

MASTEROPPGAVE

Emnekode: AK306F

Navn: Vilde Charlotte Alsos

Måling av kortisol i Atlantisk laks (*Salmo salar* L). Vurdering av ulike metoder og deres nytte som operative velferdsindikatorer.

Dato: 29.05.2020

Totalt antall sider: 49

Forord

Denne oppgaven teller 60 studiepoeng, og er en del av en master i biovitenskap ved Fakultetet for biovitenskap og akvakultur ved Nord Universitet.

Først og fremst vil jeg takke min veileder, Martin Haugmo Iversen, som har vært en viktig støttespiller gjennom hele masterløpet. Takk for alt du har lært meg, og for alle motiverende ord. Jeg ønsker også å takke min med-veileder, Monica F. Brinchmann, for all hjelp. Jeg er veldig takknemlig for at jeg har fått muligheten til å jobbe med dere!

Denne oppgaven hadde ikke vært mulig uten Deepti Manjari Patel, som har vært til stor hjelp med både prøveuttak og analyser. Jeg har satt stor pris på alt du bidratt med, tusen takk! Jeg vil også rette en takk til alle ansatte ved Mørkvedbukta Forsøksstasjon.

Tiden min som masterstudent ved Nord Universitet hadde ikke vært den samme uten Benedikte Hokland Ottestad og Brandon Garcia. Jeg er så glad for at jeg har fått brukt så mye tid sammen med dere. Vi er et godt team! Jeg vil også takke Inger Johanne Gjølseth som har gitt meg mange gode råd og motivasjon.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til min fine familie, flotte samboer og gode venner. Jeg er veldig takknemlig for all støtte og hjelp dere har gitt meg.

Bodø, mai 2020

Vilde Charlotte Alsos

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Innholdsfortegnelse	ii
Sammendrag	iii
Summary	iv
1 Introduksjon	1
1.1 Dyrevelferd	1
1.2 Bevissthet	3
1.3 Velferdsbehov	3
1.4 Velferdsindikatorer	4
1.5 Stress	6
1.6 Sammenhengen mellom kortisol og fiskevelferd	8
1.7 Stressresponser	8
1.7.1 Den adrenergiske responsen	9
1.7.2 HPI-aksen	9
1.8 Målemetoder for kortisol hos fisk	13
1.8.1 Blod	13
1.8.2 Slim/mucus	14
1.8.3 Skjell	15
1.9 Hensikten med undersøkelsen	16
2 Material og metode	17
2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk	17
2.2 Forsøksfisk	17
2.3 Forsøksoppsett	17
2.3.1 Pre-stress	17
2.3.2 Forsøket	17
2.3.3 Stressor	18
2.3.4 Prøveuttak	18
2.4 Kortisolanalyse	20
2.5 Statistisk analyse	20
3 Resultater	22
3.1 Stressrespons	22
3.2 Korrelasjonsanalyser	23
4 Diskusjon	26
4.1 Plasmakortisol	27
4.2 Slim	29
4.3 Skjell	31
4.4 Hvordan tap av slim og skjell påvirker individet	35
5 Konklusjon	37
Litteraturliste	38

Sammendrag

De senere årene har diskusjonen rundt dyre- og fiskevelferd fått økt oppmerksomhet fra både produsenter og forbrukere. God fiskevelferd er essensielt for å oppnå god fiskehelse og lav dødelighet, samtidig som det er viktig av etiske og kvalitetsmessige grunner. Stress har vist seg å være en utfordring for oppdrettsfiskens velferd. Analyser av plasmakortisol, som er sluttproduktet i hypotalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI-aksen), er den mest brukte metoden for å vurdere stress hos fisk. Denne metoden er invaderende, og kortisol kan analyseres på en mindre invaderende måte gjennom slim og skjell. Analyser av kortisolnivåer i slim har vist seg å være en god indikator på akutt stress. I tillegg er interessen for å se nærmere på kronisk økning av kortisol voksende, og fiskeskjell har nylig blitt brukt for å se nærmere på kronisk stress. For å kunne benytte seg av disse nye metodene er det viktig at de gir et like godt bilde av stressresponsen som man får ved metodene som brukes i dag. Målet med denne oppgaven er å se nærmere på såkalte ikke-invaderende målemetoder for stresshormonet kortisol (slim og skjell), og sammenlikne disse med den etablerte metoden; plasmakortisol. 78 Atlantiske laksesmolt (*Salmo salar*) ble benyttet under forsøket. Forsøket ble gjennomført i løpet av én uke, og prøveuttak av ustresstet fisk (pre-stress, kontroll) ble utført før forsøksstart. Fisken ble utsatt for sammentrenging og 90 sekunders lufteksponering ved å tømme karet for vann. Total tid fra start nedtrapping til lufteksponering var fullført, var 15 minutter og 30 sekunder. Deretter ble fisken lastet og transportert til neste forsøkshall. Lastingen tok to minutter og transporttiden var på syv minutter. Fisken ble så fordelt i isolerte kar for prøvetaking etter 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 og 168 timer. Kortisolverdier ble målt i fiskens blodplasma, slim og skjell. Resultatene fra undersøkelsen viste en korrelasjon (0,562, $p < 0,001$) mellom kortisol i plasma og slim, noe som indikerer at slim kan benyttes som målemetode i stedet for plasmakortisol med noen forbehold. Effekten av kortisol i slim synes å ha en forsinkelse sammenliknet med plasmakortisol, og responsen og sensitiviteten er ca. 10% av plasmakortisol. Det ble ikke observert en signifikant korrelasjon mellom plasmakortisol og kortisol i skjell. Det synes som kortisolkonsentrasjonen i skjell ikke påvirkes av akutt stress. Det må understrekes at denne korrelasjonen kan ha blitt maskert av forstyrrelser i perioden før forsøksstart på grunn av byggearbeid nærområdet. Kortisolanalyser av slim og skjell kan være gode alternativ for å studere stress hos fisk. Men det må likevel stilles spørsmål ved om disse metodene er mindre invaderende enn en blodprøve, siden innhenting av slim og skjell vil påvirke fiskens velferd. Det trengs mer forskning på konsekvensene av fjerning av slim og skjell, og rasjonalisering av selve ekstraksjonsmetoden før disse metodene eventuelt tas i bruk.

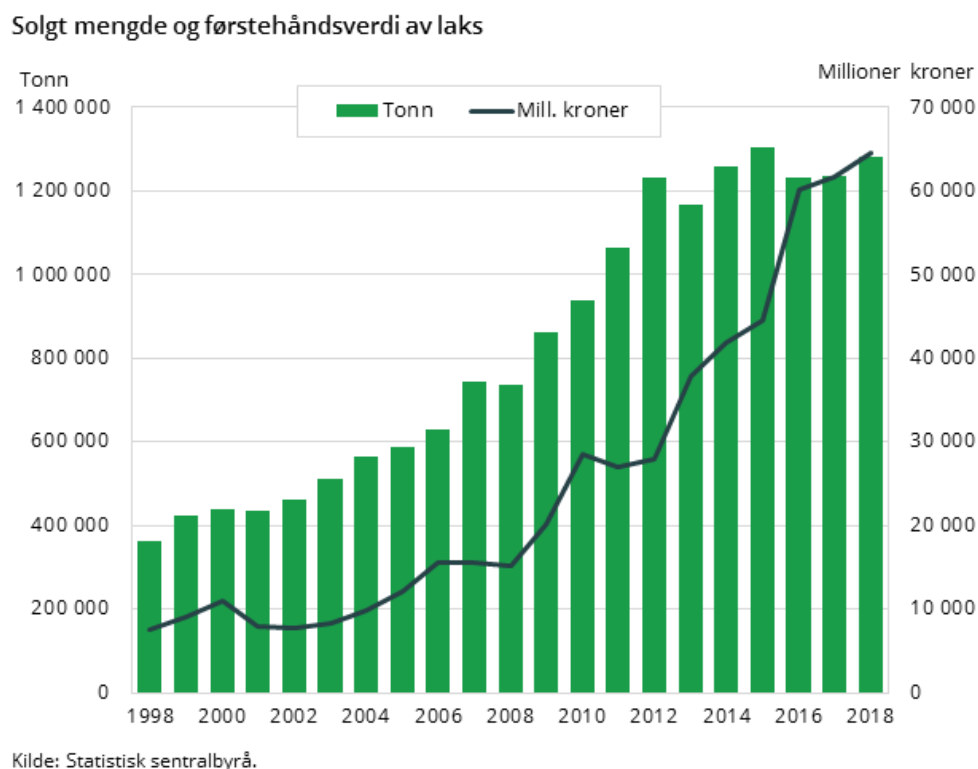
Summary

The discussion of animal and fish welfare has received increased attention from both producers and consumers. Good fish welfare is essential to achieve good fish health and low mortality and is also important for ethical and quality reasons. Stress has proven to be a challenge to the welfare of farmed fish. Plasma cortisol, the end product of the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis, is the most commonly used method for assessing stress in fish. This method is invasive, and cortisol can be analysed in a less invasive way through mucus and scales. Analyses of cortisol in mucus have proven to be a good indicator of acute stress. In addition, interest in studying chronic increase in cortisol is growing, and fish scales have recently been used to look at chronic stress. To make use of these new methods, it is important that they give similar evidence of the stress response as with the current methods. The aim of this thesis is to take a closer look at so-called non-invasive measurement methods for the stress hormone cortisol (mucus and scales), and compare these with the established method, plasma cortisol. 78 Atlantic salmon smolts (*Salmo salar*) were used during the experiment. The train was conducted for one week, and sampling of unstressed fish (pre-stress, control) was performed prior to the start of the trail. The fish was subjected to crowding and 90 seconds of air exposure by emptying the tank of water. The total time from start emptying to air exposure was completed, was 15 minutes and 30 seconds. Then the fish was loaded and transported to the next test hall. The loading took two minutes and the transport time was seven minutes. The fish were then distributed in isolated tanks for sampling after 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, 168 hours. The cortisol level was measured in the fish's blood plasma, mucus, and scales. The results of the study showed a correlation (0,562, $p < 0,001$) between cortisol in plasma and mucus, indicating that mucus can be used as a measurement method instead of plasma cortisol with some reservations. The effect of cortisol in mucus seems to have a delay compared to plasma cortisol, and the response and sensitivity are approx. 10% of plasma cortisol. No significant correlation was observed between plasma cortisol and cortisol in scales. It seems that cortisol concentrations in scales are not affected by acute stress. It should be emphasized that this correlation may have been masked by disturbances in the period prior to the experiment due to construction work in the surrounding area. Cortisol analyses of mucus and scales may be good alternatives for studying stress in fish. However, it should be questioned if these methods are less invasive than a blood test, since obtaining mucus and scales will influence the fish's welfare. Therefore, more research is needed on the consequences of removing mucus and scales and rationalizing the extraction method itself before these methods are possibly applied.

1 Introduksjon

1.1 Dyrevelferd

Fiskeri og havbruksnæringen er i dag viktige kilder til næring og inntekt for store deler av verdens befolkning. Norge er i dag den største produsenten av laks i verden, og verdiskapningen i havbruksnæringen er mangedoblet siden starten. Antall tonn produsert laks har økt fra under 400 000 tonn i 1998 til over 1,28 millioner tonn i 2018 (figur 1). I Norge har man store naturgitte fortrinn for havbruksproduksjon, og visjonen for denne næringen er stor (Nærings- og Fiskeridepartementet, 2015). Det er estimert et potensial for femdobling av produksjonen av laks og ørret innen 2050, sammenliknet med 2010 (Nærings- og Fiskeridepartementet, 2015; Olafsen et al., 2012). For å kunne gjennomføre denne produksjonsøkningen er det viktig at fiskens velferd blir opprettholdt. Helt siden mennesker begynte med dyrehold har dyrevelferd vært et tema, og det er ikke mange år siden fisk ble en del av denne diskusjonen (Damsgård et al., 2006). Diskusjonen rundt dyre- og fiskevelferd har i senere tid fått økt oppmerksomhet fra både produsenter og forbrukere (Iversen & Eliassen, 2012; Poli et al., 2005). God velferd hos oppdrettsfisk er viktig av både etiske og kvalitetsmessige grunner. Gode levekår og en følelse av velvære i kropp og sinn er ofte nevnt når man snakker om dyrevelferd. God dyrevelferd er å sørge for at dyrene blir behandlet godt, og at de har en god opplevelse av livet (Noble et al., 2018).



Figur 1. Solgt mengde og førstehåndsverdi av laks fra 1998 til 2018. Hentet fra Statistisk sentralbyrå (2019)

Det har vist seg vanskelig å bli enig om en felles definisjon på dyrevelferd. En av grunnene til dette er at definisjonen har blitt brukt på forskjellige måter av personer med ulik yrkesbakgrunn (Huntingford & Kadri, 2008). Det er flere som har forsøkt å lage en felles definisjon og forståelse av hva dyrevelferd innebærer. Fraser et al. (1997) brukte de tre største vitenskapelige filosofiene for å belyse temaet. Han konkluderte med at dyr har god velferd når dyret får leve et naturlig liv slik det ville gjort i det fri (økofilosofi). I tillegg skal dyret ikke utsettes for negative erfaringer som smerte, frykt og sult, samtidig som de har tilgang på positive erfaringer som kontakt med dyr fra samme art (moral og etikk). Dyrene skal også fungere best mulig i henhold til biologi, fysiologi og atferd (naturfilosofi).

