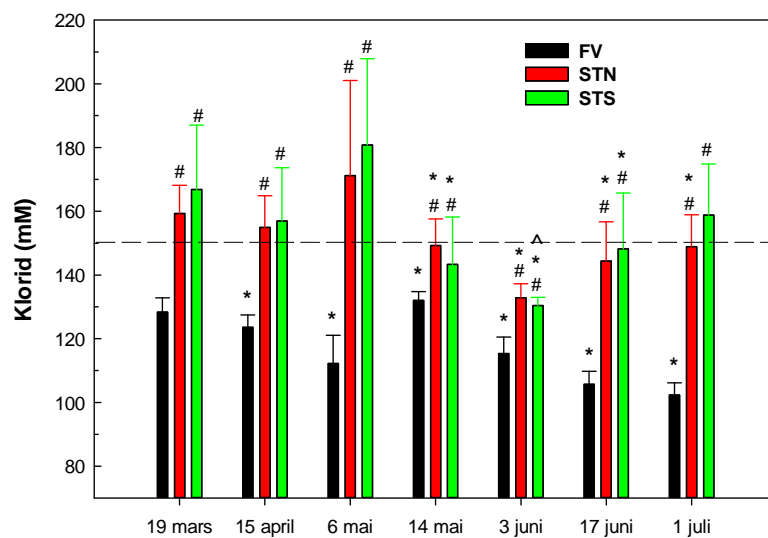
3.1.5 Osmolalitet



Figur 15. Gjennomsnittlig osmolalitet (mOsm) (\pm SD) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS (n=12).

Figur 15 viser utvikling for osmolalitet. De gjennomsnittlige nivåene for osmolalitet varierte fra henholdsvis $300,0 \pm 12,3$ til $340,4 \pm 15,2$ mOsm (FV), $343,2 \pm 6,1$ til $432,2 \pm 74,4$ mOsm (STN) og $356,6 \pm 22,8$ til $435,1 \pm 60,8$ mOsm (STS). Høyeste og laveste enkeltverdi var henholdsvis 366 og 275 mOsm (FV), 558 og 325 mOsm (STN), og 556 og 333 mOsm (STS). Gruppen FV var signifikant forskjellig fra målingen ved forsøksstart (19.03), og fra og med 14. mai og ut perioden, mens STN var signifikant forskjellig fra forsøksstart (19.03) 15.april, 14.mai, og ut perioden. Osmolaliteten i gruppen STS var tilsvarende signifikant forskjellig fra 14.mai og ut perioden sammenliknet med målingene gjort ved forsøksstart den 19.03. Begge gruppene STS og STN var signifikant høyere enn FV ved alle uttak ($p < 0,001$). 1.juli var STS også signifikant høyere enn STN ($p = 0,018$).

3.1.6 Plasmaklorid

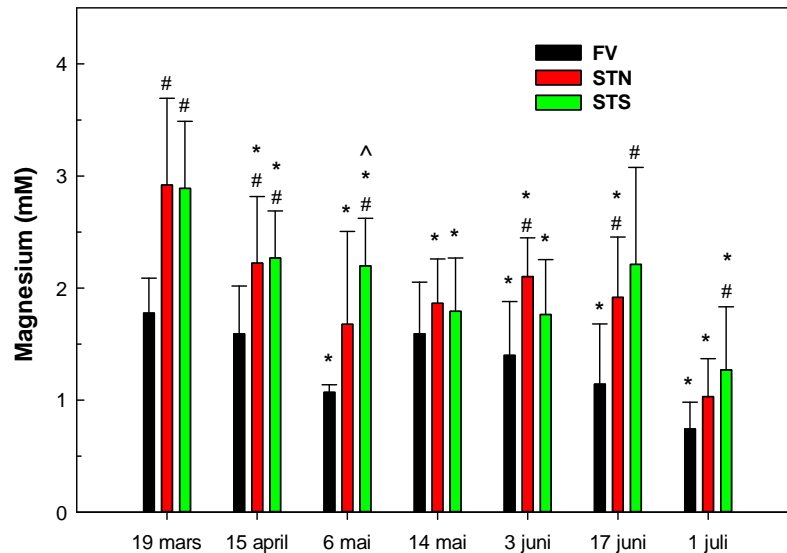


Figur 16. Gjennomsnittlig plasmaklorid (mM) (\pm SD) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS ($n=12$). Stiplet linje markerer 150 mM.

Figur 16 viser utvikling for plasmaklorid. De gjennomsnittlige nivåene for plasmaklorid varierte fra henholdsvis $102,3 \pm 3,8$ til $132,0 \pm 2,8$ mM (FV), $132,8 \pm 4,5$ til $171,2 \pm 29,8$ mM (STN) og $130,4 \pm 2,5$ til $180,8 \pm 27,1$ mM (STS). Høyeste og laveste enkeltverdi (mM) var henholdsvis 137 og 93 (FV), 216 og 122 (STN), og 218 og 114 (STS). Gruppen FV var signifikant forskjellig sammenliknet med forsøksstart (19.03.10) fra og med 15.april og ut perioden. Tilsvarende var plasmaklorid i gruppen STN signifikant forskjell sammenliknet med forsøksstart (19.03.10) ved prøvetakingstidspunkt 14.mai, 3. juni, 17.juni og 1.juli, mens STS var signifikant forskjellig fra første uttak ved prøvetakingstidspunkt 14.mai, 3. juni, og 17.juni. STN og STS gruppene var signifikant høyere enn FV den 19.mars ($p = 0,001$),

15.april (p=0,001), 6.mai (p=0,001), 14.mai (p=0,001), 3.juni (p=0,001), 17.juni (p=0,001), og 1.juli (p=0,001). 3. juni var STN signifikant høyere enn både FV og STS (p=0,033)

3.1.7 Plasmamagnesium



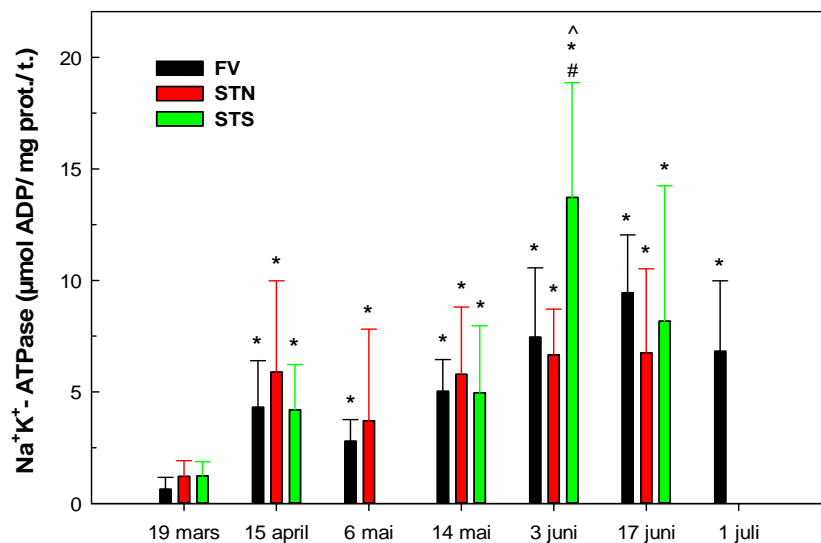
Figur 17. Gjennomsnittlig plasmamagnesium (mM) (\pm SD) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS (n=12).

Figur 17 viser utvikling for plasmamagnesium. De gjennomsnittlige nivåene for magnesium varierte fra henholdsvis $0,74 \pm 0,24$ til $1,78 \pm 0,31$ mM (FV), $1,03 \pm 0,34$ til $2,92 \pm 0,77$ mM (STN) og $1,27 \pm 0,56$ til $2,89 \pm 0,60$ mM (STS). Høyeste og laveste enkeltverdi (mM) var henholdsvis $2,51$ og $0,42$ (FV), $3,53$ og $0,63$ (STN), og $4,00$ og $0,66$ (STS). Gruppen FV var signifikant forskjellig fra første prøveuttak (19.mars) den 6.mai, 3.juni, 17.juni og 1.juli. Gruppen STN var signifikant lavere enn første prøveuttak fra og med 15.april og ut forsøksperioden, mens gruppen STS var signifikant lavere enn første prøveuttak ved 15.april, 6.mai, 14.mai, 3.juni, og 1.juli. FV gruppen var signifikant lavere enn STN-gruppen ved uttakene 19.mar (p=<0,001), 15.april (p=0,002), 3.juni (p=0,002), og 17.juni (p=<0,001). STS gruppen var signifikant høyere enn FV gruppen ved uttakene 19.mars (p=<0,001), 15.april (p=0,002), 6.mai (p=<0,001), 17.juni (p=<0,001) og 1.juli (p=0,011). På uttak 6.mai var SVT signifikant høyere enn STN (p=0,033).

3.1.8 GjelleATPase (Na⁺K⁺-ATPase)

Figur 18 viser utvikling for Na⁺K⁺-ATPase i forsøksperioden. De gjennomsnittlige nivåene for Na⁺K⁺-ATPase varierte fra henholdsvis $0,64 \pm 0,53$ til $9,45 \pm 2,60$ μ mol ADP/ mg protein/ time (FV), fra

1,22 ± 0,70 til 6,76 ± 3,77 μmol ADP/ mg protein/ time (STN) og fra 1,23 ± 0,64 til 13,72 ± 5,15 μmol ADP/ mg protein/ time (STS)



Figur 18. Gjennomsnittlig Na⁺K⁺-ATPase (μmol ADP/mg protein/time)) (±SD) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS(n=12).

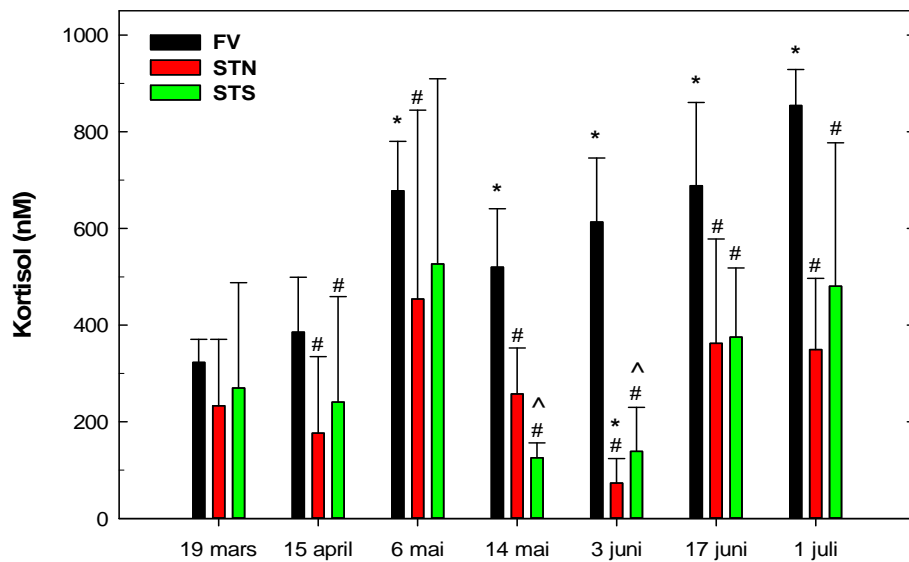
Høyeste og laveste enkeltverdi var henholdsvis 24,66 og 0,18 μmol ADP/ mg protein/ time (FV), 14,68 og 0,29 μmol ADP/ mg protein/ time (STN), og 24,66 og 0,06 μmol ADP/ mg protein/ time (STS). Gruppen FV hadde en signifikant høyere gjelleATPase fra første prøveuttak (19.mars) fra og med 15.april. Gruppen STN var signifikant forskjellig sammenliknet med første uttak fra og med 15.april, tilsvarende var STS signifikant forskjellig fra og med 15.april. Ved prøveuttak 3.juni var gruppen STS signifikant høyere enn både FV og STN (p=0,004).

3.1.9 Plasmakortisol

Gjennomsnittlige hvilenivå av plasmakortisol målt i MN-Hopen varierte fra 4,1 ± 5,9 nM til 135 ± 129,8 nM plasmakortisol, og gjennomsnitt for hele perioden var 48,3 ± 59,06 nM. Høyeste og laveste mengde plasmakortisol var 366,1 (28 juni) og 1,68 (5 april. og 18. mai) nM (Iversen & Eliassen, 2012).