For å gjøre definisjonen av dyrevelferd mer praktisk og lettere å forholde seg til, kom Mellor og Stafford (2001) med en mer hensiktsmessig tilnærming for hvordan man kan skille mellom god og dårlig dyrevelferd i aktivt dyrehushold. Disse kalles «de fem frihetsgrader». For å oppnå best tenkelig velferd skal dyr være fri fra 1) sult og tørst; 2) miljøforandringer som gir skade; 3) sykdom og skade; 4) atferdsrestriksjoner som for eksempel plassmangel; og 5) mentallidelse. Mentallidelse består av angst, frykt og kjedsomhet i tillegg til sykdom, smerte, sult og tørst. Hvis ikke de fire første punktene er akseptable vil det påvirke den mentale «helsen» negativt (Mellor & Stafford, 2001).

Huntingford og Kadri (2008) konkluderte med at dyrene hadde god velferd når 1) dyret kan tilpasse seg miljøet og har god helse, med funksjonelle biologiske systemer; 2) dyret lever et naturlig liv med muligheten til å uttrykke sin adferd slik de ville gjort i de fri; og 3) dyret skal ikke utsettes for negative opplevelser som smerte, frykt og sult, og det skal ha tilgang på positive opplevelser som sosiale interaksjoner. Både Fraser et al. (1997), Huntingford og Kadri (2008) og Mellor og Stafford (2001) har vært med på å forme lovverket og den praktiske reguleringen rundt dyrevelferd i mange land. Når man inkluderer fysiologiske funksjoner, følelser og levekår i det samme konseptet, blir det komplisert og vanskelig å vite hvordan man kan vurdere og dokumentere dyrevelferden. Noble et al. (2018) definerte derfor dyrevelferd som livskvaliteten slik som dyret selv oppfatter det. Denne definisjonen forutsetter at fisken har en form for bevissthet.

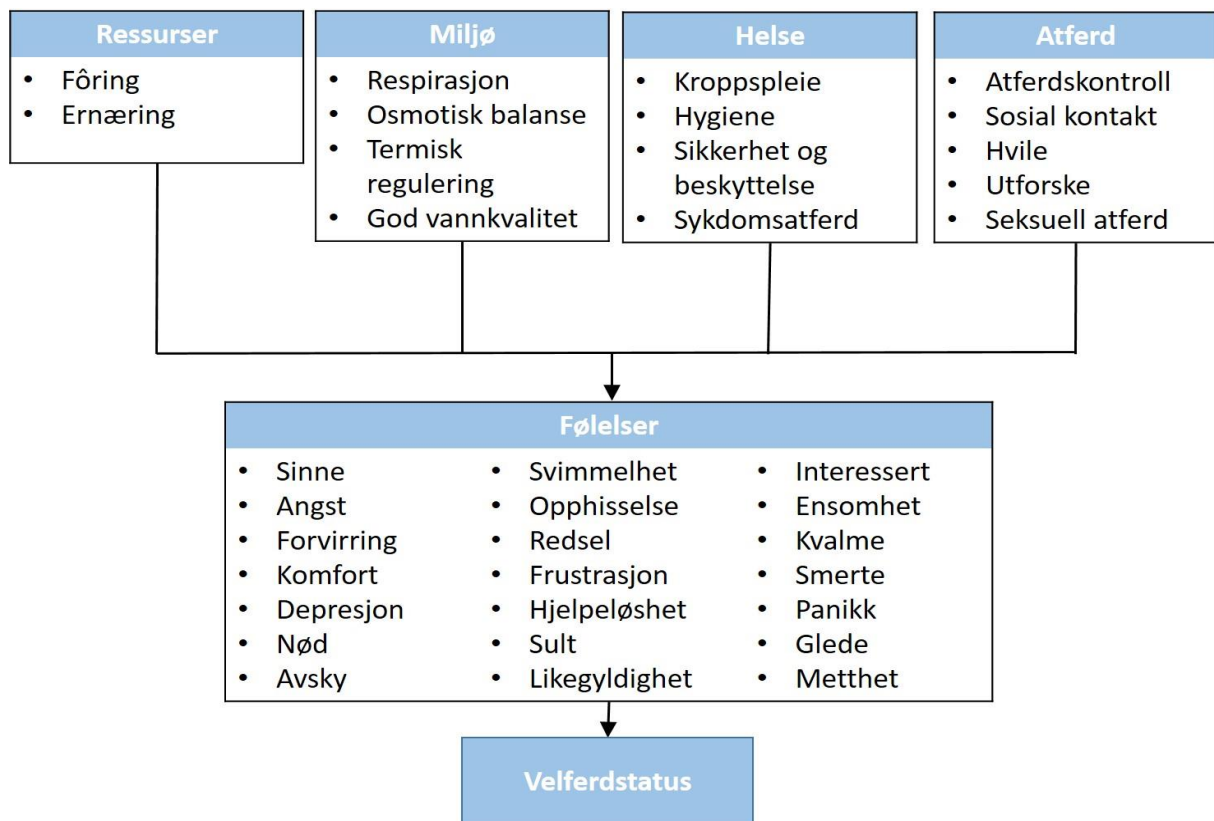
1.2 Bevissthet

Bevissthet betyr at man er klar over egne omgivelser, samt at man handler i forhold til disse. For overlevelse og reproduksjon er fisken avhengig av sansene og av samhandling med sine omgivelser (Noble et al., 2018). Fiskens bevissthet er fortsatt et diskutert tema som det er mange forskjellige meninger rundt. I en sammenfatning av Rose (2002) konkluderes det med at fisk ikke er i stand til å oppfatte smerte. Rose (2002) definerte smerte ut fra hjernens struktur, og mente at hvis et dyr skal føle smerte, må det ha den nødvendige hjernestrukturen, en neocortex. Neocortex i hjernen er en avgjørende del av menneskers grad av bevissthet. Siden fisk mangler neocortex mener noen at fisken ikke kan føle lidelse eller smerte, og heller ikke vil oppleve frykt (Key, 2016; Rose, 2002).

Andre mener at dette argumentet ikke er godt nok da fiskens hjerne kan ha homologe funksjoner. Broom (2016) konkluderte med at fiskens systemer for å føle frykt og smerte har flere likhetstrekk med denne egenskapen hos mennesker. Sneddon (2003) gjorde et forsøk hvor det ble injisert eddiksyre i fiskens lepper, og ut fra dette ble konklusjonen at det er sannsynlig at fisk opplever smerte. Braithwaite og Huntingford (2004) sa at fisk er mest sannsynlig bevisst med tanke på fiskens komplekse oppførsel. Det er vanskelig å beskrive fiskens kompliserte atferd hvis fisk hadde vært helt ubevisst. Å bevise om fisk er bevisste eller ikke er vanskelig, og man får kanskje aldri muligheten til å oppleve hva fisk faktisk føler. På grunn av dette kan man ikke anta at fisk er mindre bevisste enn andre dyr med høyere form for uttrykningssevne.

1.3 Velferdsbehov

Som alle andre dyr har også fisk velferdsbehov. I følge Noble et al. (2018) er velferdsbehov behov som påvirker velferden negativt og gir negative følelser når de ikke blir oppfylt eller forverres (figur 2). Samtidig gir det dyret positive følelser når velferdsbehovet blir oppfylt eller forbedret. Stien et al. (2013) satte opp en semantisk modell for total velferdsvurdering av Atlantisk laks i akvakultur. Modellen kalles SWIM 1.0 og er designet for at personer som jobber i næringen skal kunne gjøre en formell og standardisert vurdering av fiskevelferd ved hjelp av utvalgte velferdsindikatorer. Velferdsbehovene er delt i to grupper: fysiske behov og atferdsbehov. Fysiske behov omhandler respirasjon, vannkvalitet, osmotisk balanse, ernæring, helse, termisk regulering og atferdskontroll. Atferdsbehovene tar for seg fôring, trygghet, beskyttelse, sosial kontakt, utforskning, fysisk aktivitet, hvile, seksuell atferd og kroppspølse.



Figur 2. Velferdsbehov hos laks kan grovt kategoriseres i ressurser som må være tilgjengelig, egnet vannmiljø, god helse og atferdsmessig frihet. Graden av oppfyllelse av disse behovene påvirker laksens mentale tilstand og dermed deres velferdsstatus som enkeltindivider (Noble et al., 2018)

Noen velferdsbehov må oppfylles for at fisken skal overleve, mens andre er ikke avgjørende for at fisken skal kunne leve. Respirasjon er et eksempel på velferdsbehov som må være oppfylt, mens utforskning ikke er et nødvendig behov for overlevelse, men det kan fortsatt føre til redusert velferd hvis kravet ikke kan oppfylles. Man kan diskutere om oppfyllelse av de grunnleggende velferdsbehovene er nok for å konkludere med at velferden er god. Mesteparten av forskningen er gjort på husdyr, hvor man har fokusert på fraværet av lidelse. Duncan (2005) konkluderte med at velferd kunne være mer enn dette, og foreslo at man burde inkludere tilstedeværelse av glede i tillegg til fraværet av lidelse i diskusjonen om velferdsbegrepet.

1.4 Velferdsindikatorer

For å kunne vurdere om fiskens velferdsbehov er oppfylt, benytter man ofte velferdsindikatorer (VI). Velferdsindikatorer kan være basert på direkte observasjoner av dyrenes tilstand og atferd, eller indirekte indikatorer basert på hvilke miljø og ressurser dyrene eksponeres for (Duncan, 2005; Stien et al., 2013). Velferdsindikatorer deles inn i miljøbaserte og dyrebaserte indikatorer.

De dyrebaserte indikatorene blir videre fordelt i gruppebaserte VI-er og individbaserte VI-er. Ved å benytte disse indikatorene kan man få en viss anelse om hvor godt fiskens ulike velferdsbehov er oppfylt, og man kan dermed vurdere fiskens opplevelse av velferd (Noble et al., 2018). Miljøbaserte velferdsindikatorer er en indirekte VI da det ikke beskriver dyrets tilstand, men miljøet rundt. Endringer i miljøet kan i stor grad påvirke fiskens velferd. Temperatur, oksygenmetning og pH er eksempler på miljøbaserte VI-er. Siden redusert velferd ofte kan ha bakgrunn i dårlig miljø, vil kontroll over disse indikatorene være viktig for å forutse eventuelle velferdsproblemer før de sees på atferden eller tilstanden til dyret (Noble et al., 2018).

Dyrebaserte velferdsindikatorer baserer seg på dyrenes egenskaper som indikerer hvor godt en eller flere velferdsbehov er oppfylt (Noble et al., 2018). Her vil ofte tidligere velferdsproblematikk komme til syne, og eksempler på dette kan være redusert kondisjonsfaktor, dårlig vekst og sykdom. Fiskens adferd er en mye brukt indikator. Her ser man blant annet på svømmeaktivitet, visning og orientering av finnene, gjelleløkkrate, hvordan fisken posisjonerer seg i vannet og hvordan fisken reagerer på tilbudet av mat (Noble et al., 2018). Dødelighetsrate er kanskje den mest brukte indikatoren på velferd i praksis. Det er først de senere årene velferd og dødelighet har blitt satt opp mot hverandre. Ellis et al. (2012a) skrev en rapport med hensikt å få flere til å se på sammenhengen mellom dødelighet og velferd. Han påpeker at dødelighet ikke indikerer stammen til velferdsproblemet, men at høy eller økende dødelighet er et tegn på et velferdsproblem i karet eller merden fisken står i.

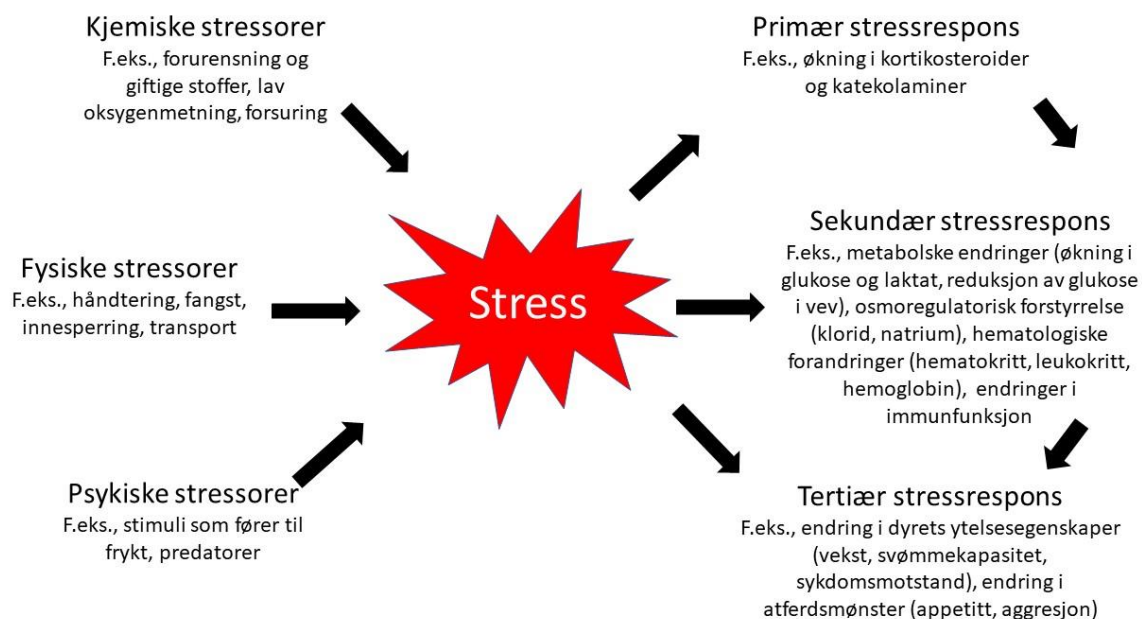
Selv om mange miljø- og dyrebaserte indikatorer kan brukes til å se nærmere på velferd, er det ikke alle indikatorene som er like enkle å måle på lokaliteten (Noble et al., 2012a). VI-er som brukes i den daglige driften kalles operative velferdsindikatorer (OVI). OVI-er er definert som indikatorer som gir en gyldig refleksjon av velferd, er repeterbare og sammenlignbare, og er rimelige og enkle å måle (Noble et al., 2012a). Eksempler på OVI-er inkluderer dødelighet, skader på finner og vekst. Disse er praktisk for oppdrettere å bruke, og registrere i den daglige driften av et anlegg. Noen VI-er må analyseres på et laboratorium, disse kalles derfor for laboratoriebaserte velferdsindikatorer (LABVI). Eksempel på disse er kortisolanalyser, histopatologi og osmolalitet. Disse analysene gir oppdretter en god indikator på velferdsstatusen til fisken (Noble et al., 2018). Hverken OVI-er eller LABVI-er kan alene gi tilstrekkelig dokumentasjon av fiskevelferden, og man bruker derfor en kombinasjon av disse for å få et så nøyaktig bilde av fiskevelferden som mulig. Hensikten med å bruke disse er å

tidlig kunne gjenkjenne tegn på forverret velferd, slik at man kan ta kontroll over situasjonen i en tidlig fase (Noble et al., 2018).