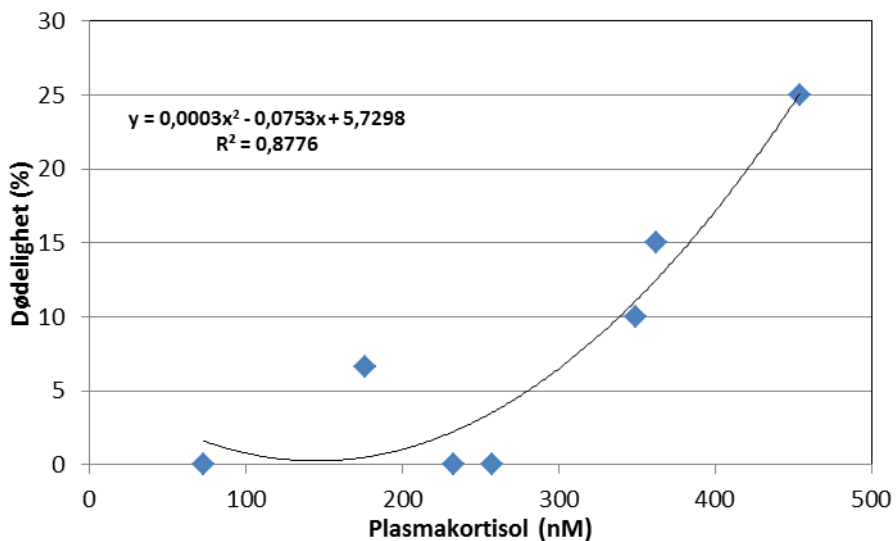
Figur 19 viser utvikling for plasmakortisol i forsøksperioden. De gjennomsnittlige nivåene av plasmakortisol varierte fra henholdsvis 322,6 ± 47,8 til 854,2 ± 75,8 nM (FV), fra 73,2 ± 50,8 til 454,0 ± 390,7 nM (STN) og fra 125,4 ± 31,1 til 526,7 ± 382,9 nM (STS). Høyeste og laveste målte plasmakortisol mengde var henholdsvis 938,4 og 205,9 nM (FV), 777,7 og 18,2 nM (STN), og 807,2 og 22,7 nM (STS). Plasmakortisol målt i gruppen FV var signifikant høyere sammenliknet prøveuttak ved forsøksstart fra og med 6.mai og ut forsøksperioden. Gruppen STN var signifikant lavere den 3.juni

sammenliknet med fra første prøveuttak (19.03). Med unntak av gruppene STN og STS den 14. mai og 3. juni var alle gjennomsnittlige målte plasmakortisol verdier signifikant høyere enn midlere hvilenivå målt i samme periode (Iversen & Eliassen, 2012)



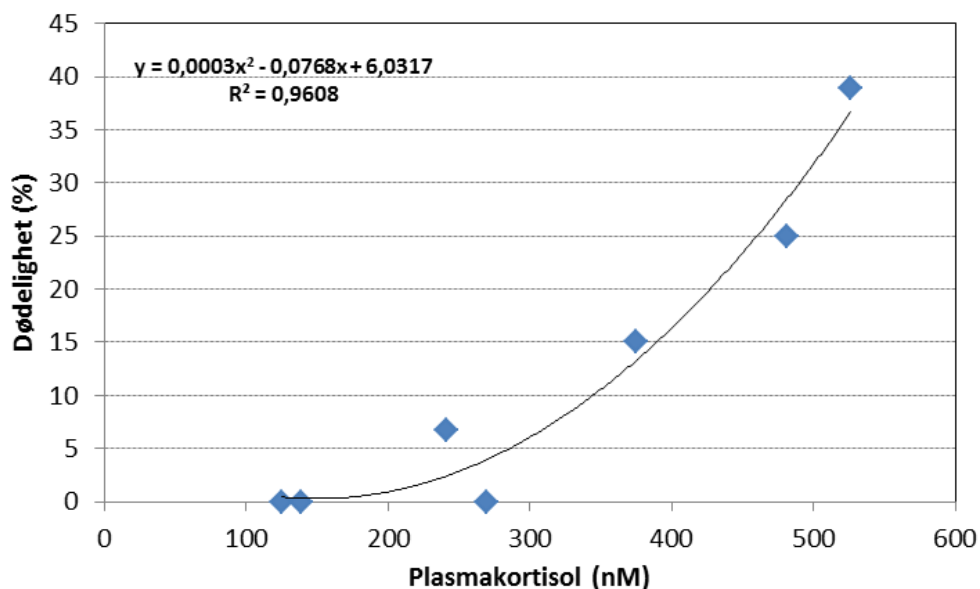
Figur 19. Gjennomsnittlig plasmakortisol (nM) (\pm SD) for laksesmolt målt i ferskvann etter transport (FV), 72 timer i sjøvann uten (STN) eller med daglig tilleggsstressor (STS) (sammentrengingsstressor). * indikerer signifikant forskjell fra start forsøk 1 (19.03.10), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, og ^ indikerer signifikant forskjell mellom STN og STS(n=12).

15. april var FV gruppen signifikant høyere enn både STN og STS ($p=0,001$), 6. mai var FV signifikant høyere enn STN ($p=0,048$), og fra og med 14. mai og ut forsøksperioden var FV signifikant høyere enn både STN og STS ($p<0,001$). Videre var STS signifikant lavere enn STN den 14. mai ($p=0,001$) og den 3.juni var STN signifikant lavere enn STS ($p=0,041$).



Figur 20. Sammenhengen mellom plasmakortisol i gruppe 72 timer uten daglig stressor (STN) og dødelighet

Dødelighet ble kun observert i de to gruppene i med 72 timer sjøvannstest (STN og STS). **Figur 20** og **Figur 21** viser sammenhengen mellom plasmakortisol og dødelighet. Spearman korrelasjonskoeffisient (sk) for gruppe STN og STS var henholdsvis 0,82 (P=0,0145) og 0,85 (P=0,006).



Figur 21. Sammenhengen mellom plasmakortisol i gruppe 72 timer med daglig stressor (STS) og dødelighet

Tilsvarende ble det vist en sammenheng mellom plasmakortisol og klorid for gruppen STS (sk=0,79; P=0,025). Som **Tabell 3** viser det en negativ sammenheng mellom plasmakortisol i

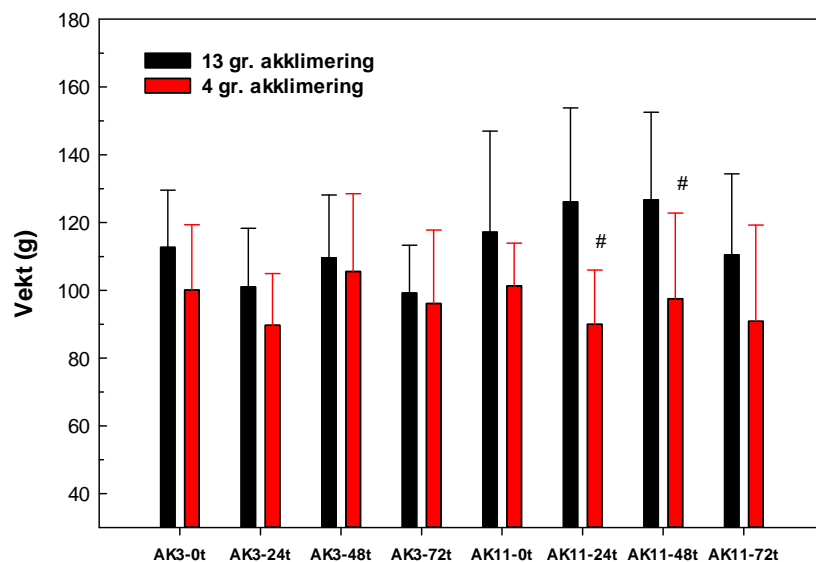
ferskvann og henholdsvis osmolalitet (sk=-0,786; p=0,0251), plasmamagnesium (sk=-0,929, p=0,0000002), plasmaklorid (sk= -0,893 p=0,0000002), og en positiv korrelasjon med vanntemperaturen i ferskvann (sk= 0,865, p=0,00609).

Tabell 3. Sammenhengen mellom plasmakortisol i FV etter transport og ulike fysiologiske målte parametere i ferskvann (signifikant sammenheng indikert med rød skrift)

	Temperatur	Klorid	Osmolalitet	Magnesium	ATPase
Korrelasjons Koeffisient	0,865	-0,893	-0,786	-0,929	0,643
p-verdi	0,00609	0,0000002	0,0251	0,0000002	0,0956

3.2. FORSØK 2

3.2.1 Vekt (g)



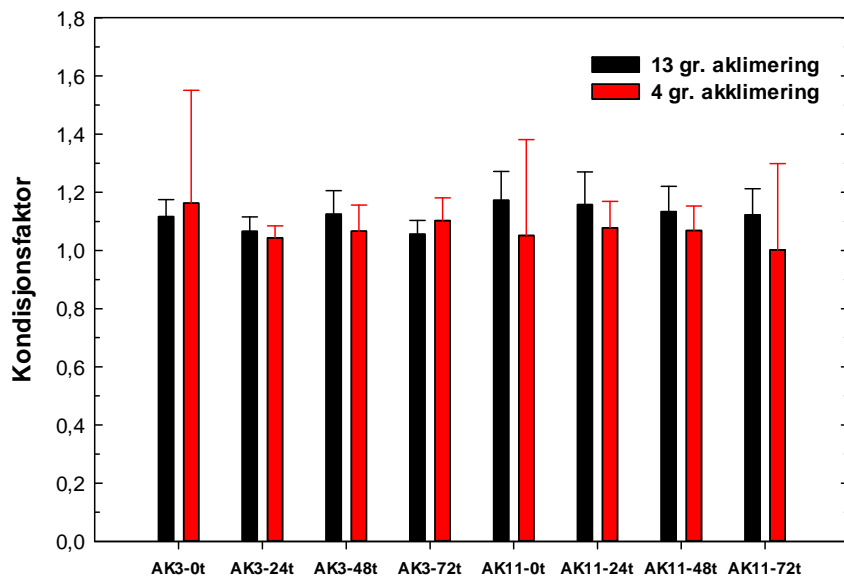
Figur 22. Gjennomsnittlig vekt (g) (\pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt (n=12).

Figur 22 viser gjennomsnittlig vekt i gram (g) ved 3 og 11 dagers akklimering for gruppen 13 gr. Akklimering (13 °C) og gruppen 4 gr. Akklimering (4 °C). Det ble tatt ut fisk fra ferskvann (0 t) og så etter 24 t, 48 t og 72 t sjøvannstest. Den gjennomsnittlige vekten varierte fra henholdsvis $99,3 \pm 14,1$

g til $128,8 \pm 25,8$ g for gruppen $13\text{ }^{\circ}\text{C}$, og fra $90,0 \pm 16,0$ g til $105,6 \pm 23,0$ g for gruppen $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Høyest og laveste målte enkeltverdi av vekt var henholdsvis 198,5 og 63 g ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og 156,1 og 53,6 g ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Det var signifikant forskjell mellom gruppene etter 11 dagers akklimering og 24 t og 48 t i sjø, og $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ var signifikant større enn $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,001$) og ($p = 0,002$).

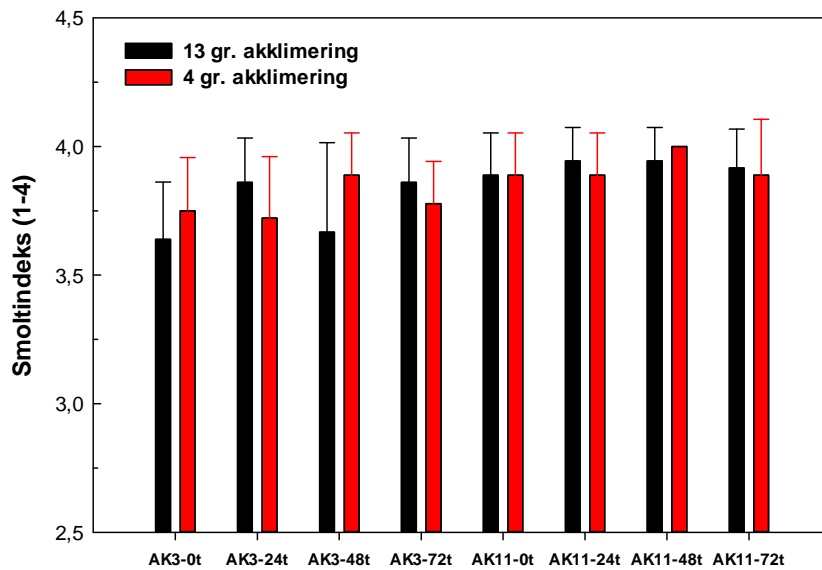
3.2.2 Kondisjonsfaktor

Figur 23 viser gjennomsnittlig kondisjonsfaktor. Den gjennomsnittlige kondisjonsfaktoren varierte henholdsvis fra $1,06 \pm 0,05$ til $1,17 \pm 0,10$ for gruppen $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ og fra $1,00 \pm 0,30$ til $1,16 \pm 0,39$ for gruppen $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Høyest og laveste målte K-faktor var henholdsvis 1,37 og 0,96 ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og 2,25 og 0,70 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$).



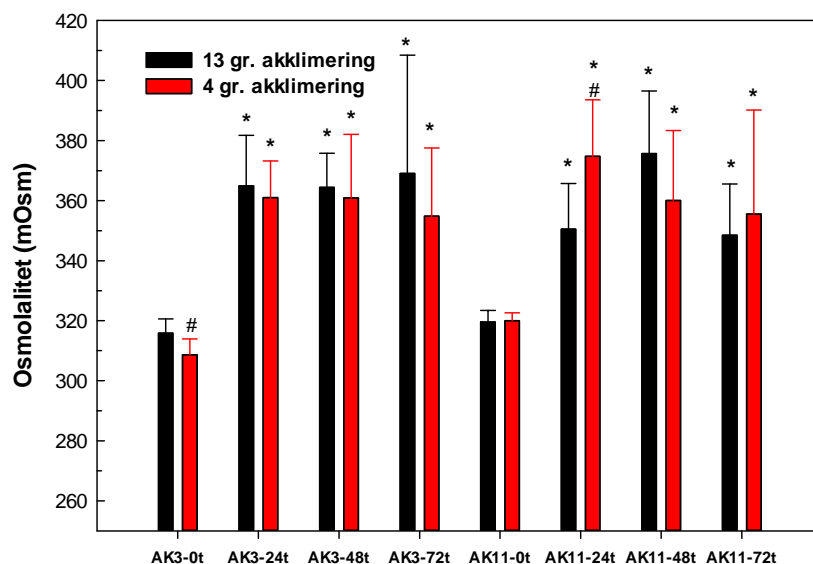
Figur 23. Gjennomsnittlig K-faktor (KF) (\pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt, (n=12).

3.2.3 Smoltindeks



Figur 24. Gjennomsnittlig smoltindeks (\pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt (n=12).

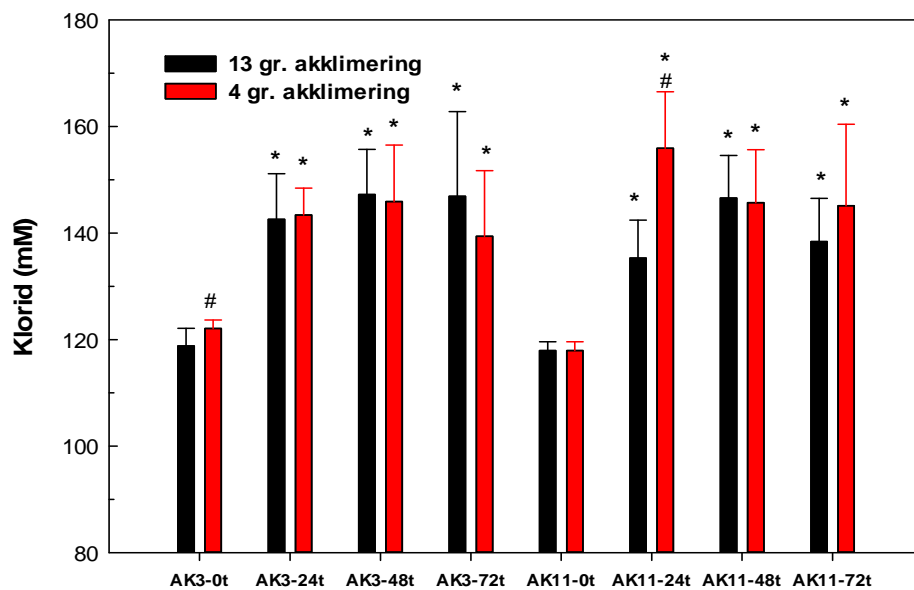
Figur 24 viser gjennomsnittlig smoltindeks. Den gjennomsnittlige smoltindeksen varierte fra $3,6 \pm 0,2$ til $3,9 \pm 0,1$ for gruppen $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ og fra $3,8 \pm 0,2$ til $4,0 \pm 0,0$ for gruppen $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Høyest og laveste målte smoltindeks var 4,0 og 3,3 ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og 4,0 og 3,3 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Figur 25. Gjennomsnittlig plasmaosmolalitet (mOsm \pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt (n=12).

Figur 25 viser plasmaosmolalitet. Den gjennomsnittlige målte osmolaliteten varierte fra henholdsvis $315,8 \pm 4,8$ til $375,7 \pm 20,8$ mOsm ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$) og fra $308,7 \pm 5,2$ til $374,7 \pm 18,8$ mOsm ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Høyest og laveste målte plasmaosmolalitet verdi var henholdsvis 443 og 309 mOsm ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og 458 og 315 mOsm ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Gruppene $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ var signifikant høyere enn 0t (ferskvann) ved alle uttakene i sjøvann, både etter 3 og 11 dagers akklimering. Gruppen $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ var signifikant lavere enn $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ dag ved AK3-0t (ferskvann $P=0,003$), og signifikant høyere ved AK11-24t ($p=0,002$).

3.2.4 Plasmaklorid

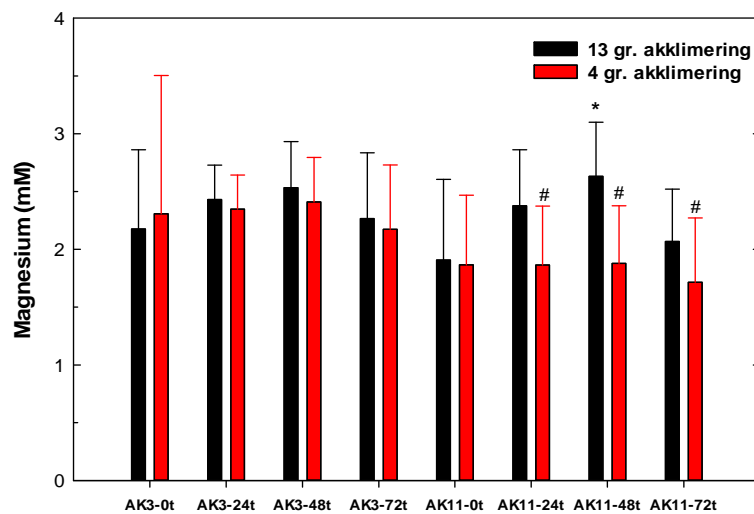


Figur 26. Gjennomsnittlig plasmaklorid ($\text{mM} \pm \text{SD}$) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioden (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt ($n=12$).

Figur 26 viser plasmaklorid. Den gjennomsnittlige plasmakloriden varierte fra henholdsvis $117,9 \pm 1,7$ til $147,3 \pm 8,0$ mM ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$) og fra $117,9 \pm 1,6$ til $155,9 \pm 10,6$ mM ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Høyest og laveste målte enkeltverdi av plasmaklorid var henholdsvis 181 og 115 mM ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og 185 og 115 mM ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Begge gruppene $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ var signifikant høyere enn 0t (ferskvann) ved alle uttakene i sjøvann, både etter 3 og 11 dagers akklimering. Tilsvarende var gruppe $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ signifikant høyere enn $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ AK3-0t ($P=0,005$) og AK11-24t ($p=0,001$).

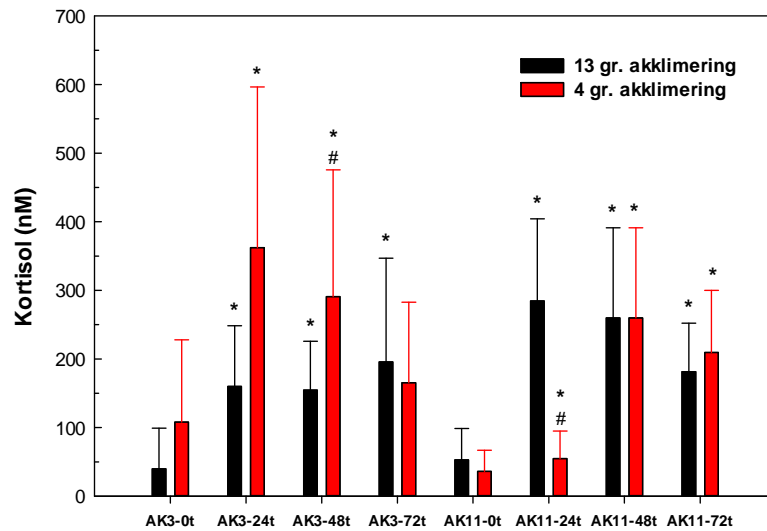
3.2.5 Plasmamagnesium

Figur 27 viser plasmamagnesium. Den gjennomsnittlige målte plasmamagnesiumen varierte fra henholdsvis $1,91 \pm 0,70$ til $2,63 \pm 0,47$ mM ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$) og fra $1,72 \pm 0,56$ til $2,41 \pm 0,38$ mM ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Høyest og laveste målte enkeltverdi av plasmamagnesium var henholdsvis $3,29$ og $1,14$ mM ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og $3,46$ og $0,92$ mM ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Gruppen $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ var signifikant høyere i sjøvann ved AK11-48 enn i ferskvann AK11-0t. Tilsvarende var gruppen $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ signifikant lavere enn $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ etter 11 dagers aklimering ved 24t ($p=0,019$), 48t ($p=0,01$) og 72t ($p=0,040$).



Figur 27. Gjennomsnittlig plasmamagnesium (mM \pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), mens # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt ($n=12$).

3.2.6 Plasmakortisol



Figur 28. Gjennomsnittlig plasmakortisol (nM \pm SD) for laksesmolt målt ved ulike akklimeringsperioder (3 dager = AK3 og 11 dager = AK11) i ferskvann (0t) og etter sjøvannstest (24,48 og 72 t). * indikerer signifikant forskjell fra start kontroll (17.03.11), mens # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakingstidspunkt (n=12).

Figur 28 viser plasmakortisol. Den gjennomsnittlige målte plasmakortisol varierte fra henholdsvis $39,9 \pm 59,2$ til $284,5 \pm 120,1$ nM ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$) og fra $36,0 \pm 31,0$ til $362,3 \pm 234,5$ nM ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Høyest og laveste målte enkeltverdi av plasmakortisol var henholdsvis $509,6$ og $7,4$ nM ($13\text{ }^{\circ}\text{C}$), og $686,7$ og $5,4$ nM ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Etter tre dagers akklimering gruppen $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ signifikant høyere i sjøvann enn i ferskvann, mens $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ var signifikant høyere ved 24t og 48t enn ved 0t. Begge gruppene $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ var gruppene signifikant høyere i sjøvann enn i ferskvann (0t) etter 11 dagers akklimering. Tilsvarende var gruppe $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ signifikant høyere enn $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ ved AK3-48t ($p=0,019$) og signifikant lavere ved AK11-24t ($p=0,001$).

13. DISKUSJON

4.1. SMOLTIFISERING

Som tidligere nevnt er smoltifiseringsprosessen en pre-adapting i ferskvann, til et liv i sjøvann. Generelt øker sjøvannstoleranse med størrelse, både på grunn av redusert forhold mellom overflate og volum, og en størrelsesavhengig utvikling av osmoreguleringen (Staurnes, 1992). Den smoltifiserende parren gjennomgår strukturelle og funksjonelle endringer i de organene som er involvert i osmoreguleringen, som gjeller, nyrer, tarm og urinblære. De organene som inngår i osmoreguleringen må være i stand til å gå fra aktivt opptak av ioner i et hypoosmotisk miljø, til aktivt å skille ut ioner og ta opp vann i et hyperosmotisk miljø (**Figur 2 og Figur 3**). I gjellene ser man en økning i antallet MRC (kloridceller) som også blir strukturelt mer rik på membranstrukturer, og støtceller (AC) som i såkalte lekkende forbindelser («leaky junctions») er med på utskillelsen av ioner. I disse cellene øker også den totale mengden av det osmoregulatorisk aktive enzymet Na^+ , K^+ -ATPase (NKA), som trolig styres av økning i GH, IGF-1 og kortisol (Evans, 2006; Handeland *et al*, 2004; Iversen & Eliassen, 2010; Iversen & Eliassen, 2011; McCormick *et al*, 2009; Staurnes *et al*, 1992; Tipsmark & Madsen, 2009). Det er også et skifte i de to NKA -isoformene α -1a og α -1b, hvor førstnevnte er knyttet til ferskvann og opptak av ioner, mens den andre er knyttet til sjøvann og aktiv sekresjon. Gjelleepitelets permeabilitet for ioner øker i løpet av smoltifiseringen, slik at tapet av ioner i ferskvann akselererer, og aktive prosesser må opprettholdes å kompensere for dette tapet (**Figur 4 og Figur 5**). Funksjonene til nyrene under pre-adaptingen til smolt er lite dokumentert, men i fordøyelseskanal observeres det osmoregulatoriske prosesser som ligner pre-adaptingen i gjellene (Evans, 2006; McCormick *et al*, 2009).

4.2. SMOLTIFISERING I INDUSTRIELT OPPDRETT

Produksjonen av matfisk av laks har i Norge vært begrenset av ulike typer reguleringer, basert på et begrenset antall lisenser, utnyttbart produksjonsvolum, kvoter på fôr, og til dagens ordning med maksimal tillatt biomasse (MTB). Pr i dag avgrenses en standard tillatelse til akvakultur av matfisk i sjøvann til en biomasse på inntil 780 tonn. Flere tillatelser kan samdrives innen samme lokalitet, begrenset av lokalitetens økologiske bæreevne (FKD, FOR-2004-12-22-1798 ; FOR 2008-06-17). Store deler av produksjonen i Norge foregår i større selskap, som ofte har flere tillatelser som samdrives på samme lokalitet. Den stående biomassen i sjø kan aldri overstige den samlede maksimale tillatte biomassen, ut fra det aktuelle antall tillatelser. For hvert enkelt selskap er begrensningen i tillatt biomasse den faktor som begrenser omsetning, og dermed økonomisk utbytte i forhold til investert kapital (Asche, 2009). Ønske om maksimal utnyttning av tillatt biomasse vil

medføre ønske om slakting av fisk gjennom hele året, noe som også fordrer smoltutsett større deler av året, enn hva naturlig livssyklus gir. Dette vil kunne medføre utsett av laksesmolt på tidspunkt hvor blant annet lave vanntemperatur i sjøen kan gå på bekostning av dyrevelferd og god smoltkvalitet (Asche, 2009; Stefansson *et al*, 2005)

I dette perspektivet vil forsøk 1 representere tradisjonell vårsmolt, hvor fisken settes ut på svakt stigende sjøvannstemperaturer, mens forsøk 2 representere tidlig vårsmolt produsert ved høy ferskvannstemperatur, og satt ut ved relativt lav sjøvannstemperatur.