1.5 Stress

I dagens akvakulturindustri går fisk gjennom flere stressfulle prosesser i løpet av produksjonssyklusen. Begrepet stress blir brukt i forskjellige kontekster. Når man snakker om fisk, er fokuset som regel på akutt fysiologisk stress og de hormonelle og biokjemiske reaksjonene som oppstår når fisk blir eksponert for en fysisk, kjemisk eller biologisk stressor (Boxaspen et al., 2005). Stress er definert som en tilstand hvor den dynamiske likevekten til en organisme, som kalles homeostase, blir truet eller forstyrret som et resultat av indre eller ytre stimuli, vanlig definert som stressorer (Wendelaar Bonga, 1997). Schreck (2010) mente at en bredere definisjon av stress var mer passende: «*Stress er den fysiologiske kaskaden av hendelser som oppstår når organismen forsøker å motstå døden eller gjenopprette homeostase i møte med en trussel*». Homeostase er justeringer som gjøres for å opprettholde den fysiologiske likevekten til en organisme (Wendelaar Bonga, 2011). Stressresponsen anses som en adaptiv mekanisme som lar fisken håndtere opplevde eller reelle stressorer, slik at den homeostatiske tilstanden kan opprettholdes (Barton, 2002).

Stressresponsen hos fisk er komplisert. For å gjøre denne responsen enklere å forstå, er den ofte delt inn i akutt og kronisk stress. Forskjellen mellom akutt og kronisk stress er imidlertid uklar (Schreck, 2010). Det er fordi stressorer ofte oppleves på samme tid, og stressresponsen er forskjellig for hvert individ (Iversen, 2013). Når man snakker om akutt stress, er utskillelsen av stresshormoner mest diskutert. Stresshormoner bidrar til frys, flukt eller kjemp («*freeze, flight and fight*»)-reaksjonen hos dyr, som er viktig for dyrets overlevelse (Boxaspen et al., 2005). Når et dyr blir utsatt for stress over lengre tid, kan det bli kronisk stresset. Denne type stress har vist en hemmende effekt på immunforsvaret hos flere fiskeslag, og det er en utløsende faktor for flere sykdommer. Derfor vil kronisk stress være en stor utfordring for liv og helse over tid (Lillehaug et al., 1999).



Figur 3. Kjemiske, fysiske og psykiske stressorer påvirker fiskens fysiologiske responser. De fysiologiske responsene er fordelt i primær-, sekundær-, og tertiær stressrespons. Figuren er omtegnet fra Barton (2002) og Iversen (2013)

Stressresponsen er delt i tre deler: primær-, sekundær-, og tertiær stressrespons som vist i figur 3. Den primære stressresponsen fører til utskillelsen av primære stresshormoner (Wendelaar Bonga, 2011). I tillegg til de primære stresshormonene (adrenalin og noradrenalin) fører også den primære stressresponsen til aktivering av HPI-aksen som øker produksjonen av kortisol (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 2011). Denne responsen fører til den sekundære stressresponsen som gir metabolske forandringer som økt konsentrasjon av glukose og laktat i blodet, økning av hjertets ytelse og økt oksygenopptak (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997). Den tertiære stressresponsen påvirker dyrets ytelsesegenskaper, blant annet reproduksjon, vekst, svømmekapasitet og sykdomsmotstand (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997).

Fisk og andre dyr har to typer endokrine stressresponser. Den første responsen er den adreneriske responsen som resulterer i økte plasmakonsentrasjoner av adrenalin og noradrenalin (Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011). Den andre responsen er den hypotalamus-hypofyse-interrenale (HPI) responsen. Denne responsen fører til økte konsentrasjoner av plasmakortisol (Wendelaar Bonga, 2011).

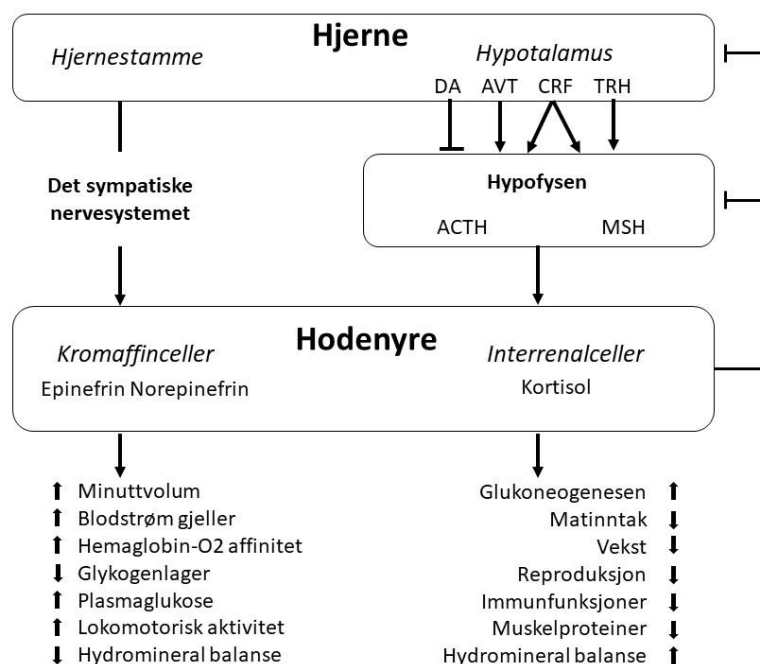
1.6 Sammenhengen mellom kortisol og fiskevelferd

Økning i plasmakortisol er den mest brukte stressindikatoren hos fisk (Barton, 2002; Ellis et al., 2012b; Mommsen et al., 1999). Syntese og frigjøring av kortisol har en forsinkelsestid på flere minutter (Barton, 2002), og toppnivået kan ta en til to timer å nå (Wendelaar Bonga, 1997, 2011). På grunn av dette er det mulig å måle basalnivåene (hvilenivåene), som hos salmonider er lavt ($5 \text{ ng/ml} \approx 13,8 \text{ nM}$) (Pickering & Pottinger, 1989; Wendelaar Bonga, 1997). Kortisol har blant annet blitt mye benyttet fordi prøve- og analysemetodene er både enkle og nøyaktige. I tillegg vil kortisolproduksjonen hos fisk respondere på en lang rekke hendelser og forhold som forventes å være stressfaktorer (Ellis et al., 2012b). Dette betyr at man kan bruke plasmakortisol til å undersøke forskjellige typer stressorer, både stressorer med liten og stor påvirkning på individet. For å analysere kortisol kan man bruke radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbentassay (ELISA) eller enzyme immunoassay (EIA) (Ellis et al., 2012b).

Kortisol er ikke det eneste hormonet knyttet til stress. Katekolaminene (CA) adrenalin og noradrenalin blir frigjort fra kromaffinceller. CA får signaler fra nervekretsløpet og responsen er derfor hurtig. Dette gjør det vanskelig å måle basalnivåer da selve prøvetakingen vil være med på å øke konsentrasjonen av CA i blodet (Ellis et al., 2012b). Derfor er ikke CA egnet som en målbar indikator på stress. Det finnes flere mulige metoder for å vurdere HPI-aksens aktivering hos fisk. For å måle prosesser som forekommer i hjernen vil det vært ideelt å måle indikatorer i selve hjernen som kortikotopinfrigjørende faktor (CRF) eller så nær opprinnelsen til den hormonelle kaskaden som mulig som adrenokortikotropt hormon (ACTH) (Ellis et al., 2012b). I likhet med CA, har det vist seg vanskelig å måle CRF og ACTH på grunn av den hurtige responsen, noe som gjør at man sjeldent benytter seg av disse når man skal analysere stresspåvirkningen.

1.7 Stressresponser

Stress fører til to endokrine responser: 1. Hjerne-sympatisk-kromaffincelle-aksen (BSC) som også kalles den adrenergeiske responsen, og 2. hypotalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI). BSC-aksen fører til økte konsentrasjoner av epinefrin og norepinefrin i blodplasma, mens HPI-aksen fører til økte konsentrasjoner av kortisol (Wendelaar Bonga, 2011). En skjematisk oversikt over disse aksene er vist i figur 4.



Figur 4. Diagram av hjerne-sympatisk-kromaffincelle-aksen (BSC) og hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI) som viser de viktigste naurohormonale og hormonelle budbringerne som er involvert i organismens stressrespons, og effekter av de viktigste budbringerne av aksene: epinefrin og kortisol. Pil som peker opp: stimulering; pil som peker ned: hemmere. AVT = arginin vasotoksin, DA = dopamin. Omtegnet fra Wendelaar Bonga (2011).

1.7.1 Den adreneriske responsen

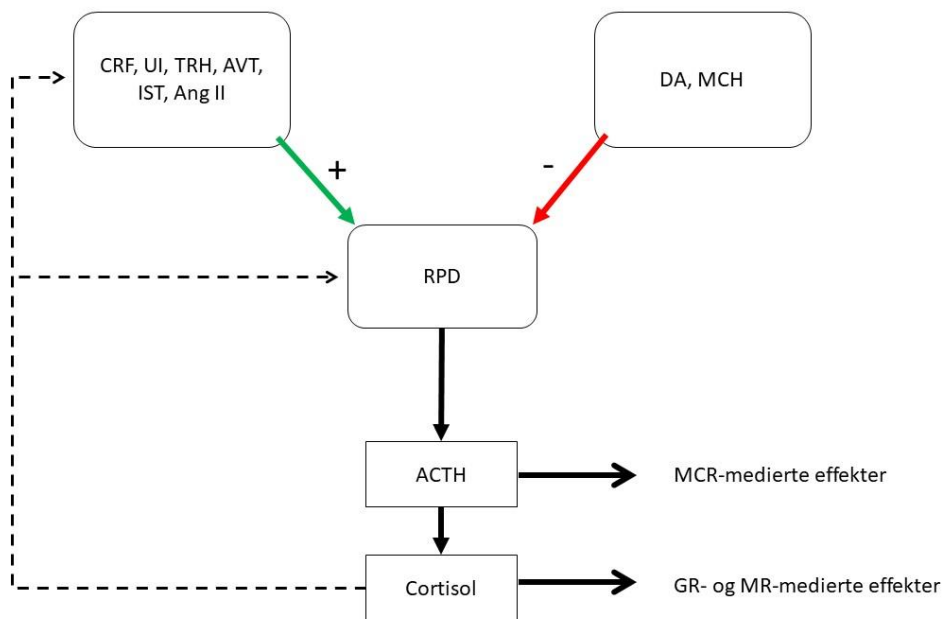
Den adreneriske responsen hos fisk forårsaker en økt konsentrasjon av katekolaminer (CA), hovedsakelig en økning i adrenalin og noradrenalin (Sumpter, 1997). Disse kalles også primære stresshormoner og er en del av den primære stressresponsen (Wendelaar Bonga, 2011). Når fisk blir utsatt for en stressende situasjon, settes den fysiologiske stressresponsen i gang av det sympatiske nervesystemet. CA blir produsert og frigjort fra kromaffincellene, som i hovedsak er lokalisert i fremre del av nyrene (Wendelaar Bonga, 2011). Få sekunder etter en konfrontasjon av en akutt stressor øker katekolaminene i blodet. På grunn av katekolaminenes hurtige respons og korte biologiske halveringstid, er det ikke mulig å benytte seg av CA som en indikator på den primære stressresponsen.

1.7.2 HPI-aksen

HPI-aksen er en kaskade av hormoner med kortisol som det endelige sluttunkt (Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011). Denne aksen er svært kompleks, og til dels lite forstått. Det første hormonet i denne kaskaden er kortikotropinfrigjørende hormon (CRH), også kalt kortikotropinfrigjørende faktor (CRF) som er et peptid på 41 aminosyrer produsert av nevroner

fra de preoptiske kjerner (*nucleus preopticus*;NPO) i hypotalamus (Bernier et al., 2009; Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011). Neuronene som skiller ut CRH er viktig i stressresponsen, da de i tillegg til å påvirke kortisolkonsentrasjonen gjennom HPI-aksen, modererer de også frigjørelsen av CA-er fra det sympatiske nervesystemet (Sumpter, 1997). I tillegg til CRF er CRF-bindende protein (CRFBP) og CRF-reseptorer (CRFR1 og R2) involvert i reguleringen av stressresponsen (Alsop & Aluru, 2011) (figur 5).