4.3. FORSØK 1 OG 2.

Ut fra de kompliserte fysiologiske prosessene, og variasjonen i fiskegruppene som skal være sjøvannsdyktige, er det et behov for å fastslå og dokumentere smoltstatus på fisken før utsett til sjø. Videre står det i akvakulturdriftsforordningen §22, "*Før anadrom fisk settes ut i sjøvann, skal det gjennomføres egnede tester som viser at fisken er tilstrekkelig smoltifisert*". I samme paragraf står det også at testene som brukes ikke skal påføre fisken vesentlige påkjenninger, og ikke omfatte bruk av sjøvann på over 35 % (FKD, FOR 2008-06-17). Da smoltifiseringen er en sammensatt prosess med flere parallelle endringer som må synkroniseres, vil det være gunstig å dokumentere flere sider av fiskens fysiologi, slik at man kan fange opp endringer i adferd, morfologi og fysiologi.

4.3.1 Vekst

Som **figur 9** viser, var vekten med ett unntak jevnt stigende for fisken som gjennom forsøksperioden i forsøk 1. Kun ved uttaket 17. juni var det signifikante forskjeller i vekt på de tre gruppene FV etter transport (FV), 72 t SV-test Normal (STN) og 72 t SV-test Stress (STS), og ved dette uttaket var FV signifikant større enn STN, som igjen var signifikant større enn STS. Denne forskjellen i vekt mellom stresset og ustresset gruppe må anses som å være tilfeldig, da forskjellen i vekt mellom STN og STS ble ikke funnet igjen i noen av de andre parameterne, selv om man skulle kunne forvente dette ut fra at toleransen til sjøvann øker med størrelse, da forholdet mellom volum og overflate reduseres (Evans, 2006; Staurnes *et al*, 1992).

Slår man sammen de tre forsøksgruppene finner man at man ved første uttak 19. mars hadde en samlet gjennomsnittlig vekt på 38,8 g, mens man ved siste uttak hadde en samlet gjennomsnittlig vekt på 55,5 g, og til sammenligning ble det fra settefiskanlegget beregnet at fisken fra det aktuelle karet ved levering rett etter siste prøveuttak, hadde en gjennomsnittlig vekt på 54,8 g. Gjennomsnittsvekten på forsøksfisken kan ut fra dette sies å være representativ for fiskegruppen i karet.

I forsøk 2 var vekten etter 11 dagers akklimering høyere i gruppen som hadde vært akklimert på 13 °C enn gruppen som var akklimert på 4 °C (**Figur 22**). Forskjellen var signifikant ved 24 og 48t

sjøvannstest. Fra fôrleverandør oppgis forskjellen i tilvekst ved 4° og 13° til å være om lag 1 % daglig tilvekst (Biomar, 2012), noe som skulle gi en vektforskjell på om lag 10 gram etter 11 dager. Den observerte vektforskjellen i forsøket mellom 13 og 4 °C gruppene var på ca. 23 g. Medvirkende årsak til dette større avviket kan være at fisken som ble overflyttet fra 13° til 4° fikk redusert appetitt som følge av forhøyede kortisol nivå relatert til temperaturnedgang. (Donaldson *et al*, 2008). Tidligere forsøk på gullfisk (*Carassius auratus*), som ble føret i 21 dager med dietter som inneholdt enten 0 (kontroll), 50 (Lav) eller 500 (Høy) kortisol/g i foret, viste at kortisol i fôr påvirket vekstrate negativt, og differensierte mellom ulike konsentrasjoner kortisol (Bernier *et al*, 2004). Lignende effekter av kortisol på appetitt og vekst har også blitt dokumentert i arter som regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), havabbor (*Sparus auratus*), «Channel catfish» (*Ictalurus punctatus*), torsk (*Gadus morhua*) og Atlantisk laks (*Salmo salar*) (Bernier, 2006; Bernier & Peter, 2001; Bernier *et al*, 2004; Bjornsson *et al*, 2002; Mommsen *et al*, 1999; Olsen *et al*, 2008; Pankhurst *et al*, 2008; Small, 2004; Sorensen *et al*, 2011; Tsigos & Chrousos, 2002; Weil *et al*, 2001).

I henhold til Sørensen *et al*. (2011) er det minst tre sannsynlige forklaringer på hvordan kortisol undertrykker vekst. **1).** Kortisolbehandlinger (injeksjoner eller implantater) har vist å forårsake en økning i basal metabolsk rate (målt som oksygenopptak) i fisk, som kan føre til reduksjon av mengden av energi som kan benyttes til vekst (Morgan & Iwama, 1996). **2).** Kortisol kan direkte redusere cellevekst, da DNA uttrykket i cellekulturer fra fisk har vist å bli redusert etter kortisol behandling, og denne effekten er sannsynligvis mediert gjennom binding til glukokortikoide reseptorer (GR) (Lee & Bols, 1989; Pagniello *et al*, 2002). **3).** Barton *et al*. (1987) antydte at kortisol oralbehandling kan undertrykke veksten ved å forandre tarm-morfologien, som medfører redusert næringsopptak, og dermed begrenser energien som er tilgjengelig for vekst. I tillegg til disse mulige forklaringene kan plasmakortisol ha en mer direkte effekt på vekst, da en økning i kortisol under belastning har vist seg å redusere veksthormon og insulin-lignende vekstfaktorer (IGF) produsert av leveren, noe som igjen påvirker både matinntak og vekst (Salas-Leiton *et al*, 2012).

4.3.2 Kondisjonsfaktor (KF) og smoltindeks

Morfologisk endrer parren seg fra å være grønn(-brun)-farget med mørkere felt (parr-/fingermerker) til å bli sølvblank med finner som mørkner fra ytterkant. Disse endringene kan oppsummeres som smoltindeks. Ut fra kriteriene for smoltindeks er det mulig å gjøre subjektive vurderinger av morfologi, som allikevel vil gi sammenlignbare resultat mellom grupper. Det er svært viktig i størst mulig grad å standardisere faktorer som tid fra avliving og lysforhold ved vurdering. Smoltindeks rapporteres ofte sammen med såkalt sjøvannstest og data på gjelle NKA aktivitet. I naturen observeres også ofte en nedgang i kondisjonsfaktor i løpet av smoltifiseringen, og denne vil være

enkel å registrere, og objektiv, da den bygger på måling av vekt og lengde (Folmar & Dickhoff, 1980; Havbruksinstituttet, 2003; Hoar, 1976; Staurnes *et al*, 1992; Stefansson *et al*, 2005; Toften, 2011; Willoughby, 1999).

Kondisjonsfaktoren i forsøk 1 (**Figur 12**) var signifikant høyere for alle tre grupper fra og med uttak 6. mai, og til og med 17. juni. Alle gruppene har høyest kondisjonsfaktor 14. mai, som går noe ned utover perioden. Nedgangen fra 14.mai til 1.juli er henholdsvis 0,103 (FV), 0,064 (STN) og 0,091 (STS), som er noe mindre enn det Handeland *et al.* (2004) observerte, hvor man hadde en signifikant nedgang på ca. 0,25 i forsøksperioden. Ved alle uttak, unntatt siste uttak, var kondisjonsfaktoren noe høyere i fisk i FV, enn fisk som har stått 72 t i sjøvannstest. Forskjellen er kun delvis signifikant, men antyder at fisken har et vekttap som følge av passivt vanntap i overgangen fra hypoosmotisk til hyperosmotisk osmoregulering (Evans, 2006; McCormick *et al*, 1998; Staurnes *et al*, 1992; Willoughby, 1999). Handeland *et al.* (2000) viste at vanninnhold i muskel etter utsett i sjø viste en temperatur-avhengig respons med en nedgang i perioden mellom 9 til 18 døgngreder (dgr), men at det etter 70 til 80 dgr normaliserte seg til nivå som i ferskvann

Smoltindeks (**Figur 14**) utviklet seg gradvis fra om lag 1,6 ved oppstart 19. mars til om lag 4 ved slutten av perioden. I hovedsak er smoltindeks på fisk i ferskvann noe høyere enn på fisk i sjøvann, men dette er ikke signifikant. Da det ikke noen signifikante forskjeller mellom ferskvann og sjøvann, kan man beskrive en utvikling i smoltindeks også på fisk som har stått i sjøvannstest.

Størst er økning i smoltindeks (FV) mellom 14. mai og 3. juni, fra henholdsvis 2,6 til 3,4. I denne perioden har man også høyest temperaturøkning (**Figur 8**), og ser man på utvikling av sjøvannstoleranse i form av osmolalitet (**Figur 15**) og plasmaklorid (**Figur 16**) har uttaket 3. juni de laveste verdiene etter 72 t i sjø. Smoltindeks er et beregnet gjennomsnitt av grad av sølvfarging, avtakende parrmerker og økt grad av sorte finnekanter, og man kan si at verdier over 3,0 vil representere en fisk som er nesten fullt-, morfologisk utviklet smolt. Da har fisken synlig sølvfarge eller svakt synlige eller fraværende parrmerker, og synlig og markert sorte finnekanter (Finstad & Iversen, 1995; Folmar & Dickhoff, 1980; Hoar, 1976)

Kondisjonsfaktor og smoltindeks i forsøk 2 viste ingen forskjeller mellom de to akklimeringstemperaturene, og nivåene er i samsvar med tidligere funn og indikerer god morfologisk utviklet smolt (Handeland *et al*, 2004; Staurnes *et al*, 1992; Strand *et al*, 2007).

4.3.3 Adferd

Fiskegruppen som ble benyttet i forsøk 1, ble holdt i et kar med 14 m diameter og om lag 3 m dybde ved settefiskanlegget. Det ble ved uttak av fisk fra dette karet forsøkt å håve opp fisk fra et punkt midt i radien av karet, i hele dybden, og man fokuserte på å ta fra samme sted i karet ved hvert uttak. I praksis ble det i løpet av forsøksperioden stadig vanskeligere å få tak i fisk v.h.a. håv, fisken

forandret gradvis svømmemønster og aktiviteten i karet økte (personlig observasjon, Roald Jakobsen). Dette kan skyldes at lakseparr ved stigende temperatur og økende grad av smoltifisering blir mer aktiv, og forlater motstrøms- svømmeretning for et mer spredt, medstrøms mønster (Evans, 2006; Hoar, 1976; Lekang, 2007; Staurnes *et al.*, 1992). Martin *et al.* (2012) som observerte adferd i kar med smoltifiserende laks, og fant at fisken svømte motstrøms i vintermånedene januar og februar, mens at det i løpet av mars og april utviklet seg til medstrøms svømmeretning. Dette sammenfalt også med maksimal sølvfarging og NKA gen uttrykket. Samtidig så man også en sammenheng mellom temperatur og svømmeaktivitet, med maksimal aktivitet rundt 10,5 °C, og kraftig redusert aktivitet under 4 °C og over 17 °C. Omgivelsestemperaturens innvirkning på adferd under smoltifisering ble også kartlagt av Zydlewski *et al.* (2005), hvor man fant at kumulativ temperatur, døgngader, var bedre egnet til å forutse smoltrelaterte adferdsendringer, enn faktiske sprang eller terskler i temperatur. Temperaturen regulerte antall dager fram mot smoltadferd, mens antall døgngader var relativt likt mellom de tre ulike temperaturregimer. Endringene i adferd gjennom smoltifiseringen er sjeldent dokumentert, og rapportert i kommersielle produksjoner (Hoar, 1976; Staurnes *et al.*, 1992; Stefansson *et al.*, 2005).

Fiskegruppen som inngikk i forsøk 2 ble holdt i små kar (1m diameter og 0,45 m³). I disse karene ble det i forkant av forsøket ikke observert noen tydelig endring i adferd i forsøksperioden (personlig observasjon, Roald Jakobsen).

4.3.4 Osmoregulering

Ulike tester for sjøvannstoleranse forsøker å beskrive fiskens evne til osmoregulering gjennom en belastningstest i sjøvann. Dette gjennomføres ved å overføre fisk til rent sjøvann, for så ta ut blodprøver etter 24 til 96 timers eksponering. Man analyserer deretter på ioner i plasma, mest brukt er plasma Cl⁻, da dette er en enkel analysemetode (Staurnes *et al.*, 1992; Staurnes *et al.*, 2001; Stefansson, 2005). Ofte er 24 timers eksponering brukt (McCormick & Saunders, 1987), men som vist i Handeland *et al.* (2000) vil nivåene av plasma ioner være på sitt høyeste etter 6-18 dgr, slik at man ved lave temperaturer vil dokumentere optimal osmoregulatorisk evne etter 3 til 4 dager. Ved å benytte 72 eller 96 timers toleransetest reduseres muligheten for falske positive resultater betraktelig. Ugunstige forhold, som svært kraftig stressbelastning, under testen vil kunne resultere i falskt negative resultat (Iversen *et al.*, 1998). Både i forsøk 1 og 2 var temperaturen i sjøvann relativt stabil, på henholdsvis 5,2 ± 0,8°C og 4,0 ± 0,4°C.