Hos fisk stimulerer CRH de kortikotropiske celler i den fremre delen av hypofysen til å utskille peptidhormonet adrenokortikotropin (ACTH) (Halse, 2018; Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011). I den fremre hypofysen binder CRH seg til CRF-reseptorene (R1 og R2) i membraner til kortikotropiske celler. Dette er G-proteinkoblede reseptorer, og aktivering stimulerer cAMP signalveien og frigjøring av adrenokortikotropisk hormon (ACTH) til sirkulasjonen (Alsop & Aluru, 2011). CRH ligner på urotensin I (UI) som også stimulerer ACTH-sekresjon hos fisk (Bernier et al., 2009). I tillegg til CRH og UI har arginin vasotocin (AVT), isotocin, angiotensiner I og II, og thyrotropinfrigjørende hormon (TRH) vist seg å stimulere frigjøringen av ACTH (Fryer, 1989). I tillegg kan melaninkonsentrerende hormon (MCH) og dopamin (DA) ha en hemmende effekt på sekresjonen av ACTH. ACTH skilles ut fra celler i den distale delen av hypofysen (Wendelaar Bonga, 2011). I de CRH-produserende cellene produseres også arginin vasotocin som potenserer CRF-stimulering av ACTH-celler (Wendelaar Bonga, 2011)



Figur 5. En oversikt over hovedfaktorene som påvirker HPI-aksens aktivitet. Grønn pil = stimulerende effekt, rød pil = hemmende effekt, Stiplede piler = negativ feedback. CRF= kortikotropinfrigjørende faktor, UI=urotensin I, TRH=tyrotropinfrigjørende hormon, AVT=arginin, IST=isotoksin, Ang II=angiotensin II, DA=dopamin, MCH=melaninkonsentrerende hormon, MCR=melaninkortisonreseptorer, GR=glukokortikoidreseptorer, MR=mineralkortikoidreseptorer, og RPD=rostral pars distalis. Fra Bernier et al. (2009) og Iversen (2013).

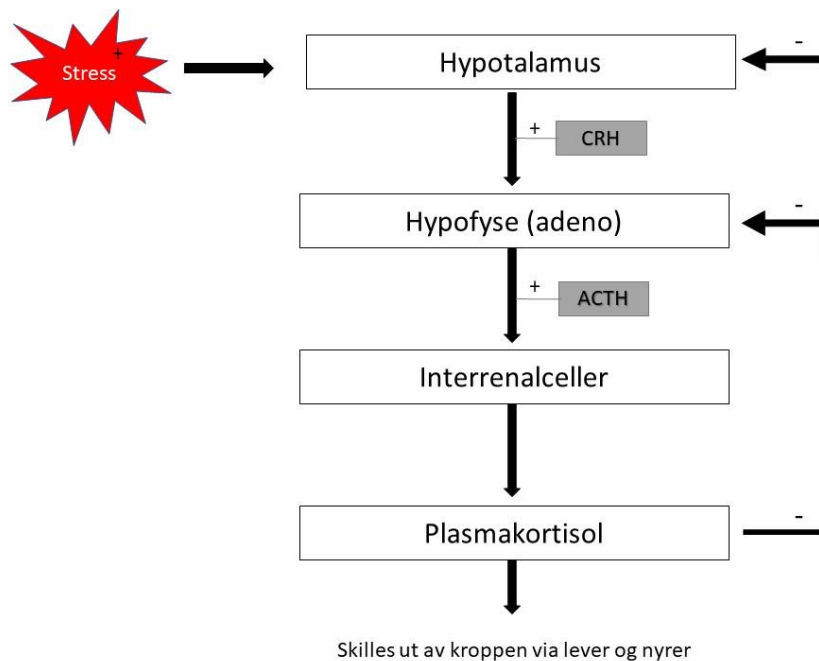
ACTH er et proteinhormon som dannes i *Rostral Pars Distalis* (RPD) i den fremre hypofysen (Iversen, 2013). ACTH har en sentral rolle i kontrollen av sekresjon av kortikosteroider fra interrenalvevet. Inkludert ACTH er det mange andre peptider som ser ut til å kunne påvirke interrenal sekresjon av kortisol i fisk (Sumpter, 1997).

Hos fisk er ACTHs rolle å regulere steroidogenesen i interrenale celler i hodenyren (Wendelaar Bonga, 1997, 2011). ACTH dannes fra prohormonet proopiomelanocortin (POMS) som er delt inn i tre grupper: adrenocorticotropisk hormon (ACTH), endorfinlignende og MSH-lignende produkter (Iversen, 2013). ACTH er den minste med en enkel lineær kjede på 39 aminosyrer (Iversen, 2013). ACTH er hovedproduktet av POMS i de kortikotropiske cellene, og det første målet til POMS-avledede peptider er å binde seg til og aktivere G-proteinkoblet melanocortinreseptorer (MCR) (Alsop & Aluru, 2011; Bernier et al., 2009). MCR-reseptorene er en del av en familie som består av syv transmembrane G-proteinkoblede reseptorer som stimulerer adenylatsyklase og syklisk adenosinmonofosfat (cAMP) sekundært budbringersystem. Fem MCR-reseptorer er identifisert i flere fiskearter, og ACTH er essensiell

for denne reaksjonen da det spesielt binder seg til melanocortin-2-reseptorer (MC2R) som er lokalisert i målvevet (Alsop & Aluru, 2011; Bernier et al., 2009). Aktiveringen av adenylatsyklase og cAMP-avhengige signalveier som proteinkinase A stimulerer syntesen av kortisol (Alsop & Aluru, 2011)

En økning av ACTH er det primære signalet som driver syntese og sekresjon av kortisol fra interrenalcellene i hodenyren hos teleoster (Wendelaar Bonga, 2011). Interrenalcellene er plassert ved hodenyren, for det meste langs de bakre kardinalene og dens grener (Iversen, 2013; Mommsen et al., 1999). I interrenalcellene er det første trinnet i steroidogenesen transport av kolesterol fra den ytre til den indre mitokondriemembranen (Alsop & Aluru, 2011; Mommsen et al., 1999). Som for alle steroider, er kolesterol forløperen til kortisol (Miller, 1988). Det steroidogene akutte regulatoriske proteinet (StAR) er med på å transportere kolesterol over mitokondriemembranen, hvor en serie av ulike cytokrom P450 enzymer omdanner kolesterol til pregnenolone, og deretter videre til kortisol (Alsop & Aluru, 2011; Hagen et al., 2006; Iversen, 2013; Mommsen et al., 1999). Fra de interrenale cellene vil kortisol diffundere ut i blodbanen. Kortisol er et lipidløselig steroidhormon (Ellis et al., 2012b), og er derfor avhengig av transportproteiner for å fraktes til målcellene gjennom blodbanen. På grunn av kortisols lipofile natur, antas inntreden i celler å skje ved passiv diffusjon (Mommsen et al., 1999). Hos fisk har man ikke klart å identifisere et spesifikt kortisolbindende protein, men hos pattedyr er det kortikosteroidbindende globulin (CBG) som binder seg til kortisol (Mommsen et al., 1999).

De viktigste funksjonene til kortisol er å overføre energien til de delene av kroppen som trengs for å overleve. Dermed vil det bli mindre energi til vekst, reproduksjon og immunfunksjoner (Wendelaar Bonga, 1997, 2011). Gjeller, tarm og lever er viktige mål for kortisol i fisk, og disse organene reflekterer de to viktigste funksjonene til kortisol: 1) som en glukokortikoidfunksjon som påvirker metabolisme og vekst; og 2) som mineralkortikoidfunksjon som regulerer den hydromineral balansen (Wendelaar Bonga, 1997). I vertebrater er disse funksjonene styrt av glukokortikoidet kortisol og mineralkortikoidet aldosteron. Hos fisk fungerer kortisol som både glukokortikoid og mineralkortikoid. Målet til kortisol er dermed glukokortikoidreseptorer (GR) og mineralkortikoidreseptorer (MR). GR er blant annet identifisert i lever, gjeller, tarm, nyre, hjerte, gonader, skjelettmuskulatur og milt. I tillegg er både GR og MR identifisert flere plasser i hjernen (Bernier et al., 2009; Mommsen et al., 1999).



Figur 6. Viser en forenklet figur av HPI-aksen, hormonene som påvirker utskillelsen av kortisol og negativ feedback (Bernier et al., 2009).

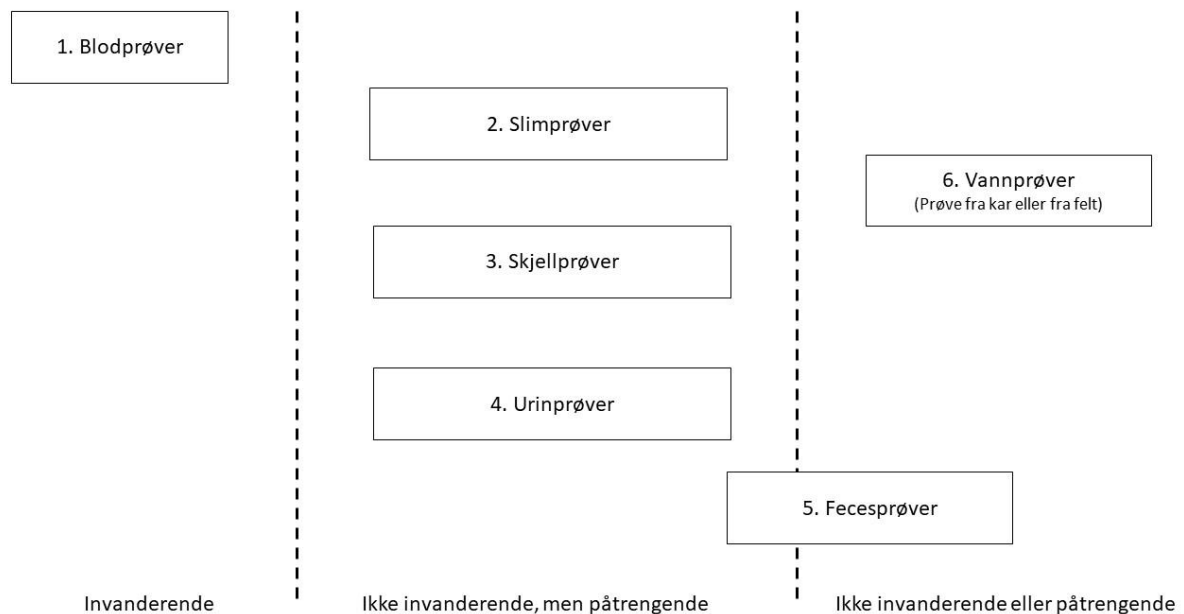
Selvregulering, eller feedback kan være både positivt og negativt. Negativ feedback er hemmende og spiller en stor rolle i levende organismer. Hypofysens regulering av hormoner er ett eksempel. Når et hormon øker til en viss konsentrasjon vil hypofysen bli påvirket til og stoppe produksjonen av dette hormonet (Hauge, 2018). Negativ feedback fra HPI-aksen er vist i figur 6. Gjennom Negativ feedback i hvert nivå i HPI-aksen, modulerer kortisol også stressresponsen (Bernier et al., 2004; Sumpter, 1997). Mekanismene bak denne reguleringen er uklare og ikke godt forstått (Bernier et al., 2009). For at fisken skal kunne opprettholde homeostase er negativ feedback viktig.

1.8 Målemetoder for kortisol hos fisk

1.8.1 Blod

I praksis er forskjellige blodparametere som plasmakortisol de mest brukte metodene for å vurdere stress hos fisk (Ellis et al., 2012b; Wendelaar Bonga, 1997). For å måle plasmakortisol blir det tatt en blodprøve av fisken. En blodprøve er en invaderende prøvemethode. Denne type prøvetaking er stressende for fisken da den inkluderer trenging, håving og blodprøve. Stikket fører til økt sannsynlighet for at fisken kan få infeksjoner, som også gir en økt stressrespons (De Mercado et al., 2018). Blodprøvetaking av fisk er invaderende, og kan påvirke stressresponsen negativt. Blodprøver for å måle plasmakortisol blir sett på som «den gyllene

standard», og med bruk av riktig bedøvelse er det den prøvemethoden som gir de mest nøyaktige resultatene (Iversen et al., 2003). Stresset som følge av blodprøvetaking kan begrenses ved bruk av mindre invaderende metoder som vannprøver, prøver av avføring, urin, slim eller skjell (Bertotto et al., 2010; Carbajal, 2018; Ellis et al., 2013) (figur 7). Disse metodene regnes ikke som invaderende, men de kan være potensielle stressorer på grunn av forstyrrelser og håndtering (Ellis et al., 2013)