Plasmaosmolalitet etter 72 timer i sjøvann i forsøk 1 er lavest ved uttak 3. juni for både STN og STS med henholdsvis 343 ± 6,1 og 356,6 ± 22,8 mOsm. Også nivået i FV er lavest 3. juni med 314 ± 9,9 mOsm, og STN og STS er 9 og 13 % høyere enn FV. Ser man på gjennomsnittlig plasmaosmolalitet

i FV for hele perioden er denne på $321,7 \pm 12,9$ mOsm, og i forhold til dette gjennomsnittet er sjøvannsverdiene 3. juni kun 6 og 10 % høyere. Begge gruppene (i SV) øker noe ved de to siste prøveuttakene. Generelt vil teleoster forsøke å holde en osmolalitet på mellom 290-340 mOsm uavhengig av salinitet i miljøet rundt, og større avvik fra dette over lengre perioder vil forårsake dødelighet (McCormick & Saunders, 1987). Arnesen *et al.* (1998) rapporterte at typisk osmolalitet i ferskvann lå rundt 320 mOsm, mens osmolaliteten varierte fra 325 til 345 mOsm i sjøvann hos smoltifiserende laks. Nivåene ved uttak 3. juni, 17. juni og 1. juli er henholdsvis 1, 6 og 5 % (STN) og 4, 6 og 13% (STS) over 340 mOsm, og trolig er dette uproblematisk for fisken.

I forsøk 2 var gjennomsnittlig osmolalitet for gruppen 13 gr. 366 og 359 mOsm ved henholdsvis 3 og 11 dagers akklimering, og tilsvarende osmolalitet for gruppen 4 gr. var 358 og 363 mOsm. Fisk i hypersalint miljø kan til en viss grad bruke intracellulære (organiske) osmolytter for å unngå at forhøyet plasmaosmolalitet skal skade celler eller redusere cellevolumet. Dette kan blant annet være karbohydrater og trimethylamine oksid, og slike organiske osmolytter omtales som kompatible da de ikke forstyrrer makromolekyler i celler i samme grad som uorganiske ioner (for eksempel Cl^-) (Fiess *et al.*, 2007). Noe som kan forklare den lave variasjonen på osmolaliteten i de ulike akklimeringsgruppene i forsøk 1

Arnesen *et al.* (1998) viste at andelen Cl^- av total-osmolalitet varierte, delvis ved høyere andel ved lave temperaturer. Man kan ut fra dette i noen tilfeller oppleve at det ikke er fullstendig samsvar mellom osmolalitet og ione-innholdet i plasma. Dette ble ikke observert i forsøk 1 hvor plasmaklorid og osmolalitet i sjøvann viste en korrelasjon både i STN ($sk=0,964$; $p=0,000000200$) og STS gruppen ($sk=0,929$; $p=0,000000200$).

Tidligere studier har vist at plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon synker i ferskvannstilpasset fisk og øker i sjøvannstilpasset fisk i respons til en stressor (Iversen *et al.* 1998) noe som ble observert i forsøk 1 hvor det var en korrelasjon mellom plasmakortisol og plasmakloridnivå ($sk=0,893$, $p=0,0000002$) i FV. Reduksjon av plasmaklorid ser ut til å være en del av den akutte stressresponsen, noe som er karakteristisk for fisk utsatt for en stressor i ferskvann (Liebert & Schreck, 2006; Redding & Schreck, 1983). I ferskvann ligger som oftest mengde plasmaklorid på mellom 111-135 mM, mens det i perioden før smoltifisering ofte ses en nedgang (Folmar & Dickhoff, 1980). I forsøk 1 er plasmaklorid etter 72 t i sjø signifikant høyere tilsvarende i ferskvann ved alle prøveuttak. Etter overgangen til sjø kan man forvente raske forbigående endringer i plasmaklorid (Folmar & Dickhoff, 1980). Handeland *et al.* (2000) viste en temperaturavhengig økning i plasmaklorid i de første 70 til 80 dgr etter utsett til sjø, før nivåene stabiliserer seg på nivå nærmere de opprinnelige ferskvannverdiene. I forsøk 1 er prøvene tatt ut etter 15-18 dgr, og representerer trolig derfor toppen av økning i plasmaklorid ved utsett. Plasmaklorid i sjø hos postsmolt rapporteres å variere fra $120,2 \pm 8,5$ til $135,5 \pm 4,9$ mM (Iversen & Eliassen, 2013), og fra

146 til 162 mM (Arnesen *et al*, 1998), mens Handeland *et al.* (2000) viste etter 18-20 dgr i sjø økte plasmaklorid opp mot hele 175 mM, og med unntak av prøvetak den 6. mai lå alle plasmaklorid verdiene innenfor disse rapporterte verdiene uavhengig av stressnivå etter 72 timer i sjøvann.

I forsøk 2 er det etter 3 dagers akklimering noe høyere nivå på plasmaklorid i gruppen 4 gr. enn gruppen 13 gr. mens at det etter 11 dagers akklimering ble det ikke observert noen forskjeller. Det er tidligere vist at det etter fysiske påkjenninger kan være større passiv lekkasje av ioner over gjelleepitelet ved høyere temperaturer enn ved lavere temperaturer (Kieffer & Tufts, 1996), delvis kan dette skyldes at større deler av gjellene blir utnyttet (arealmessig), samt at endringer i membranegenskaper skaper større passiv vandring av ioner mellom fisk og miljø (Crocket & Londraville, 2006), noe som ikke kunne påvises i forsøk 2 selv om fisken ble utsatt for en håndtering i forbindelse med flytting fra ferskvann til sjøvann ved høy og lav temperatur.

Plasmamagnesium i forsøk 1 (**Figur 17**) var det ingen systematiske forskjeller mellom STN og STS, og nivåene er i hovedsak synkende i gjennom prøvetakingsperioden. Verdiene for sjøvann er høyere enn for ferskvann ved de ulike uttakene. Som regel vil beinfisk holde magnesiumkonsentrasjonen under 2 mM, ofte også under 1 mM (Bijvelds *et al*, 1998; Iversen & Eliassen, 2009; Jakobsen & Iversen, 2012). Både i forsøk 1 og 2 (**Figur 17** og **Figur 27**) ligger plasmamagnesium verdien i overkant eller rundt 2mM. Tidligere har manglende evne til å regulere magnesium etter utsett i sjø har vært koblet til både stress (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen & Eliassen, 2013; Staurnes *et al*, 1994) og forhøyet dødelighet (Iversen & Eliassen, 2009), som kan gi noe av forklaringen av de til dels forhøyede magnesiumverdiene i forsøk 1, hvor det var en korrelasjon mellom plasmakortisol og magnesium i FV gruppen ($sk=-0,929$, $p=0,0000002$), og i STN gruppen ($sk=-0,821$, $p=0,0145$). Denne sammenhengen ble pussig nok ikke observert i «stress» gruppen STS ($sk=-0,679$, $p=0,0735$).

4.3.5 Gjelle ATPase

Som nevnt ovenfor er NKA aktivitet sentralt i osmoreguleringen, og i løpet av smoltifiseringen ser man ofte en økning i enzymaktivitet. Som indikator på smoltstatus kan økning i NKA aktivitet dermed være velegnet. Undersøkelser viser at det er vanskelig å sette absolutte grenseverdier for full sjøvannstoleranse, men ofte regnes nivå over 10 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$ som indikasjon på fullverdig smolt (Havbruksinstituttet, 2012; McCormick, 1993a; Stefansson *et al*, 2005). Bjerknes (2007) påpeker allikevel viktigheten av å ta ut flere uttak, slik at man kan dokumentere økningen i NKA i løpet av smoltifiseringen, da NKA absoluttnivåene kan variere på grunn av genetikk, temperatur, lys og produksjonsforhold i anlegget eller i elvene (McCormick, 1993b; Stefansson *et al*, 2005). Det er funnet stor variasjon i hvor mye aktiviteten øker, en økning fra tre til ti ganger i

enzymaktivitet er rapportert (Handeland & Stefansson, 2001; Handeland *et al*, 2003; Handeland *et al*, 2004; McCormick *et al*, 2000; McCormick *et al*, 1998; McCormick *et al*, 2002). NKA i ferskvann (**Figur 18**), i forsøk 1 viste en gradvis økning fram mot høyeste målte verdi 17. juni ($9,452 \pm 2,595 \mu\text{mol ADP/mg protein/time}$). Noe som tilsvarer en 3-4 gangers økning i NKA aktiviteten. Nivåene og utviklingen er innenfor det som tidligere er beskrevet (Handeland & Stefansson, 2001; 2002; Handeland *et al*, 2004; McCormick *et al*, 2000; McCormick *et al*, 1995), og selv om toppen av NKA aktiviteten er til dels senere enn beskrevet i andre arbeider, skyldes dette trolig at vanntemperaturen holdt seg under 4°C fram til midten av mai i MN-Hopen. Handeland *et al.*(2004) påviste at NKA aktiviteten var høyest 350 dgr etter at den smoltrelaterte økning i NKA hadde begynt. Regner man seg tilbake fra 17. juni i forsøk 1, da NKA aktiviteten var på sitt høyeste, og 350 dgr tilbake i tid kommer man til ca. 1. april, og den 15. april var NKA aktiviteten økt fra $0,64 \pm 0,52$ (19.mars) til $4,3 \pm 2,1 \mu\text{mol ADP/mg protein/time}$. Handeland *et al.*(2004) fant videre at høy enzym aktivitet (>90 % av maksimum) varte i om lag 250 dgr, mens at aktiviteten gikk ned til pre-smolt nivå etter om lag ytterlige 500 dgr. McCormick *et al* (1996) fant derimot at utviklingen av NKA aktiviteten ikke utelukkende er temperatur-påvirket, da man så at toppen av NKA aktivitet kom etter flere døgngrader ved høyere temperaturer enn ved lave temperaturer.

Etter overgang til sjøvann kan man forvente at NKA aktivitet øker (Handeland *et al*, 2000; Stefansson *et al*, 2012). I Handeland *et al.* (2000) viste man at temperatur i sjøvann har en klar effekt på NKA aktivitet, selv om dette ikke er direkte korrelert med plasmaklorid. Fra andre arter (karpe) er det vist at gjelle NKA aktiviteten har en Q_{10} på 1,6-2,4, noe som betyr at enzymaktiviteten er eksempelvis 1,6 ganger større ved en temperaturøkning på 10°C (Crocket & Londraville, 2006). Videre har flere arbeider vist at akutt fall i temperaturen påvirker osmoreguleringen negativt ved at aktivt regulering av ioner reduseres, og at det for ferskvannsfisk medfører at fisken taper ioner, samtidig som passiv osmotisk tap er noenlunde konstant (Donaldson *et al*, 2008). I forsøk 1 var det ingen forskjell mellom NKA aktivitet i ferskvann og sjøvann. Dette indikerer at man kan ta ut NKA etter 72 timer i sjø, og fremdeles få resultater som er sammenlignbare med resultater fra ferskvann, trolig under forutsetning av at temperatur er relativt lav. Dette er i kontrast til Zydlewski & Zydlewski (2012), som viste at NKA aktivitet endres etter overgang fra ferskvann til sjøvann, og allerede etter 3 dager i sjø så man signifikante endringer i forhold til NKA aktivitet i ferskvann.

Det er tidligere vist distinkte isoformer av NKA i ferskvann og i sjøvann (Madsen *et al*, 2009; McCormick *et al*, 2009; Nilsen *et al*, 2007). Ut fra dette kan man si det er mulig med falskt positive resultater, i form av høy NKA aktivitet i ferskvann som skyldes oppregulering av ferskvannsisoformen, og ikke smoltrelatert økning av sjøvannsisoformen. Zydlewski & Zydlewski (2012) viste også at det ikke var noen sammenheng mellom NKA i ferskvann og ytelsen i sjøvann, i form av vekt, tilvekst, osmoregulatorisk evne og NKA aktivitet i sjøvann. Som dokumentasjon på smoltifisering kan dermed

NKA aktivitet i ferskvann sies å være begrenset til å forutsi ytelse de første dagene i sjøvann, under den akutte fasen av akklimering til økt salinitet. Det er under arbeidet med denne oppgaven blitt lansert en ny kommersiell PCR- analyse for dokumentasjon av smoltifisering, basert på ferskvanns NKA gen uttrykket (Patogen, 2013).

4.3.6 Plasmakortisol

Frigivelsen av kortisol i blodet er en primær stressrespons hos fisk, og en av de store fysiologiske rollene til kortisol er reguleringen av hydromineral balanse og energiomsetningen i fisk. Derfor vil en hver endring i plasma osmolalitet, klorid, og magnesium kunne være trekk i en sekundær stressrespons (Veiseth *et al.* 2006). Plasmakortisol (**Figur 19**) i FV i forsøk 1 er positivt korrelert mot temperatur i ferskvann ($sk=0,865$, $p=0,00609$). Dette kan enten skyldes at man har en temperaturavhengig stressrespons på en relativ lik stressbelastning, eller at man ved høyere temperaturer har en raskere økning i plasmakortisol ved lavere temperatur, som i vist i Barton & Schreck (1987) på kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*). Forsøksoppsettet i forsøk 1 har ikke tilstrekkelig oppløsning til å fastslå dette.