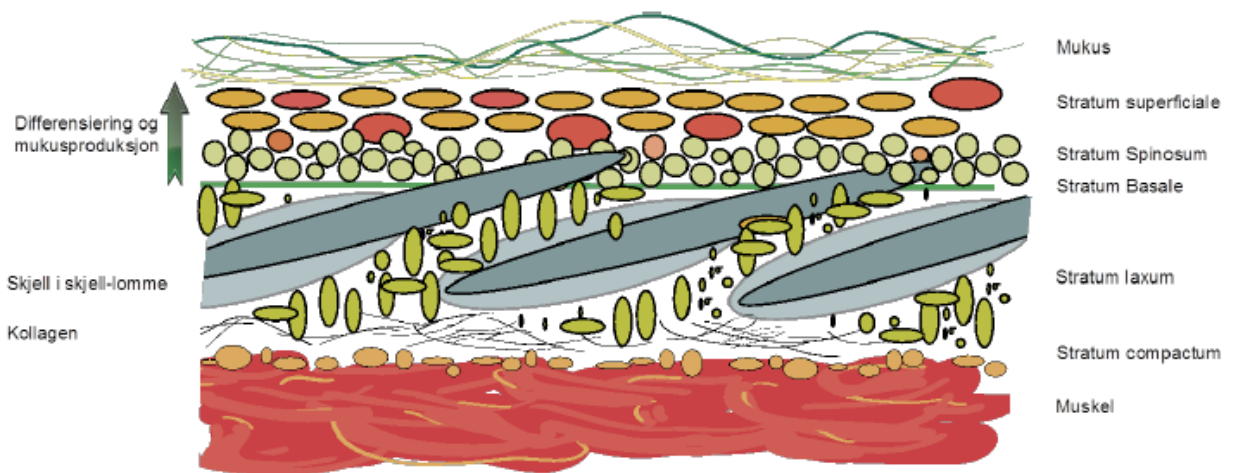
Figur 7. Oversikt over metoder for å overvåke steroider hos fisk. Fornyet fra Ellis et al. (2013)

1.8.2 Slim/mucus

Fiskens slim er det første ytre forsvaret, og fungerer som en dynamisk og semipermeabel barriere som beskytter mot endringer i miljø (figur 8). Samtidig er slimet viktig for fiskens osmoregulering, respirasjon og immunforsvar (Esteban, 2012; Shephard, 1994). Epidermalt slim fungerer også som et depot for molekulære komponenter som kortikosteroider og kjønnssteroider (Barkowski & Haukenes, 2014; Guardiola et al., 2016). Steroidhormoner som kortisol er lipofile, og vil trolig diffundere fra blod til slim. (Bertotto et al., 2010). Dette gjør det mulig å måle kortisolkonsentrasjonen i slimet. Siden produksjonen av slim sannsynligvis er kontinuerlig, vil trolig steroidkonsentrasjonen representere nåverdier istedenfor opphopning av steroider over tid (Ellis et al., 2013).

De siste årene har det blitt større oppmerksomhet rundt hvordan man kan måle kortisol på mindre invaderende måter (Cao et al., 2017; Ellis et al., 2004; Ellis et al., 2013; Kersey &

Dehnhard, 2014). Det har blitt sett nærmere på feces, vannprøver, vevsprøver og prøver av hel kropp. Kortisolanalyser av fiskens slim har fått ekstra oppmerksomhet siden prøvemethoden er mindre invaderende sammenliknet med andre metoder (De Mercado et al., 2018; Guardiola et al., 2016; Simontacchi et al., 2008). Til nå har innholdet av kortisol i slim blant annet blitt testet etter bruk av stressorer som transport, akutt hypoksi, trenging og forskjellige typer bedøvelse (Bertotto et al., 2010; De Mercado et al., 2018; Guardiola et al., 2016).



Figur 8. Skjematisk fremstilling av hudanatomi hos laksefisk. Til høyre ser man navnene på de ulike lagene som bygger opp huden hos teleoster. Figur fra Takle et al. (2015)

1.8.3 Skjell

Glukokortikoidnivåene i plasma og slim hos fisk viser nivåene av kortisol i nåtid, og det representerer ikke fiskens livstidseksposering for stress. Kronisk stress har fått økende oppmerksomhet da det er interesse for å se nærmere på fiskens velferd gjennom livet. Fjær hos fugl (Bortolotti et al., 2008), og hår hos pattedyr (Russell et al., 2012) blir brukt for å dokumentere kronisk stress. Skjell er også kalkede strukturer, og derfor anses de som gode kandidater for å se nærmere på steroider over fiskens levetid (Sadoul & Geffroy, 2019). Kortisol i skjell antas å gi et bilde av den totale hormonsekresjonen over tid, men det eksisterer lite forskning på dette området (Aerts et al., 2015). Hos fisk blir skjellene dannet sent i ontogenesen (Sire & Akimenko, 2004), og hos teleoster er vekst og mineralisering kontinuerlig (Schönbömer et al., 1979). Dermed oppfyller de kravene om at de skal ha sakte og kontinuerlig vekst (Aerts et al., 2015). I tillegg til dette kan skjell egne seg bra, da prøvemethodene er enkle og fiskens skjell vil vokse fort tilbake (Sadoul & Geffroy, 2019).

1.9 Hensikten med undersøkelsen

I denne undersøkelsen ønsket en å undersøke såkalte ikke-invaderende (slim og skjell) målemetoder for stresshormonet kortisol, og sammenlikne det med den etablerte metoden; plasmakortisol. En ønsker også å få svar på følgende spørsmål:

1. Er de ikke-invaderende målemetodene for kortisol gode alternativ for plasmakortisol i forhold til velferd og målbarhet?
2. Kan disse ikke-invaderende målemetodene brukes til å dokumentere akutt og kronisk stress?
3. Hvordan er sammenhengen mellom plasmakortisol og de ulike ikke-invaderende målemetodene?

2 Material og metode

2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk

Eksperimentet ble godkjent av Mattilsynet av brev den 24.05.19, og er registrert med godkjennelse FOTS ID 19447.

2.2 Forsøksfisk

78 Atlantiske laksesmolt (*Salmo salar*) ble benyttet under forsøket. Fisken var sjøvannstilvent (1-åring) ved forsøksstart, og hadde en gjennomsnittsvekt på 544 ± 258 g og en gjennomsnittslengde på $33,5 \pm 4,8$ cm. Laksen var av stamme Salmobreed QTL-IPN, og ble klekket 02.03.2018 hos Salten Smolt avdeling Breivik. Fra Salten Smolt ble fisken transportert med brønnbåt til Mørkvedbukta forsøksstasjon 08.05.2019. Fisken ble plassert i ett kar på $1,5 \text{ m}^3$ hvor den sto frem til forsøksstart 18.11.2019 (250 individer i karet). Fisken fikk kontinuerlig tilførsel av sjøvann fra 50 m dyp med en stabil salinitet på 33,5 ‰. Vanntemperaturen var $7,8 \pm 0,7$ °C, og oksygennivået var på $85,1 \pm 6,1$ % O₂ metning.

2.3 Forsøksoppsett

2.3.1 Pre-stress

For å kunne bestemme effekten av transport, sammentrenging og lufteksponering (stressfaktorer) på de primære stressresponsene ble det tatt blod-, skjell-, og slimprøver før oppstart av forsøket (pre-stress) og 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 og 168 timer etter at fisken ble utsatt for stress. Pre-stressgruppen besto av 12 fisk.

2.3.2 Forsøket

Ved forsøksstart var 250 Atlantiske laks plassert i ett kar ($1,5 \text{ m}^3$). 12 fisk ble tilfeldig tatt ut fra karet, og brukt som kontrollfisk før stress (pre-stress). Deretter ble 66 fisk utsatt for 90 sekunders lufteksponering for så å bli fraktet i et transportkar til hall seks (transporttid 15 min). Ved ankomst i hall seks ble seks fisk (0 t) bedøvd (5 ml/L metomidate), mens resten av fisken ble fordelt i 10 kar á seks fisk per kar ($0,5 \text{ m}^3$). Karene var isolert for innsyn. Videre ble det tatt prøver av seks individer etter 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 og 168 timer etter påførte stressorer (lufteksponering, håving og transport). Det ble tatt blod-, slim- og skjellprøver av kontrollgruppen (pre-stress) og forsøksgruppene.

2.3.3 Stressor

Stressgruppene ble utsatt for 90 sekunders lufteksponering og sammentrenging ved å tømme karet for vann. Total tid fra start av nedtapping til lufteksponering var fullført var 15 minutter og 30 sekunder. Deretter ble 66 fisk håvet over i et transportkar og transportert til neste forsøkshall. Lastingen til transportkar tok to minutter, og transporttiden var på syv minutter (figur 9). Fra transportkaret ble seks og seks fisk håvet over i bøtter og deretter fordelt i 10 kar på 0,5 m³. Stressgruppene ble kun utsatt for stress en gang i løpet av forsøket.



Figur 9. Stressor med 90 sekunders lufteksponering og sammentrenging. Total varighet på stressor var 15 minutter og 30 sekunder. Fisken ble deretter håvet og flyttet til en annen forsøkshall. Transporttid 7 minutter.

Foto: Martin H. Iversen

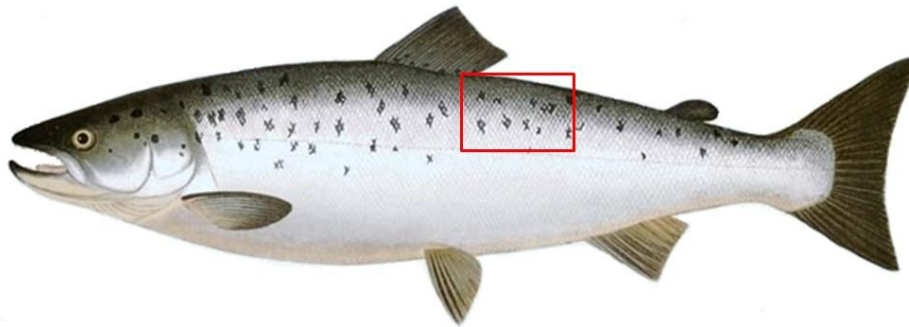
2.3.4 Prøveuttak

Totalt 78 Atlantiske laks ble brukt i forsøket. Tolv kontrollfisk (pre-stress) ble håvet fra karet og bedøvet i en bøtte med 5 mg/L metomidate. Metomidate har i tidligere forsøk vist seg å blokkere økning i plasmakortisol etter inntrådt anestesi (Iversen et al., 2003). Fisken ble avlivet med et slag mot hodet, vekt og lengde ble målt. Blodprøve ble tatt fra kaudalårekomplekset med en 0,6 x 25 mm heparinisert sprøyte (1 ml), og fylt i et Eppendorfrør (VWR, Norge) på

1,5 ml. Blodet ble deretter sentrifugert på 5000 rpm (Heraeus Fresco 21, Thermo, Tyskland) i fem minutter. Blodplasma ble pipettert ut og overført i nye Eppendorfrør på 1,5 ml. Blodplasma ble oppbevart i fryser ved -40°C i påvente av analyser.

Slim ble samlet og analysert med metodene beskrevet av Carbajal et al. (2019) og Guardiola et al. (2016) med følgende endringer. Slim ble samlet ved å forsiktig skrape den laterale delen av hvert individ med et objektglass. Slimet ble oppbevart i et kryorør (VWR, Norge) og plassert i flytende nitrogen. Prøven ble plassert i fryser ved -80 °C i påvente av analyser. Før analyse, ble prøvene tint på is, vortekset i fem minutter og sentrifugert på 2000 x g (Heraeus Fresco 21, Thermo, Tyskland) i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble pipettert ut og oppbevart i et Eppendorfrør i påvente av kortisolanalyser (se beskrivelse av kortisolanalyser, 2.4).

Prøvetakingen og analysene av skjell ble gjort i henhold til metoden beskrevet i Carbajal et al. (2018). Skjell ble skrapet fra den dorso-laterale siden ved hjelp av et objektglass, og overført til et Eppendorfrør (VWR, Norge) på 1.5 ml (Figur 10). Prøvene ble oppbevart i fryser ved -40°C til videre analyser. Prøvene ble tint på is, 300 mg skjell ble overført til et 50 ml Corning sentrifugeringsrør (VWR, Norge) og vasket med 3 ml 2-propanol. Prøven ble så vortekset i to og et halvt minutt før 2-propanolen ble byttet ut. Vaskeprosedyren ble gjennomført tre ganger for å eliminere kortisolpåvirkningen fra omgivelsene (blant annet slim) (Carbajal et al., 2018). Etter vaskingen ble skjellene lagt til lufttørking ved 22°C i 24 timer. Deretter ble 75 mg av de tørkede skjellene plassert i et kryorør og tilsatt 1 ml metanol. Skjellene ble homogenisert ved hjelp av *precellys24 tissue homogenizer* (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankrike) og keramikkuler (2,8mm) i to runder med 6000 rpm i 30 sekunder. Mellom rundene ble prøvene avkjølt i ett minutt på is. Den homogeniserte prøven ble deretter inkubert med metanol i 18 timer ved 30°C i en mikseinkubator (Unimax 1010 DT, Heidolph, Tyskland). Etter ekstraksjonen ble prøven sentrifugert (Heraeus Fresco 21, Thermo, Tyskland) ved 9500 x g i 10 minutter. Prøven ble plassert i romtemperatur i 24 timer for å fordampe supernatanten. Deretter ble det tilsatt 0,2 ml fosfatbufret saltvann (PBS) før prøven ble vortekset på 1800 rpm i ett minutt og sentrifugert på 5000 rpm i fem minutter. Supernatanten ble videre brukt til kortisolanalyser (se 2.4)



Figur 10 Oversikt over prøvetakingssted for skjellprøver hos Atlantisk laks. Omtegnet fra Gösta (u.å.).