Hvileverdier i kar 1403 (MN-Hopen) er relativt lave og jevne (Iversen & Eliassen, 2012). Det er ingen signifikant sammenheng mellom hvileverdier av kortisol og temperatur i ferskvann ($sk=0,419$, $p=0,213$), og man ser heller ingen systematisk utvikling i nivåene ved de ulike uttakene. Videre er kortisol i FV negativt korrelert mot klorid, magnesium og osmolalitet i FV. Dette så man også i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) hvor man etter større fysisk aktivitet fikk en større passiv transport av ioner over gjellene ved høyere temperatur (18°C) enn ved lavere temperatur (5°C) (Kieffer & Tufts, 1996). Dette kan ha flere årsaker, dels kan dette skyldes at en kraftig stressreaksjon generelt redusere kapasitet for aktiv osmoregulering, og dels kan det være at temperaturavhengige endringer i membranegenskapene øker passiv vandring over gjelleepitel. I tillegg vil man ved høyere temperaturer også måtte utnytte gjellene arealmessig i større grad enn ved lavere temperaturer, og dermed ha øke forutsetningen for passiv lekkasje (Barton, 2002; Crocket & Londraville, 2006; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen *et al.*, 2009; Iversen, 2012; Wendelaar Bonga, 1997).

Samtidig er det også kjent at basalnivå av kortisol er økende i slutfasen av smoltifiseringsprosessen, samt at smolt kan respondere kraftigere på akutt stress enn parr, og økningen i FV-kortisol kan muligens være forårsaket av dette (Carey & McCormick, 1998; Hoar, 1976; Staurnes *et al.*, 1992). Kortisol i FV er svakt korrelert med kortisol i både STN ($sk=0,607$; $p=0,121$) og STS ($sk=0,571$; $p=0,150$), men dog ikke signifikant. Det er ikke systematiske sammenhenger mellom kortisol i hverken STN eller STS, og osmoregulatoriske parametere (osmolalitet og plasmamagnesium) i sjøvann, men for plasmaklorid var det en sammenheng mellom kortisol og klorid i gruppen STS ($sk=0,786$; $p=0,0251$). Gruppen STS ble ved 24 og 48 timer utsatt for en stressor,

som var forventet til å skape en stressreaksjon sammenlignbar med tidligere arbeider, som kan karakteriseres som moderat, med en topp etter 1-2 timer i området 2-300 nM plasmakortisol. (Pers. medd. Senior forsker Martin H. Iversen). Tilsvarende resultater er blitt dokumentert hos regnbueørret, som ble utsatt for en enkelt sammtregningsstressor i sjøvann, hvor plasmanatrium (Na^+) og klorid (Cl^-) økte, mens plasmamagnesium (Mg^{2+}) og -kalium (K^+) forble uendret (Liebert & Schreck, 2006).

Da det ikke var systematiske forskjeller i kortisol etter 72 timer mellom gruppen STN og STS, kan man tolke dette som om at fisken i STS ved 72 timer var i stand til å regulere ned effekten av stressoren påført etter 24 og 48 timer, og stressresponsen er dermed av adaptiv natur. Samtidig ser man at begge gruppene er kraftig forhøyet i forhold til normale hvileverdier (Iversen & Eliassen, 2012). Dette kan skyldes en akkumulativ stressrespons forårsaket av transport (FV), og stress knyttet osmoregulatoriske utfordringer (Barton, 2002; Iversen & Eliassen, 2012; Wendelaar Bonga, 1997). Den største belastningen synes å være selve transporten, da den generelt ligger høyere enn STN og STS gruppen. Tidligere undersøkelser har vist at de mest kritiske fasene under brønnbåttransport var under lasting og lossing av brønnbåten, mens transporten i seg selv kun var en moderat stressor (Farrell *et al*, 2010; Finstad *et al*, 2003; Gatica *et al*, 2010; Iversen, 2009; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen *et al*, 1998; Iversen *et al*, 2004; Iversen *et al*, 2009; Iversen *et al*, 2005; Sandodden *et al*, 2001). Etterfølges lasting/lossing av en lengre transport uten tilstrekkelig tid for fisken å komme seg mellom hver stressbelastning, vil dette kunne medføre en kumulativ stressrespons med lang "rekonvalesens" tid. En kumulativ stressrespons uten en lang nok hvile kan medføre at fiskens allmenn tilstand blir sterkt redusert med dårlig vekst, sykdomsmotstand, sjøvannstoleranse og dødelighet (Farrell *et al*, 2010; Finstad *et al*, 2003; Gatica *et al*, 2010; Iversen, 2009; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen *et al*, 1998; Iversen *et al*, 2004; Iversen *et al*, 2009; Iversen *et al*, 2005; Maule *et al*, 1988; Sandodden *et al*, 2001; Schreck *et al*, 1989).

De forhøyede plasmakortisol en finner i alle gruppene både i forsøk 1 og 2 kan være medvirkende årsak til de høye plasmamagnesium (≥ 2 nM) verdiene en måler ved de fleste måle tidspunktene. Selv om rapporter om virkningene av stress på magnesium i fisk er begrenset, viste Staurnes *et al*. (1994) en betydelig høyere plasmamagnesium konsentrasjon i torsk (*Gadus morhua*), sammenlignet med ikke-stresset fisk, under simulerte transporter med høy og lav tetthet. Tilsvarende viste man at Sølvlaks (*Oncorhynchus kisutch*) hadde betydelig høyere plasmamagnesium nivåer under stress i sjøvann sammenlignet med kontrollgruppene fisk (Redding & Schreck, 1983), og plasma plasmamagnesium økte raskt i Havabbor (*Sparus aurata*) stresset med luft eksponering (Arends *et al*, 1999). Selv om økte katekolamine konsentrasjoner kan ha en gunstig effekt ved å stimulere oksygenopptak via gjeller, kan de også gi økt permeabilitet i epitelet til vann og ioner under stress (Arends *et al*, 1999). Konsentrasjonen av magnesium i sjøvann er ca. 50 til 100 ganger større

enn fiskeplasma. Dermed kan relativt små økninger i gjellepermeabiliteten under stress i sjøvann være ansvarlig for en stor tilstrømning av magnesium (Redding & Schreck, 1983).

I forsøk 2 er plasmakortisol i sjøvann signifikant forskjellig fra kortisol i ferskvann for begge gruppene, men det synes ikke å være noen systematiske forskjeller mellom gruppene. Etter tre dagers akklimering i ferskvann er nivået i gruppen akklimert på 4°C forhøyet i forhold til gruppen 13°C, med henholdsvis gjennomsnitt på $107,9 \pm 119,9$ nM (4°C) og $39,9 \pm 51,2$ nM (11°C). Dette kan forklares både ved at kombinasjonen av flytting og brå reduksjon i temperatur (9°C reduksjon) gir en kraftigere, eller akkumulert stressreaksjon (Donaldson *et al*, 2008; Finstad *et al*, 2003; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen & Eliassen, 2012; Iversen *et al*, 2009), og som Barton & Schreck (1987) viste på kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*), at fisk ved lavere temperaturer returnerte til hvilenivå senere enn ved høyere temperaturer. Etter 11 dagers akklimering er begge gruppene i ferskvann innfor det man kan kalle normale hvilenivå, gruppen 4°C med $36,0 \pm 30,9$ nM og gruppen 13°C med $52,9 \pm 45,9$ nM (Iversen & Eliassen, 2012). I den første testen, etter tre dagers akklimering, er gruppen 4°C mer følsom for stress da kortisolnivåene er forhøyet, mens man observerer det motsatt, etter 11 dagers akklimering. Det er nå ingen forskjell mellom plasmakortisol akklimert ved lav og høy temperatur, og en mulig forklaring er at akklimering til lavere temperaturer er blitt oppnådd. I forsøk 2 blir fisken håvet rett fra akklimeringskar (4°C og 13°C) og over til sjøvann (4°C), og prøvene fra ferskvann (0 timer) er således av uforstyrret fisk. Man ser dermed ikke noen sammenheng mellom kortisol og temperatur som i forsøk 1.

4.3.7 Dødelighet

Som **Tabell 1** viser har man hatt en jevn økning i produksjonen av smolt. I tabellen er det regnet effektivitet pr utsatt smolt, og siden 1995 er en betydelig økning i antall kg produsert pr smolt. Både i settefiskfase og i matfiskfase er en del tap i produksjonen. I perioden 1994 til 2011 er det gjennomsnittlige tapet på 17% ($\pm 3,2$) etter utsett i sjø (Fiskeridirektoratet, 2012). I settefiskfasen er over halvparten av tapet klassifisert som destruksjon, det vil si avliving av fisk. Årsakene til destruksjon er ikke oppgitt. Utover dette er tapene i hovedsak klassifisert som dødfisk. I matfiskfasen er tapene i stor grad klassifisert som dødfisk. Årsaker til denne type tap er ikke kjent for hele datagrunnlaget, men en undersøkelse Mattilsynet har gjort i Trøndelag og Møre og Romsdal på fisk satt ut i sjø i 2009 kan gi en indikasjon. For denne regionen var det satt ut 65,6 millioner smolt og slaktet 55,1 millioner, noe som gir et svinn på 16,1%. Av dette svinnet var 38% knyttet til den første fasen etter smoltutsett med dødelighet relatert til Infeksiøs Pankreas Nekrose (IPN), såkalt tapersyndrom, og dårlig smoltifisering. 37% av svinnet ble knyttet til håndtering på sjølokalitet, uspesifikke uhell, sår og predatorer, og 23,5% av svinnet var knyttet til smittsomme sykdommer som

Hjerte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), Kardiomyopatisyndrom (CMS), Pankreassykdom (PD). Rapporten peker på at fokus for fiskehelsearbeid i stor grad har vært fokusert på arbeid med smittsomme sykdommer, mens mindre fokus har vært på andre forhold, og viser også at andre forhold enn smittsomme sykdommer står for tre fjerdedeler av svinnet i sjøfasen (Fiskeridirektoratet, 2012; Mattilsynet, 2011). Burnley *et al.* (2012) viste til mulige årsaker til dødelighet på laks i sjøfase, i forbindelse med prøvetaking. I forbindelse med prøvetakingen, hvor fisken ble holdt i avkastnot, håvet, bedøvd og målt, fant man at holdetid i avkastnot (tid sammentrengt), økende størrelse (økt dødelighet i år 2 i sjø kontra år 1 i sjø), og ulike deformiteter var faktorer som økte risikoen for dødelighet. Innen prøvegrupper var fisk med relativ lav vekt også utsatte. Noen forsøk har forsøkt å knytte stress direkte til dødelighet, og i de fleste tilfeller det har blitt gjort, har det vært utført i forbindelse med økologiske studier (Anderson 2000; Davis 2010). Tolkning av ulike stressreaksjoner som tegn på stress knyttet til dødelighet er komplisert da faktorer som akklimatiseringen, størrelse, art og individuell fysisk tilstand som ikke er relatert til helsestatus, kan påvirke resultatet (Barton, 2002). Dødeligheten kan oppstå fra timer til uker etter eksponering for stressfaktorer (Davis, 2010; Davis *et al.*, 2001). Dette skyldes sannsynligvis konseptet med stress som hvor de primære responsene resulterer i hurtige og lett detekterbare økninger i katekolaminer og kortisol, og den sekundære responsen blir et fysiologisk speil av disse hormonene. Den tertiære responsen omfatter igjen de fysiologiske og adferdsmessige forandringer som opptrer individnivået, som kan være både adaptiv, samt patologiske avhengig av styrken og varigheten på stressoren(e). Bare starten på de primære, sekundære og tertiære responser er sekvensielle i tid fordi varigheten av hver respons skaper en tidsmessig overlapping når stressresponsen er i igangsatt (Wendelaar Bonga 2011).

Som vist i Iversen & Eliassen (2005) og Iversen & Eliassen (2012) er overgangen og transporten fra settefiskanlegg til matfiskanlegg en kritisk fase. Iversen og Eliassen (2012) viste at det var en signifikant korrelasjon mellom høye hvilenivå av plasmakortisol i vanlig smoltproduksjon og dødelighet etter overføring til sjø. Hvis hvilenivåene på plasmakortisol ble holdt over 50 nM (18,1 ng/mL) i løpet av smoltproduksjon, økte den relative risikoen for å få en dødelighet over 5 % etter 90 dager i sjøen til 3,1 ganger ($p = 0,001$), og risikoen for en sykdomsdiagnose økte til 4,9 ganger ($p = 0,001$). Stressreducerende tiltak i settefiskanleggene, for eksempel forbedret vannkvalitet, predator kontroll og redusert produksjonstetthet, reduserte både gjennomsnittlige plasmakortisolnivå under drift, og dødelighet etter utsett. (Iversen og Eliassen 2012). I forsøk 1 (**Figur 19**, **Figur 20** og **Figur 21**) er det en sammenheng mellom kortisol og dødelighet etter 72 timer i sjøvannstest. Dette kan tyde på at kombinasjonen av en ikke fullt utviklet smolt (sub-optimal smolt) og transport stress kan gi økt dødelighet etter utsett på grunn av en kumulativ stressrespons som fisken ikke håndterer (maladaptiv). Disse resultatene kan være med å gi en forklaring til noe av de forhøyde dødelighetstallene en ser i den Norske oppdrettsnæringa etter utsett i sjø.