2.4 Kortisolanalyse

Kortisolkonsentrasjonen i blodplasma, skjell og slim ble analysert ved hjelp av kortisol ELISA kit (DRG Instruments GmbH, Tyskland), hvor produsentens instruksjoner ble fulgt. Kort forklart ble 20 μl av standardløsningene (0-800 $\text{ng/mL} \approx 0-2208 \text{ nmol/L (nM)}$), positiv kontroll og prøvene ble pipettert til en brønn og blandet med 200 μl enzymkonjugat og inkubert i en time i mørket. Deretter ble innholdet i brønnene kastet ut, og brønnene ble skylt tre ganger med 400 μl Wash Solution. Brettet ble slått mot et papir for å få ut all væske fra brønnene. 100 μl Substrate Solution ble pipettert i hver brønn, og prøvene ble inkubert i mørket i 15 minutter. Etter inkuberingen ble det tilsatt 100 μl Stop Solution i hver brønn, og absorbansen ble bestemt ved 450 nm mikrotiterplate-leser (Tecan Sunrise Remote, Bergman diagnostika, Østerrike) innen 10 minutter.

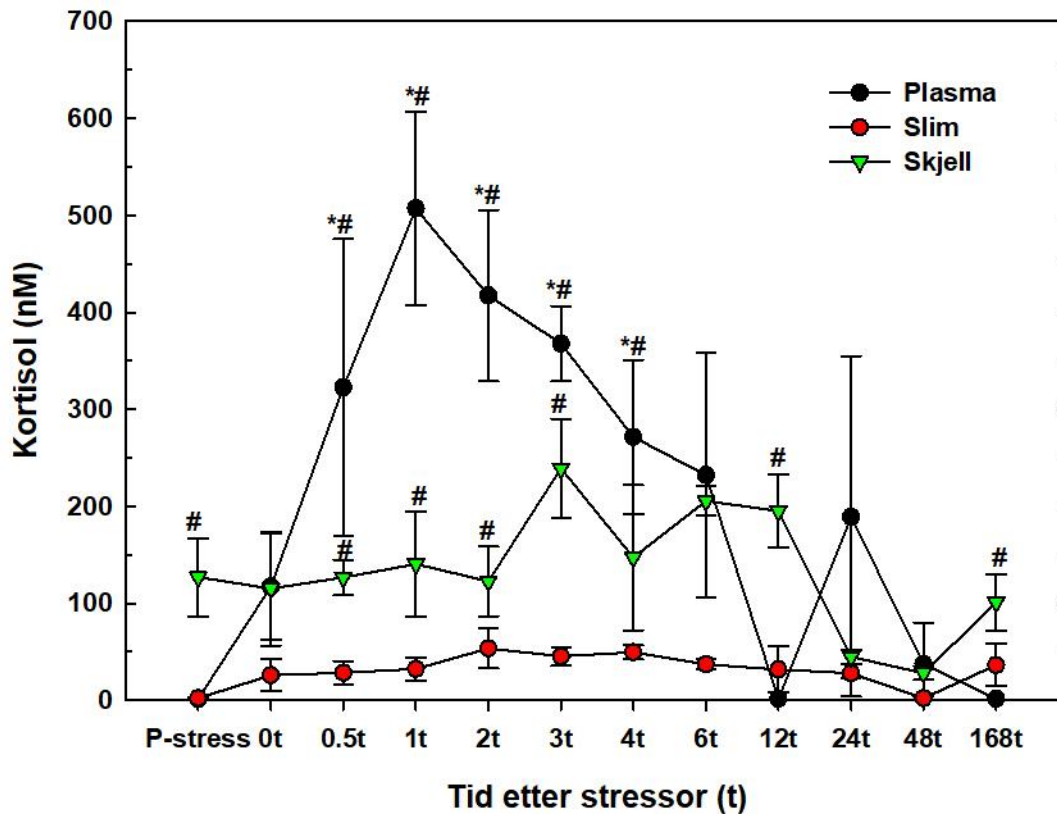
2.5 Statistisk analyse

Statistisk analyse ble gjort ved hjelp av statistikkprogrammet SPSS (ver. 25.00) og SYSTAT (ver 13.00.05) for Windows. All data ble testet for normalitet og homogenitet ved hjelp av henholdsvis Komogorov-Smirnov test og Levene's test. Hvis nødvendig ble data logtransformert for å møte disse antagelsene. Enveis variansanalyse (one-way ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1987) er benyttet for å analysere endring i kortisol fra pre-stress til et annet tidspunkt etter flytting og applisert stressor innen en forsøksgruppe, og for å analysere forskjellen i

kortisolnivå mellom ulike målvev ved samme tidspunkt. Hvis F-verdiene var signifikante, ble en Bonferroni post hoc test kjørt for å bestemme om det var forskjeller mellom gruppene og tidspunktene. For å studere sammenhengen mellom plasmakortisol, kortisol i slim og skjell ble det gjennomført en ikke-lineær regresjonsanalyse (Spearman ρ). Signifikant forskjell ble bestemt på 0,05 nivå. Alle resultater er uttrykt i gjennomsnitt med standardavvik ($\bar{x} \pm SD$). Signifikante forskjeller innen en gruppe ved ulike prøvetakingstidspunkt sammenliknet med pre-stress ble i figurene indikert med *. Tilsvarende er signifikante forskjeller mellom ulike målvev indikert med #.

3 Resultater

3.1 Stressrespons



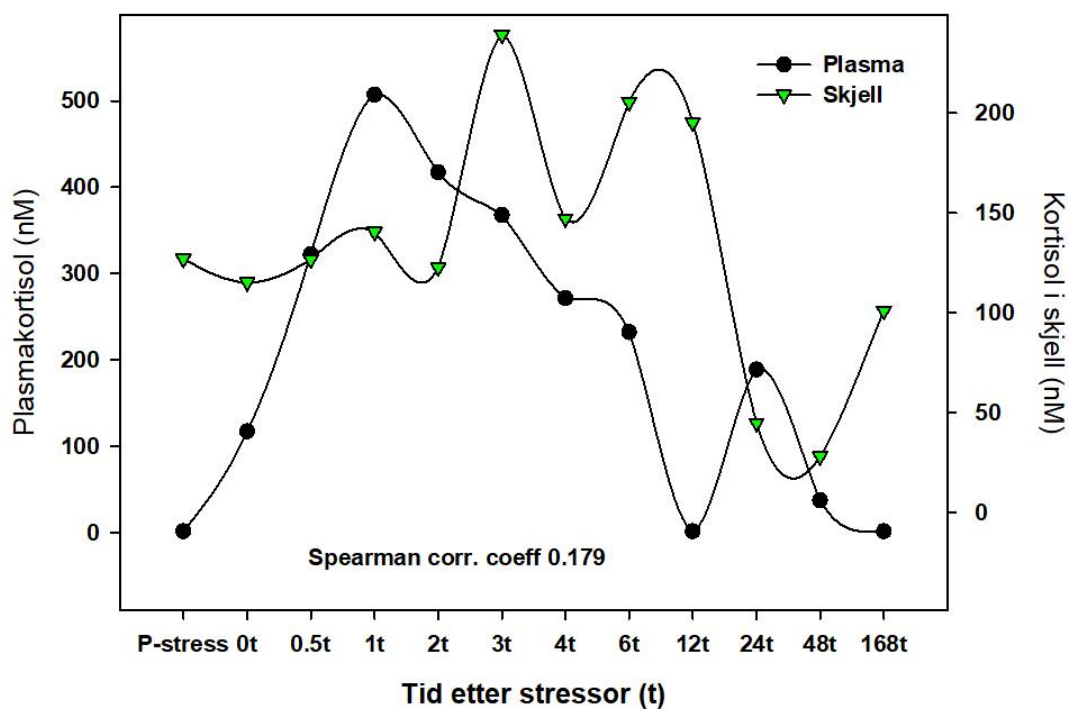
Figur 11. Gjennomsnittlige verdier av kortisol i plasma, slim og skjell ($\bar{n} \pm SD$) før og etter lufteksponering og transport. * indikerer signifikant forskjell fra pre-stress, og # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved et gitt prøvetidspunkt.

Figur 11 viser gjennomsnittlige verdier av kortisol i blodplasma, slim og skjell etter lufteksponering og transport. De gjennomsnittlige verdiene av plasmakortisol før forsøksstart (pre-stress) lå på $1,6 \pm 0,3$ nM. I den samme gruppen var nivåene av kortisol $2,2 \pm 1,4$ nM for slim og $127,1 \pm 40,4$ nM i skjell. Etter påført stressor var høyeste målte verdi for plasmakortisol $507,1 \pm 99,7$ nM (1 t), og tilsvarende ble de laveste verdiene målt 12 og 168 timer etter påført stressor ($1,7 \pm 0,0$ nM). For slim og skjell var laveste og høyeste gjennomsnittsnivå av plasmakortisol henholdsvis $2,3 \pm 1,5$ nM (48 t) og $53,7 \pm 20,8$ nM (2 t), og $28,2 \pm 7,1$ nM (48 t) og $239,3 \pm 50,9$ nM (3 t). Plasmakortisol var signifikant høyere ($P < 0,05$) 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 og 24 timer etter påført stressor sammenliknet med pre-stress. Slimkortisol var signifikant høyere enn pre-stress 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 og 168 timer etter påført stressor, og skjellkortisol var signifikant høyere 3, 6, 24 og 48 timer etter påført stressor. Skjellkortisol var signifikant høyere

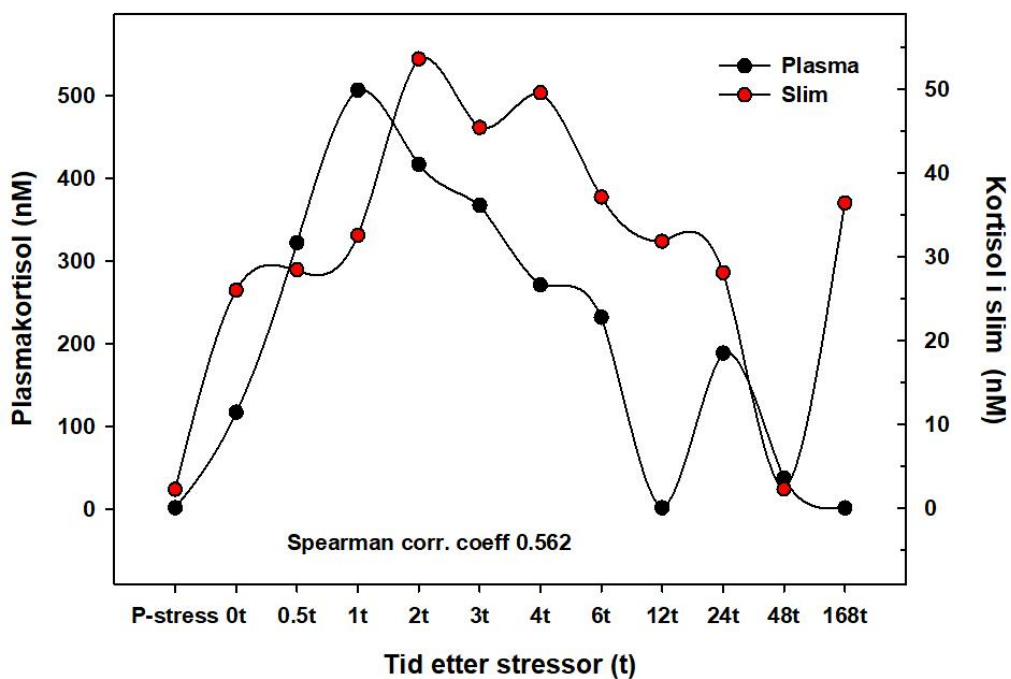
sammenlignet med slim- og plasmakortisol pre-stress, 12 og 168 timer post-stress. Skjellkortisol var i tillegg signifikant høyere enn slimkortisol 0,5, 1, 2 og 3 timer etter påført stressor. Plasmakortisol var signifikant høyere enn slim- og skjellkortisol 0,5, 1, 2, 3 og 4 timer etter påført stressor.

3.2 Korrelasjonsanalyser

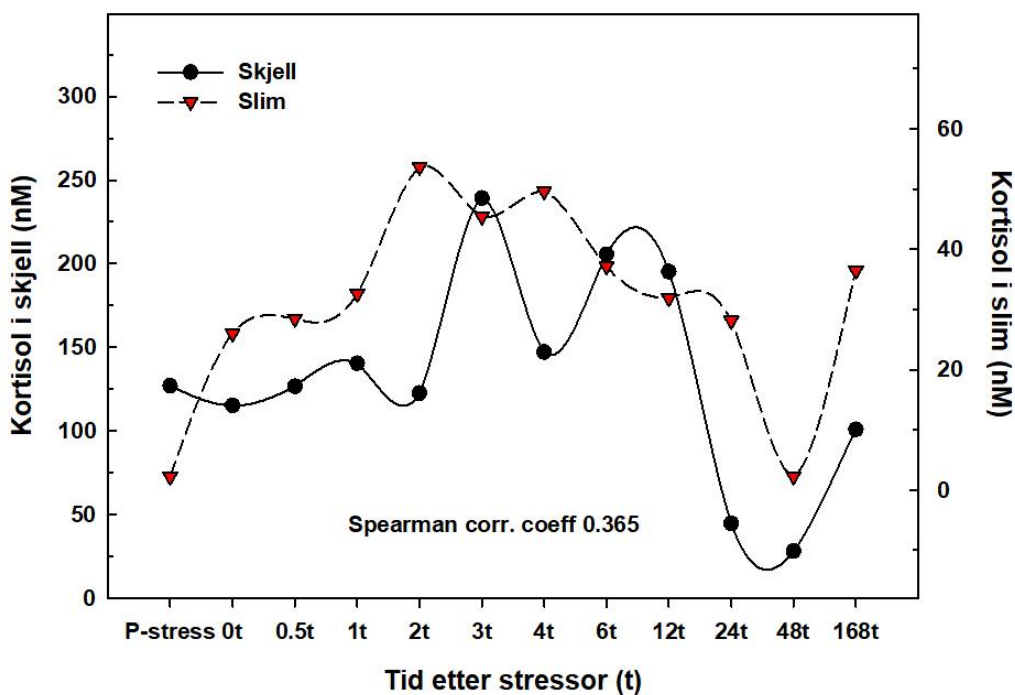
For å se om det var en sammenheng mellom de forskjellige prøvemetodene ble det brukt en korrelasjonsanalyse. Spearmans korrelasjonsanalyse av plasmakortisol og kortisol i slim viste en signifikant korrelasjon ($P < 0,001$; figur 13 og tabell 1) med en korrelasjonskoeffisient på 0,563. I tillegg viste analysen en signifikant korrelasjon mellom kortisol i slim og kortisol i skjell med en korrelasjonskoeffisient på 0,365 (figur 14 og tabell 1). Det ble ikke observert noen signifikant forskjell mellom plasmakortisol og kortisol i skjell (figur 12).



Figur 12. Ikke-lineær regresjon som viser sammenhengen mellom gjennomsnittsnivå av kortisol i plasma og skjell før og etter påført stressor. Spearman korrelasjonskoeffisient på 0.179.



Figur 13. Ikke-lineær regresjon som viser sammenhengen mellom gjennomsnittsnivå av kortisol i plasma og slim før og etter påført stressor. Spearman korrelasjonskoeffisient på 0.562 indikerer signifikant korrelasjon ($P < 0,001$).



Figur 14. Ikke-lineær regresjon som viser sammenhengen mellom gjennomsnittsnivå av kortisol i skjell og slim før og etter påført stressor. Spearman korrelasjonskoeffisient på 0.365 indikerer signifikant korrelasjon ($P < 0,001$).

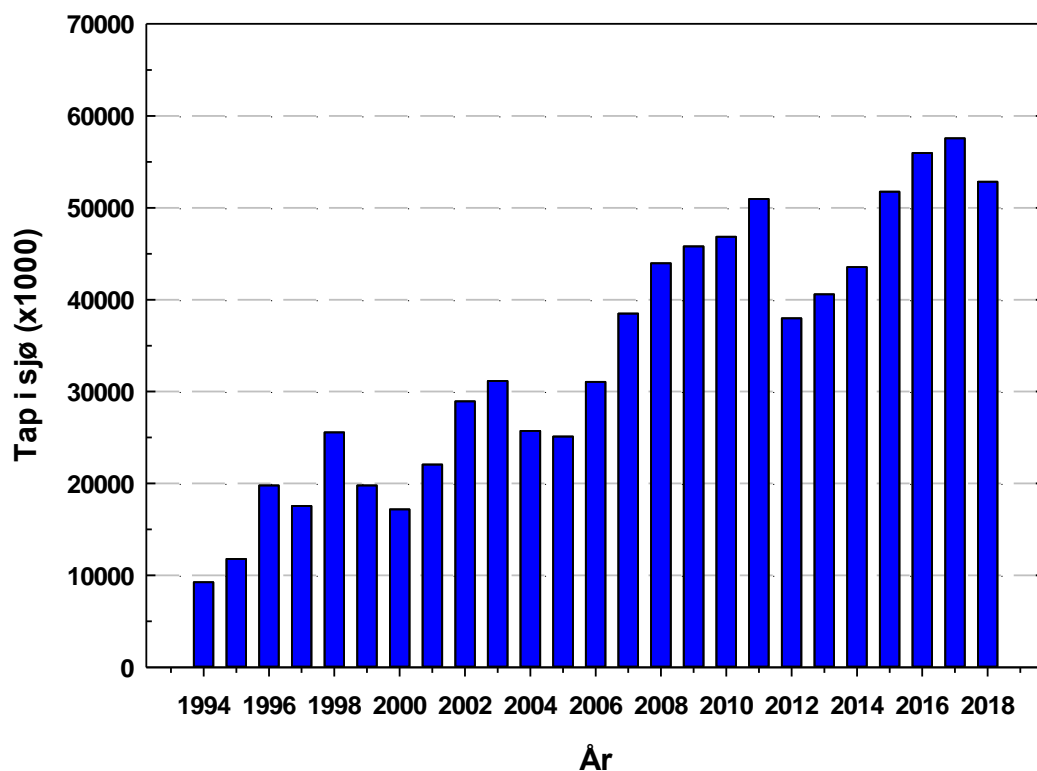
Tabell 1. Korrelasjon mellom kortisolkonsentrasjoner i plasma, slim og skjell.

Korrelasjoner				
			Slimkortisol	Skjellkortisol
Spearman's ρ	Plasmakortisol	Korrelasjonskoeffisient	0,562**	0,179
		Sig. (2-tailed)	0,000	0,126
		N	74	74
	Slimkortisol	Korrelasjonskoeffisient		0,365**
		Sig. (2-tailed)		0,001
		N		78

** , korrelasjonen er signifikant på 0,01 nivå (2-tailed)

4 Diskusjon

Verdiskapningen i havbruksnæringen er mangedoblet siden starten, og i dag er Norge den største produsenten av laks i verden. Til daglig står det rundt 400 millioner oppdrettslaks i norske oppdrettsmerder. I tillegg til disse blir det oppdrettet rundt 20 millioner regnbueørret og flere hundre tusen torsk og kveite (Grefsrud et al., 2019). Som verdens største produsent av laks er man opptatt av å forbedre produksjonsmetodene, både for å øke effektiviteten, sikre god kvalitet og bærekraft i næringen. Utprøving og testing av nye metoder og hjelpemidler er derfor sentralt for å øke kunnskapen og effektiviteten.



Figur 15. Tap av laks etter utsett i sjø (matfiskproduksjonen) i perioden 1994-2018 (FDIR, 2019)

Med en økende mengde oppdrettslaks i havet, har man også sett en økende tendens av dødelighet etter utsett i sjø (Figur 15). Dødeligheten gjennom produksjonen hos laks satt ut i sjø i 2016 var på 14 %, med variasjoner fra under 10 % til over 20 % mellom ulike produksjonsområder i Norge (Grefsrud et al., 2019). Et tap på dette nivået blir sett på som uakseptabelt og lite bærekraftig (Takle et al., 2015). Deler av denne dødeligheten kommer fra stressende håndteringsoperasjoner hvor fisken kan bli skadet og blir påført stress. Eksempler på slike operasjoner kan være rengjøring og skiftning av nøter, trenging, sortering, vaksineringsoperasjoner.

telling av lus og ulike avlusningsoperasjoner (Noble et al., 2018). Enkelte av disse håndteringsprosessene fører til at fisken blir eksponert for luft. Hvordan effekt lufteksponering har på fiskens velferd vet man lite om. Ferguson og Tufts (1992) gjorde et forsøk på å se om lufteksponering påvirket fisken mer enn kun utmattelse, og fant at fisk som ble utsatt for både utmattende trening og lufteksponering hadde høyere dødelighet enn fisk kun utsatt for utmattende trening. Siden fisk blir utsatt for lufteksponering flere ganger igjennom en produksjonssyklus, vil det være interessant å se nærmere på hvordan effekt dette har på fiskens velferd og stressrespons.

Som tidligere nevnt er kortisol en mye brukt biomarkør når man vil studere stress hos fisk. I hovedsak har kortisolnivåene i blodplasma blitt mest brukt for å se nærmere på fiskens primære stressrespons (Baker et al., 2013). På grunn av den invaderende formen for prøvetaking til disse analysene har det de siste årene vært et større fokus på andre metoder for prøvetaking (Ellis et al., 2013; Sadoul & Geffroy, 2019). Blant disse har det vært gjort flere forsøk med bruk av slim, og slim har vist seg å kunne være en god indikator på den akutte stressresponsen (De Mercado et al., 2018; Guardiola et al., 2016). I motsetning til den akutte stressresponsen mangler man i dag informasjon om hvordan man kan overvåke langsiktig aktivering av HPI-aksen, som går under betegnelsen kronisk eller maladaptivt stress. Dette er blitt studert av Aerts et al. (2015) og Carbajal et al. (2019) som begge så nærmere på mulighetene for å bruke kortisolkonsentrasjonen i skjell for å gi et bilde av kronisk stress.

4.1 Plasmakortisol

Basalnivåene av plasmakortisol før forsøksstart lå innenfor hva man betegner som normale basalnivå for plasmakortisol hos laks (Pickering & Pottinger, 1989; Wendelaar Bonga, 1997). Basalnivåer av plasmakortisol ligger som regel mellom 5 og 30 nM (Wendelaar Bonga, 2011). Etter at fisken i dette forsøket ble utsatt for lufteksponering og transport ble det observert en signifikant økning i plasmakortisol. Plasmakortisolens toppnivå ble observert en time etter påførte stressorer. Kortisolutskillelse starter omtrent fem minutter etter en akutt stressor, og nivået øker sakte til toppnivået er nådd, ca. en time etter akutt stressor (Wendelaar Bonga, 2011). Nivåene av plasmakortisol og hastigheten på responsen er sammenlignbare med andre undersøkelser (Espmark et al., 2015; Fast et al., 2008; Iversen et al., 2009; Iversen et al., 2005; Wendelaar Bonga, 2011). Det burde merkes at toppunktet til plasmakortisol etter stress kan komme senere. Pickering et al. (1982) så nærmere på håndteringsstress hos ørret (*Salmon*

trutta), og observerte et toppunkt to timer etter påført stressor. I likhet så Hatløy (2015) et toppunkt to timer etter trenging og transport hos Atlantisk laksesmolt.

Fast et al. (2008) så en økning av plasmakortisol hos Atlantisk laks etter 15 sekunder lufteksponering, noe som tyder på at selv lufteksponering over en kort periode kan ha en innvirkning på den primære stressresponsen. Dette ble også observert hos gullfisk utsatt for lufteksponering over lengre tid (tre minutter) (Cockrem et al., 2019). Tilsvarende viste en undersøkelse av Acerete et al. (2004) en signifikant økning (toppunkt) av plasmakortisol en halv time etter håndtering av abbor (*Perca fluviatilis*). I dette forsøket besto stressorene av håndtering, lufteksponering og transport i hurtig rekkefølge slik at den observerte kortisoltoppen er nok en kumulativ sum av alle stressorene, og en kan ikke skille alvorlighetsgraden mellom de ulike stressorene.

Gruppen i dette forsøket hadde en forhøyet konsentrasjon av kortisol, noe som indikerer at en belastning av HPI-aksen med etterfølgende primær stressrespons. En slik stressrespons er mest sannsynlig adaptiv, noe som betyr at fisken er i stand til å hente seg inn igjen etter en stressfull situasjon og opprettholde homeostase. En slik respons øker et individs sjanse til å overleve, og er ikke nødvendigvis farlig eller skadelig for individet (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997, 2011). Hvis stressresponsen strekkes ut over en lengre periode, eller utenfor de normale variasjonene innenfor kortisolkonsentrasjon kan responsen bli maladaptiv, og skadelig for individet (Pickering & Pottinger, 1989). I motsetning til andre undersøkelser (Fast et al., 2008; Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2009; Iversen et al., 1998), var plasmakortisol i dette forsøket fortsatt signifikant forhøyet 24 timer etter påført stressor. Plasmakortisol nærmet seg pre-stressnivåer 48 timer etter stressor, og var tilbake på dette nivået etter 168 timer. Dette kan tyde på at stressorene brukt i dette forsøket ble oppfattet som svært stressende, og hvis fisken hadde blitt utsatt for stress flere ganger, eller over en lengre periode, kunne stressresponsen gått over til en maladaptiv respons. Espmark et al. (2015) så nærmere på kortisolutskillelsen hos laksesmolt ved trenging i en og tre timer. De observerte at kortisolnivåene var tilbake til normalnivå etter seks timer når fisken var utsatt for en times trenging. For fisken som ble utsatt for trenging i tre timer var kortisolnivåene tilbake til normalnivå etter 20 timer. Dette tyder på at graden av stress har betydning for varigheten av stressresponsen, og det kan virke som at lufteksponering sammen med transport gir en høyere grad av stress enn det trenging alene gir. Tilvarende viste Acerete et al. (2004) at kortisolnivåene hos abbor var tilbake til normalnivå mellom syv og 14 dager etter håndtering og transport.

12 timer etter påført stressor var plasmakortisolkonsentrasjonen nede på pre-stressnivå, før det igjen var signifikant høyere enn pre-stress 24 timer etter stressor. Variasjoner av dette har tidligere blitt observert av blant annet Farbridge og Leatherland (1992), som så en lignende topp hos regnbueørret 8 timer etter påført stressor, og Iversen et al. (2009) som observerte det samme fenomenet hos Atlantisk laksesmolt 24 timer etter transport. Det kan være mange plausible forklaringer til dette fenomenet. En mulighet er at fisken er blitt forstyrret av en eller annen ukjent stressor i forsøkshallen under forsøk. Dette er lite sannsynlig da en hadde fullstendig adgangskontroll på forsøksfasiliteten. En mer sannsynlig forklaring er at dette er en sen effekt av en alvorlig stressrespons over tid, hvor HPI-aksen er «utslitt» etter langtidseksponering. Dessverre var ikke hvileperioden før forsøksstart gunstig, da det ble foretatt sprengninger i nærområdet (bygging av ny barne- og ungdomsskole) hver dag i en måned før oppstart av forsøket. Rystelsene var så kraftig at en kunne observere krysninger på overflaten av vannet etter hver eksplosjon. Ved en slik belastning over tid, vil en ofte se stor variasjon i basalnivåene av plasmakortisol, slik som ble dokumentert av Iversen og Eliassen (2014) hvor de stresset en gruppe fisk med sammentrening daglig i fire uker, for deretter å vaksinere laksesmolten. Denne fiskegruppen mistet kontrollen over reguleringen av basalnivåene av plasmakortisol med betydelige følger for fiskevelferden. Dette stresset kan også ha hatt betydning for at det tok lang tid før kortisol vare nede på pre-stressnivå.