4.3.8 Effekten av industriell skala på smoltifiseringen

I store kar vil det ofte være en varierende størrelse på fisken, og ofte kan det være en systematisk plassering av fisk med hensyn til størrelse og grad av smoltifisering. Fisk som står høyt, ytterst ved karkanten, er som regel større og morfologisk sett lengre kommet med smoltifisering, enn fisk som står i senter av kar (personlig observasjon, Roald Jakobsen). Dette kan skyldes at vannhastighet er størst ytterst i radien, ved karkanten, og går ned inn mot senter, og at smoltifiserende laks søker til høyere strømhastighet som del av smoltrelatert adferdsendringen (Martin *et al*, 2012). Det vil derfor være fordelaktig om man kjenner størrelsesfordelingen og variasjon i smoltutviklingen i karet, for å vurdere i hvilken grad fisken som man tar ut prøver på, er representativ for fiskegruppen (Martin *et al*, 2012).

I forsøk 1 ser man på smoltifiseringsprosessen perioden 19. mars til uttak 1. juli. Ser man på osmolalitet, klorid, kortisol og dødelighet er optimalt tidspunkt for utsett til sjø ved uttak 3. juni, mens smoltindeks og NKA aktivitet er høyest ved uttak 17. juni. Ved uttakene 3. og 17. juni er det henholdsvis 257 og 352 dgr med lys på 24 t i døgnet i karet. Ved uttakene 17. juni og 1. juli er kortisolnivåene under transport i FV svært høye, og bidrar trolig både til dødelighet og redusert osmoregulatorisk evne (Barton, 2002; Farrell *et al*, 2010; Finstad *et al*, 2003; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen & Eliassen, 2012; Iversen *et al*, 1998; Iversen *et al*, 2004; Iversen *et al*, 2009; Mommsen *et al*, 1999; Sandodden *et al*, 2001; Schreck *et al*, 1989). Ved oppdrettsanlegget ble dette karet levert rett etter siste prøveuttak, og som tidligere nevnt var da dødeligheten de første 30 dagene 1,4 %, av om lag 197 000 fisk. Dette karet (ifølge resultatene forsøk 1) kunne ha blitt satt ut en måned tidligere enn det faktisk ble gjort, og ved det unngått den største temperaturøkningen, og risikoen med forsterket stressreaksjon under transport. På den andre siden representerer denne perioden med økende temperaturer en økning i snittvekt på om lag 11 %, fra 49,5 g til 55,5 g. Handeland *et al* (2004) viste at perioden med høy NKA aktivitet varer om lag 250 dgr, i dette tilfellet om lag 25-30 dager, og ingenting tyder på at denne fiskegruppen var i fare med å desmoltifisere. Dette er også i tråd med Zydlewski *et al*. (2005), som antyder at smoltvinduet, ut fra observert adferd, varer om lag 500 dgr.

I forsøk 2 er det ikke i adferd, morfologi eller osmoregulatoriske parametere noen systematiske forskjeller på ved 24, 48 og 72 timer ved ulike akklimeringstemperatur, og selv om denne fisken har stått relativt lengre på 24 t lys (ca. 700 dgr), ser en ingen tegn på desmoltifisering.

Resultatene i forsøkene peker ikke ut en enkelt målemetode som bedre egnet enn andre til å dokumentere smoltstatus. Smoltifiseringen som biologisk prosess er svært tett knyttet til organismens interaksjon med miljøet rundt, og at fotoperiode, via melatonin, er den viktigste miljøfaktoren for styring av smoltifiseringen. Temperatur virker inn på blant annet hastigheten på smoltifiseringsprosessen (Bjornsson *et al*, 2011; McCormick *et al*, 1998).

Ut fra dette virker det da logisk at den viktigste dokumentasjonen på smoltstatus i industrielt oppdrett er dokumentasjon på fotoperiode og lysintensitet. Videre må dette kobles opp mot temperatur, og kan relateres til maksimal osmoregulatorisk evne etter omlag 400 dgr etter overgangen fra kort dag til kontinuerlig lys (Handeland & Stefansson, 2001; Sigholt *et al*, 1998; Sigholt *et al*, 1995). McCormick (1996) viste at dette døgngradtallet påvirkes av temperatur, og at man i forhold til maksimal NKA aktivitet vil variere fra 300 til 1000 dgr ved henholdsvis lave og høye temperaturer. Man ser også at smoltvinduet har en temperaturavhengig varighet (Handeland *et al*, 2004; McCormick *et al*, 1996; Zydlewski *et al*, 2005). I tillegg til fotoperiode og temperatur, vil det også være gunstig å dokumentere endringer i morfologi og adferd, i form av smoltindeks og adferd, eksempelvis som foreslått i Martin *et al*.(2012), hvor man klassifiserer adferden på gruppenivå som 1) mot strømmen, passiv 2) mot strømmen, aktiv og 3) med strømmen.

For å møte myndighetskrav (FKD, FOR 2008-06-17) skal det også dokumenteres sjøvannstoleranse gjennom egnede tester, og pr i dag vil dette være via målinger på NKA aktivitet, plasmaklorid etter 72 til 96 timers sjøvannstest eller nye PCR-baserte metoder. Jo lenger bort fra naturlige forhold fotoperiode og temperatur avviker, jo større dokumentasjonsbehov vil man logisk ha på de andre parameterne morfologi, adferd og sjøvannstoleranse. Jo større avvik man eventuelt finner på utvikling i morfologi og adferd, jo større behov vil man ha for å dokumentere faktisk sjøvannstoleranse før utsett til sjø.

14. KONKLUSJON:

I forsøk 1 var optimalt tidspunkt for utsett til sjø ved uttak 3. juni, i henhold til morfologi og optimal osmoregulatorisk kapasitet. Plasmakortisol var også lavest ved dette uttaket og det ble ikke registrert noen dødelighet. NKA aktivitet var derimot ikke optimal, og kan tyde på NKA aktivitet bør kun benyttes sammen med andre smoltindikatorer. I tillegg var det er en korrelasjon mellom temperatur i FV og kortisol i FV, og dette kan tyde på at stressresponsen er temperaturavhengig. Ut fra dette bør man være aktsom ved all håndtering, inkludert transport, av smoltifiserende laks ved høyere temperaturer. Det var også en sammenheng mellom kortisol og dødelighet etter 72 timer i sjøvannstest. Dette kan tyde på at kombinasjonen av en ikke fullt utviklet smolt og transport stress kan gi økt dødelighet etter utsett på grunn av en kumulativ (maladaptiv) stressrespons som fisken ikke håndterer. Disse resultatene kan være med å gi en forklaring til noe av de forhøyede dødelighetstallene en ser i den Norske oppdrettsnæringa etter utsett i sjø.

I forsøk 2 ser man at man ved høy og lav akklimeringstemperatur i ferskvann, ikke gir systematiske endringer i osmoregulatorisk evne, ved utsett til lave sjøtemperaturer. Forsøket tyder på at 3 dagers akklimering ved lav temperatur ikke er tilstrekkelig, noe man ser på forhøyede

stressnivå i denne gruppen. I industriell sammenheng, kan dette føre til uheldige konsekvenser, da man i tillegg til fall i temperatur, utsetter fisken for transportrelaterte stressorer. Dette kan føre til kumulative stressresponser, og etterfølgende økende dødelighet. Forsøket tyder på at optimal akklimering fra høy til lav vanntemperatur ligger mellom 3 og 11 dager.

15. REFERANSER

- AquaGen, 2012. Lakserogn 2011/2012. Produktpresentasjon. http://www.aquagen.no/En/Salmon_Eggs/Salmon_Eggs_2010+2011/.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Bonga, S.E.W. & Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement (vol 163, pg 149, 1999). *Journal of Endocrinology*. 163, (1) 149-157.
- Arnesen, A.M., Johnsen, H.K., Mortensen, A. & Jobling, M., 1998. Acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to 'cold' sea water following direct transfer from fresh water. *Aquaculture*. 168, 351-367.
- Asche, F., 2009. Reguleringer og produksjonspraksis, Norsk Fiskeoppdrett. Nr. 6.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42, 517-525.
- Barton, B.A. & Schreck, C.B., 1987. Influence of Acclimation Temperature on Interrenal and Carbohydrate Stress Responses in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*. 62, 299-310.
- Bernier, N.J., 2006. The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects of stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 146, 45-55.
- Bernier, N.J. & Peter, R.E., 2001. The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129B, 639-644.
- Bernier, N.J., Bedard, N. & Peter, R.E., 2004. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*. 135, 230-240.
- Berrill, I.K., Porter, M.J.R., Smart, A., Mitchell, D. & Bromage, N.R., 2003. Photoperiodic effects on precocious maturation, growth and smoltification in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 222, 239-252.
- Bijvelds, M.J.C., Flik, G. & Kolar, Z.I., 1998. Cellular magnesium transport in the vertebrate intestine. *Magnesium Research*. 11, 315-322.
- Biomar, 2012. Brosjyre settefisk. http://www.biomar.com/Countries/Norway/Brochures/Settefisk/Settefiskbrosjyre_Desember2010%5B1%5D.pdf.
- Bjerknes, W., 2007. Vannkvalitet og smoltproduksjon. Juul forlag, Oslo, Norge, 240 ss.
- Björnsson, B.T. & Bradley, T.M., 2007. Epilogue: Past successes, present misconceptions and future milestones in salmon smoltification research. *Aquaculture*. 273, 384-391.
- Björnsson, B.T., Stefansson, S.O. & McCormick, S.D., 2011. Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*. 170, 290-298.
- Björnsson, B.T., Einarsdottir, I.E., Power, D., 2011. Is salmon smoltification an example of vertebrate metamorphosis? Lessons learnt from work on flatfish larval development. *Aquaculture* 36, 264-272. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.002.
- Brett, J.R., 1971. Energetic responses of salmon to temperature- Study of some thermal relations in physiology and freshwater ecology of Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American Zoologist*. 11, 99-109.
- Burnley, T., Stryhn, H. & Hammell, K.L., 2012. Post-handling mortality during controlled field trials with marine grow-out Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*. 368, 55-60.
- Carey, J.B. & McCormick, S.D., 1998. Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*. 168, 237-253.
- Chrousos, G.P. & Gold, P.W., 1992. The concept of stress and stress system disorders. *JAMA*. 267 (9), 1244-1252.
- Crocket, E. & Londraville, R., 2006. Temperature. i: Evans, D.H.C., J.B (Ed.), *The physiology of fishes*, s. 230-270.
- Donaldson, M.R., Cooke, S.J., Patterson, D.A. & Macdonald, J.S., 2008. Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology*. 73, 1491-1530.

- Døving, K. & Reimers, E., 1992. Fiskens Fysiologi. John Grieg Forlag AS, Oslo, Norge. 420 ss.
- Evans, D.H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology*. 295, R704-R713.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. & Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*. 85, 97-177.
- Evans, D.H.C., J.B., 2006. The physiology of fishes. CRC Taylor & Francis. 3de edition. 616 ss.
- Falcon, J., Migaud, H., Munoz-Cueto, J.A. & Carrillo, M., 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 469-482.
- Farrell, A.P., Tang, S., Nomura, M. & Brauner, C.J., 2010. Toward Improved Public Confidence in Farmed Fish: A Canadian Perspective on Fish Welfare during Marine Transport. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41, 225-239.
- Fiess, J.C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L.G., Yancey, P.H., Hirano, T. *et al.*, 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146A, 252-264.
- Finstad, B. & Iversen, M., 1995. Testing av smoltkvaliteten hos laks og sjøørret på smottproduksjonsanleggene i Eidfiord, Eikesdalen og Lundamo, NINA Oppdragsmelding. NINA, Trondheim.
- Finstad, B., Iversen, M. & Sandodden, R., 2003. Stress-reducing methods for releases of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in Norway. *Aquaculture*. 222, 203-214.
- Fiskeridirektoratet, 2011. Statistikk for akvakultur.
- Fiskeridirektoratet, 2012. Directorate of Fisheries, Norway. Key figures from aquaculture industry, <http://www.fiskeridir.no/fiskeridir/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur>, last update date 09.06.2012.
- FKD, FOR-2004-12-22-1798 Forskrift om tillatelse til akvakultur for laks, ørret og regnbueørret (laksetildelingsforskriften), <http://www.lovdatab.no/for/sf/fi/xi-20041222-1798.html>.
- FKD, FOR 2008-06-17. Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften), <http://lovdatab.no/for/sf/fi/xi-20080617-0822.html>.
- Folmar, F.C. & Dickhoff, W.W., 1980. The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids: a review of selected literature. *Aquaculture*. 21, 1-37.
- Gatica, M.C., Monti, G.E., Knowles, T.G. & Gallo, C.B., 2010. Muscle pH, rigor mortis and blood variables in Atlantic salmon transported in two types of well-boat. *Veterinary Record*. 166, 45-50.
- Handeland, S.O. & Stefansson, S.O., 2001. Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture*. 192, 291-307.
- Handeland, S.O. & Stefansson, S.O., 2002. Effects of salinity acclimation on pre-smolt growth, smolting and post-smolt performance in off-season Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 209, 125-137.
- Handeland, S.O., Porter, M., Bjornsson, B.T. & Stefansson, S.O., 2003. Osmoregulation and growth in a wild and a selected strain of Atlantic salmon smolts on two photoperiod regimes. *Aquaculture*. 222, 29-43.
- Handeland, S.O., Berge, Å., Bjornsson, B.T., Lie, Ø. & Stefansson, S.O., 2000. Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture*. 181, 377-396.
- Handeland, S.O., Wilkinson, E., Sveinsbo, B., McCormick, S.D. & Stefansson, S.O., 2004. Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture*. 233, 513-529.
- Handeland, S.O., Imsland, A.K., Ebbesson, L.O.E., Nilsen, T.O., Hosfeld, C.D., Baeverfjord, G. *et al.*, 2013. Low light intensity can reduce Atlantic salmon smolt quality. *Aquaculture*. 384-387, 19-24.
- Havbruksinstituttet, 2003. Smoltindeks-vurdering hos kunde. hi.no.

- Havbruksinstituttet, 2012. ATPase som mål på smoltifisering. <http://www.hi.no/index.php?mapping=72>.
- Hoar, W.S., 1976. Smolt Transformation - Evolution, Behavior, and Physiology. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 33, 1233-1252.
- Hwang, P., Lee, T. & Lin, L., 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms (vol 301, pg R28, 2011). American Journal of Physiology. 301, R1206-R1206.
- Hwang, P.P. & Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. Comparative Biochemistry and Physiology. 148A, 479-497.
- Iversen, M., 2009. Stressnivåene i Fútakletturs settefiskanlegg. Effekten av håndtering, vaksinerings og transport på lakseparr og -smolt (*Salmo salar* L.). HBO-rapport 2/2009, Bodø, Norway, ss. 26.
- Iversen, M. & Eliassen, R.A., 2005. Salmon Smolt (*Salmo salar* L) production and stress reducing measures: The effects of Aqui-S™ sedation during vaccination, transport and transfer to sea on survivability, appetite, growth, immunological capacity, primary, secondary and tertiary stress responses. Nordlandsforskning, NF-report 05/2005, ss. 55.
- Iversen, M. & Eliassen, R.A., 2009. The Effect of AQUI-S® Sedation on Primary, Secondary and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt (*Salmo salar* L.) Transport and Transfer to Sea. Journal World of Aquaculture Society. 40, 216-225.
- Iversen, M. & Eliassen, R.A., 2010. Produksjonsstrategi ved Mainstream Norway AS, Avd. MN-Dyping i 2010. Effekten på smoltkvalitet, dyrevelferd og produksjonsresultatet. Høgskolen i Bodø, HBO 4/2010, ss. 51.
- Iversen, M. & Eliassen, R.A., 2011. Produksjonsstrategi ved Mainstream Norway AS.
- Iversen, M. & Eliassen, R., 2012. Stressovervåking av settefiskproduksjonen i Mainstream Norway AS 2009 - 2011. Stresskartlegging av laksesmolt (*Salmo salar* L.), og effekten av stressreducerende tiltak på stressnivå, dyrevelferd og produksjonsresultatet, UiN-rapport nr 05/2012, ss. 54.
- Iversen, M. & Eliassen, R.A., 2013. The effect of allostatic load on hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). Fish physiology & Biochemistry (under revision).
- Iversen, M., Finstad, B. & Nilssen, K.J., 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Aquaculture. 168, 387-394.
- Iversen, M., Eliassen, R.A. & Gill, L., 2004. Transport of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in Puerto Montt, Chile. The effects of high and low transport densities on primary, secondary and tertiary stress responses. Nordlandsforskning, ss. 26.
- Iversen, M., Eliassen, R.A. & Finstad, B., 2009. Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. Aquaculture Research. 40, 233-241.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., Carlsen, K.T. & Evjen, T., 2005. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. Aquaculture. 243, 373-382.
- Stresskartlegging av laksesmolt (*Salmo salar* L.), og effekten av stressreducerende tiltak på stressnivå, dyrevelferd og produksjonsresultatet. Universitetet i Nordland.
- Jakobsen, R. & Iversen, M., 2012. The effect of TEX-OE in Feed during handling and transport of Salmon smolt (*Salmo salar* L.). UIN Notat. 2012.
- Kieffer, J.D. & Tufts, B.L., 1996. The influence of environmental temperature on the role of the rainbow trout gill in correcting the acid-base disturbance following exhaustive exercise. Physiological Zoology. 69, 1301-1323.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F. *et al.*, 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. Ecology of Freshwater Fish. 12, 1-59.
- Kryvi, H., 1992. Generell Anatomi. i: Døving, K. & Reimers, E. (Eds.), Fiskens fysiologi. 8-33.

- Lee, L.E.J. & Bols, N.C., 1989. The Corticosteroid Receptor and the Action of Various Steroids in Rainbow-Trout Fibroblasts. *General and Comparative Endocrinology*. 74, 85-95.
- Lekang, O.I., 2007. *Aquaculture Engineering*. Blackwell Publishing, 1 edition. Oxford, UK. 352 ss.
- Liebert, A.M. & Schreck, C.B., 2006. Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology*. 148, 195-202.
- Madsen, S.S., Kiilerich, P. & Tipsmark, C.K., 2009. Multiplicity of expression of Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localisation and absolute quantification in response to salinity change. *Journal of Experimental Biology*. 212, 78-88.
- Marshall, W.S. & Grosell, M., 2006. Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. i: Evans, D.H. (Ed.), *The physiology of fishes*, ss. 179-214.
- Martin, P., Rancon, J., Segura, G., Laffont, J., Boeuf, G. & Dufour, S., 2012. Experimental study of the influence of photoperiod and temperature on the swimming behaviour of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*. 362, 200-208.
- Mattilsynet, 2011. Rapport Prosjekt Overlevelse Fisk http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00074/Sluttrapport_Prostek_74570a.pdf.
- Maule, A.G., Schreck, C.B., Bradford, C.S. & Barton, B.A., 1988. Physiological-effects of Collecting and Transporting Emigrating Juvenile Chinook Salmon Past Dams on the Columbia River. *Transactions of the American Fisheries Society*. 117, 245-261.
- McCormick, S.D., 1993a. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺ -ATPASE activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50, 656-658.
- McCormick, S.D., 1993b. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺,K⁺-ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50, 656-658.
- McCormick, S.D. & Saunders, R.L., 1987. Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. *American Fisheries Society Symposium*. 1, 211-229.
- McCormick, S.D., Shrimpton, J.M. & Zydlewski, J.D., 1996. Temperature effects on osmoregulatory physiology of juvenile anadromous fish. Cambridge University Press, UK, 279–301 ss.
- McCormick, S.D., Moriyama, S. & Bjornsson, B.T., 2000. Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. *American Journal of Physiology*. 278, R1352-R1361.
- McCormick, S.D., Regish, A.M. & Christensen, A.K., 2009. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na(+)/K(+)-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*. 212, 3994-4001.
- McCormick, S.D., Hansen, L.P., Quinn, T.P. & Saunders, R.L., 1998. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55, 77-92.
- McCormick, S.D., Shrimpton, J.M., Moriyama, S. & Bjornsson, B.T., 2002. Effects of an advanced temperature cycle on smolt development and endocrinology indicate that temperature is not a zeitgeber for smolting in Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*. 205, 3553-3560.
- McCormick, S.D., Bjornsson, B.T., Sheridan, M., Eilertson, C., Carey, J.B. & Odea, M., 1995. Increased daylength stimulates plasma growth-hormone and gill Na+K+ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Comparative*. 165B, 245-254.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 9, 211-268.
- Morgan, J.D. & Iwama, G.K., 1996. Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology and Biochemistry*. 15, 385-394.
- Nilsen, T.O., Ebbesson, L.O.E., Madsen, S.S., McCormick, S.D., Andersson, E., Bjornsson, B.T. *et al.*, 2007. Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase alpha- and beta-subunits, Na⁺,K⁺,2Cl(-) cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology*. 210, 2885-2896.

- Olsen, R.E., Sundell, K., Ringo, E., Myklebust, R., Hemre, G.I., Hansen, T. *et al.*, 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture*. 280, 232-241.
- Pagniello, K.B., Bols, N.C. & Lee, L.E.J., 2002. Effect of corticosteroids on viability and proliferation of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line, RTS11. *Fish & Shellfish Immunology*. 13, 199-214.
- Pankhurst, N.W., Ludke, S.L., King, H.R. & Peter, R.E., 2008. The relationship between acute stress, food intake, endocrine status and life history stage in juvenile farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 275, 311-318.
- Patogen, 2013. <http://www.patogen.no/default.aspx?menu=28&id=251>.
- Pharmaq, 2011. Pharmaq updates. http://www.pharmaq.no/sfiles/98/6/file/vaccines_norway_2011-02_en.pdf.
- Porter, M.J.R., Duncan, N., Handeland, S.O., Stefansson, S.O. & Bromage, N.R., 2001. Temperature, light intensity and plasma melatonin levels in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 58, 431-438.
- Redding, M.J. & 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, 800-807.
- Reid, S.G., Bernier, N.J. & Perry, S.F., 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120C, 1-27.
- Salas-Leiton, E., Coste, O., Asensio, E., Infante, C., Canavate, J.P. & Machado, M., 2012. Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology*. 32, 769-778.
- Salmobreed, 2011. Produksjon. Salgsbrosjyre. 1-2.
- Sandodden, R., Finstad, B. & Iversen, M., 2001. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquaculture Research*. 32, 87-90.
- Schreck, C.B., Solazzi, M.F., Johnson, S.L. & Nickelson, T.E., 1989. Transportation Stress Affects Performance of Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*. 82, 15-20.
- Selye, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*. 1 (4667), 1383-1392.
- Selye, H., 1973. Homeostasis and heterostasis. *Perspectives of Biological Medicine*. 16, 441-445.
- Sigholt, T., Asgard, T. & Staurnes, M., 1998. Timing of parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of changes in temperature and photoperiod. *Aquaculture*. 160, 129-144.
- Sigholt, T., Staurnes, M., Jakobsen, H.J. & Asgard, T., 1995. Effects of continuous light and short-day photoperiod on smolting, seawater survival and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 130, 373-388.
- Small, B.C., 2004. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. *Journal of Fish Biology*. 64, 589-596.
- Sorensen, C., Bohlin, L.C., Overli, O. & Nilsson, G.E., 2011. Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiology & Behavior*. 102, 518-523.
- Staurnes, M., Sigholt, T. & Reite, O.B., 1992. Smoltifisering. i: Døving, K. & Reimers, E. (Eds.), *Fiskens fysiologi*. John Grieg Forlag, Oslo. 308-317.
- Staurnes, M., Sigholt, T., Pedersen, H.P. & Rustad, T., 1994. Physiological-Effects of Simulated High-Density Transport of Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 119, 381-391.
- Staurnes, M., Sigholt, T., Åsgård, T. & Bæverfjord, G., 2001. Effects of a temperature shift on seawater challenge test performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture*. 201, 153-159.
- Stefansson, S.O., Bæverfjord, G., Handeland, S.O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B.O. *et al.*, 2005. Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt. Mattilsynet-Vitenskapskomiteen for mattrygghet.

- Stefansson, S.O., Haugland, M., Bjornsson, B.T., McCormick, S.D., Holm, M., Ebbesson, L.O.E. *et al.*, 2012. Growth, osmoregulation and endocrine changes in wild Atlantic salmon smolts and post-smolts during marine migration. *Aquaculture*. 362, 127-136.
- Strand, J.E.T., Johnsen, H.K. & Arnesen, A.M., 2007. Comparison of parr-smolt transformation in hatchery reared offspring of one domesticated and two wild populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 273, 250-256.
- Thommasen, M., 1992. Biologiske membraner. i: Døving, K., R. E (Ed.), *Fiskens Fysiologi*.
- Tipsmark, C.K. & Madsen, S.S., 2009. Distinct hormonal regulation of Na(+),K(+)-atpase genes in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Endocrinology*. 203, 301-310.
- Toften, H.D., B. Handeland, S.O. Kristensen, T. Mikkelsen, H. Rosseland, B.O. Stefanson, S. Teien, HC, 2011. Optimal smolt production and post smolt performance in the High North- Seawater intermixing, low temperatures and intensive rearing – A cooperation between Nofima Marin, University of Bergen, Norwegian Institute for Water Research and Norwegian University of Life Sciences.
- Tsigos, C. & Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*. 53, 865-871.
- Varsamos, S., Nebel, C. & Charmantier, G., 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 141A, 401-429.
- Weil, L.S., Barry, T.P. & Malison, J.A., 2001. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*. 193, 373-380.
- Wendelaar Bonga, S.E.W., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77, 591-625.
- Wendelaar Bonga, S.E.W., 2011. Hormonal responses to stress. I: Anthony, P.F. (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, s. 1515-1523.
- Willoughby, S., 1999. *Manual of salmonid farming*. blackwell science. 323 ss.
- Zydlewski, G.B. & Zydlewski, J., 2012. Gill Na⁺,K⁺-ATPase of Atlantic salmon smolts in freshwater is not a predictor of long-term growth in seawater. *Aquaculture*. 362, 121-126.
- Zydlewski, G.B., Haro, A. & McCormick, S.D., 2005. Evidence for cumulative temperature as an initiating and terminating factor in downstream migratory behavior of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 62, 68-78.