4.2 Slim

Fiskens hud og slim utgjør den første forsvarslinje mot miljøet, og et sterkt ytre lag gir fisken et godt forsvar mot det ytre miljøet. Hos varmblodige organismer består hudlaget av døde, keratiniserte hudceller, men hos fisk er huden et levende multifuksjonelt og metabolsk aktivt organ (Takle et al., 2015). Fiskens hud gir både kjemisk og fysisk beskyttelse, og den er involvert i sensorisk og atferdsmessig aktivitet, hormonmetabolisme, ioneregulering og homeostatiske reaksjoner (Takle et al., 2015). Som en del av huden finner man også skjellene som gir styrke og hardhet samtidig som de virker som minerallagre (Takle et al., 2015).

Analyse av slim har blitt beskrevet som en effektiv måte å samle kortisolverdier pre- og post-stress hos forskjellige arter (Bertotto et al., 2010; De Mercado et al., 2018; Simontacchi et al., 2008). Selv om nivåene av kortisol i slim er mye lavere enn i plasma, opptil 35 ganger så lav i havabbor (*Dicentrarchus labrax*), har det blitt observert gode korrelasjoner mellom plasma- og slimkortisol hos flere arter (Bertotto et al., 2010; Simontacchi et al., 2008). Carbajal et al. (2019)

observerte en sterk korrelasjon ($r=0,70$) mellom plasmakortisol og kortisol i slim ved kortvarig stress hos regnbueørret. Det samme så Fernández-Alacid et al. (2019) hos ørnefisk (*Argyrosomus regius*) utsatt for tre minutt lufteksponering og jaging med håv. Dette forsøket understøtter disse resultatene, da en observerte en sterk korrelasjon mellom plasmakortisol og kortisol i slim ($r=0,562$), noe som forsterker hypotesen om at slim kan være en god ikke-invasiv indikator for stress hos fisk.

I dette forsøket ble det også observert en svak signifikant korrelasjon ($r=0,365$) mellom kortisol i slim og skjell. Det ville vært naturlig å tenke at korrelasjonen mellom slim og skjell skulle ha likheter med sammenhengen mellom plasma og skjell, men dette ble ikke observert. Tilsvarende viste Carbajal et al. (2019) en sterk korrelasjon ($r=0,73$) mellom kortisolnivået i slim og skjell hos ustresset regnbueørret (kontrollgrupper). Denne korrelasjonen ble ikke sett hos fisk utsatt for kronisk stress. Hvorfor en observerer dette resultatet er vanskelig å si, men det er mulig at en ser en svakere sammenheng i dette forsøket grunnet de akutte stressorene, og forstyrrelsene i forkant av forsøket. Det er nødvendig med mer forskning på hvordan kortisol diffunderer over fra blod til slim og skjell for å kunne beskrive denne sammenhengen nærmere.

I motsetning til blodplasma som nådde sitt toppunkt en time etter stressor, ser en at kortisolnivået i slim når sitt toppunkt to timer etter påført stressor. Dynamikken mellom plasmakortisol og slim varierer, og avhenger av fiskeart og type stressor. De Mercado et al. (2018) observerte høyeste kortisolverdi i slim direkte etter påført stressor (hypoksi) hos regnbueørret. Kortisol i slim var tilbake til pre-stressnivå en time etter påført stressor. Carbajal et al. (2019) konkluderte med at kortisol i slim egner seg best som analysemetode rett etter akutt aktivisering av HPI-aksen, og egner seg ikke hos fisk utsatt for kronisk stress. Stress kan påvirke strukturen og celledannelsingen i fiskens epidermis (Tacchi et al., 2015), noe som igjen kan føre til fysiske og biologiske forandringer i slimet (Shephard, 1994). Det er trolig på grunn av slike endringer man ikke ser noen sammenheng mellom plasmakortisol og kortisol i slim under kronisk stress (Carbajal et al., 2019). Easy og Ross (2010) målte et toppunkt tre timer etter lufteksponering hos Atlantisk laks, men det ble ikke foretatt noen målinger etter en eller to timer etter påført stress. Videre viste Khansari et al. (2018) på regnbueørret at et toppunkt for kortisol i slim ble nådd en time etter lufteksponering, en time etter vaksinerings, og seks timer etter vaksinerings og lufteksponering. I det samme forsøket så man et toppunkt seks timer etter lufteksponering, og en time etter vaksinerings og lufteksponering hos dorade (*Sparus urata*). Dette kan tyde på at utskillelsen av kortisol fra blod til slim varierer fra art til art. I

tillegg kan det virke som at stressoren benyttet spiller inn, og man kan tenke seg at graden av stress gjør utslag på kortisolkonsentrasjonen i slim.

Til forskjell fra dette forsøket observerte Guardiola et al. (2016) nedgang av kortisolkonsentrasjonen i slim hos dorade etter lufteksponering. Disse forskjellene kan være forårsaket av forskjellig fysiologisk respons mellom arter eller på grunn av måten eksperimentet ble gjennomført. Guardiola et al. (2016) tok prøvene rett etter påført stressor, og det er derfor en mulighet for at kortisol i plasma ikke har fått diffundert over i slim. I tillegg vet man at utskillelsen av kortisol til blod har en forsinkelsestid på rundt fem minutter (Wendelaar Bonga, 2011), og muligheten for at prøvene ble tatt for tidlig etter påført stressor, er til stedet. Guardiola et al. (2016) observerte i tillegg ingen økning i plasmakortisol etter lufteksponering, noe som også kan tyde på at prøvene ble tatt for tidlig. De Mercado et al. (2018) utsatte regnbueørret for stress ved hypoksi, hvor de tappet karet for halvparten av vannet, og fjernet lufttilførselen. Fisken ble holdt i 10 minutter med en oksygenkonsentrasjon mellom henholdsvis fire og to komma seks (2,6) ‰. I motsetning til Guardiola et al. (2016) observerte De Mercado et al. (2018) en signifikant økning av slimkortisol direkte etter påført stress (0 t), og kortisolnivåene var tilbake på pre-stressnivå etter en time. I dette forsøket ble det observert en ikke signifikant økning i kortisol direkte etter påført stressor (0 t), og en signifikant økning i både plasmakortisol og slimkortisol etter 30 minutter (0,5 t). Det er en mulighet for at forskjellen mellom forsøkene kommer av varigheten av stressoren, og styrken av stressoren opplevd av individene.

For å kunne bruke analyser av slim som en ny metode for å se nærmere på akutt stress er det viktig at kortisolnivåene reflekterer fiskens stressnivå, samt at metoden er mindre invaderende enn metodene som brukes i dag. Man vet at slim har en viktig funksjon i fiskens immunrespons (Patel et al., 2020), og det blir derfor viktig i framtidig forskning å se nærmere på de langsiktige effektene av å fjerne slim.

4.3 Skjell

Gjennom de siste årene har den akutte stressresponsen fått mye oppmerksomhet, men kronisk stress er mindre studert da metodene for å overvåke kronisk stress ikke er godt nok utviklet (Iversen & Eliassen, 2014). Schreck (2010) la vekt på at skillet mellom akutt og kronisk stress ikke er lett å påvise, overgangen er diffus og varierer mye i forhold til tid og rom. På grunn av dette er det viktig å få på plass en lett gjennomførbar, robust og vitenskapelig validert biomarkør for kronisk stress som fanger opp systematisk kortisoleksponering over lengre perioder (Aerts

et al., 2015). Plasmakortisol gir et bilde av stressbelastningen i nå-tid, og gir lite til ingen informasjon om nivået av stress fisk har opplevd gjennom dens levetid (Cook, 2012), det samme gjelder for andre medium brukt for å overvåke kortisolnivåene som slim, feces og vann. (Bertotto et al., 2010; Ellis et al., 2013; Simontacchi et al., 2008)

Aerts et al. (2015) gjorde et av de første forsøkene for å se nærmere på kortisolkonsentrasjon i skjell. Han påførte karpe (*Cyprinus carpio L.*) daglig stress i 42 dager ved hjelp av håving, lufteksposering, fall i temperatur, jaging med håv og sammentrenging. Han observerte ingen økning i plasmakortisol, og konkluderte med at plasma ikke er egnet som en metode for kronisk stress. I motsetning til dette har det tidligere blitt observert høyere basalnivåer av plasmakortisol hos Atlantisk laks utsatt for stress over tid (Iversen & Eliassen, 2012; Iversen & Eliassen, 2014). Under kronisk stress vil kortisolnivåene i plasma vanligvis stabilisere seg 2-5 ganger så høyt som basalnivåene (Wendelaar Bonga, 2011). Iversen og Eliassen (2012) så at basalnivå av plasmakortisol over 50 nM ga en økt sannsynlighet for dødelighet over 5 % etter utsett i sjø, i tillegg til 4,9 ganger større sjanse for å utvikle en sykdomsdiagnose etter utsett. Det ble observert en klar sammenheng mellom forhøyde basalnivåer av plasmakortisol og dødeligheten etter utsett. I tillegg observerte Varsamos et al. (2006) langsiktige effekter på stressresponsen og helsestatusen seks måneder etter en undersøkelse av stress i tidlig utviklingsfase hos havabbor (*Dicentrarchus labrax*). Med bakgrunn i dette kan man ikke utelukke at plasmakortisol kan være en egnet metode for vurdering av kronisk stress. Videre observerte Aerts et al. (2015) en signifikant økning av kortisol i skjell i stressgruppen etter 42 dager, noe som tyder på at skjell akkumulerer kortisol over tid. Det ble også funnet at det akkumuleres kortisol i regenererende skjell.

Stressende situasjoner over lengre tid kan føre til utmattelse av HPI-aksen, noe som er skyld i at utskillelsen av kortisol avtar eller øker. Dette har blitt sett ved påføring av flere stressorer over lengre tid av blant annet Pickering og Pottinger (1987) på ørret og regnbueørret, Bermejo-Nogales et al. (2014) på dorade og Iversen og Eliassen (2014) hos Atlantisk laks. Madaro et al. (2015) stresset fisk med forskjellige metoder tre ganger per dag, og plasmakortisol avtok jevnt over tid hos stresset fisk. Dette kan tyde på utmattelse av den endokrine stressaksen, og kan være grunnen til at Aerts et al. (2015) ikke observerte økning i plasmakortisol i sitt forsøk. Til sammenlikning bør det merkes at Iversen og Eliassen (2014) og Varsamos et al. (2006) observerte en økning i basalnivåene av plasmakortisol etter langtidseksponering av stress. Disse variasjonene i basalnivå trenger ikke å være motstridige, kronisk stress påvirker antageligvis

homeostasen til HPI-aksen, som kan gi seg uttrykk i både for lave og for høye basalnivå av plasmakortisol (Van den Heuvel et al., 2020). For eksempel endrer basalnivåene av kortisol seg fra høy til lav hos pasienter med posttraumatisk stresslidelse (PTSD), hvis lidelsen er henholdsvis akutt (naturkatastrofe, ulykker og lignende) eller langvarig (for eksempel seksuelle overgrep over en langtidsperiode) (Mason et al., 1986; Van den Heuvel et al., 2020). I dette forsøket ble fisken kun stresset en gang, og en ser signifikant økning i plasmakortisol.

I dette forsøket ser én et forhøyet kortisolnivå i skjellene pre-stress sammenliknet med plasma og slim. Det tyder på at fisken har akkumulert kortisol i skjellene før forsøket startet. Dette skyldes trolig sprengningsaktivitet som tidligere nevnt nært forsøksanlegget i ukene før forsøket, og dette er også grunnen til at forsøket ikke kunne gå over lengre tid enn 168 timer da sprengningen skulle gjenopptas. Selv om sprengningsaktiviteten ikke har vært ideelt for forsøket gir det en god indikasjon på at stress over tid, kan vises i skjellene.

På grunn av den forhøyede kortisolkonsentrasjonen i skjell hos fisk i pre-stressgruppen er det vanskelig å si noe om tiden det tar før man kan påvise økt kortisolkonsentrasjon etter påført stressor. I dette forsøket ble det observert en signifikant økning i skjellkortisol etter tre timer sammenliknet med pre-stress. Det er usikkert om denne økningen i kortisol kommer som et resultat av den akutte stressreaksjonen eller som et resultat av sprengningsaktiviteten ved forsøksanlegget i ukene før forsøksstart. I tidligere forsøk har den første økningen av kortisol i skjell blitt observert etter syv dager hos melkefisk (*Chanos chanos*) (Hanke et al., 2019) og gullfisk (*Carassius auratus*) (Laberge et al., 2019). Hanke et al. (2019) så en økning i skjellkortisol etter syv dager hvor temperaturen hadde blitt økt fra 26 til 33 °C i løpet av disse dagene. Denne økningen var ikke signifikant, men de så en signifikant økning av kortisol i regnerende skjell når melkefisken hadde stått med 33°C i 21 dager. Ontogenetiske skjell dannes i fiskens tidlige liv, mens regnerende skjell vokser tilbake hvis fisken skulle miste noen. Begge disse skjelltypene gir et tilbakeblikk på HPI-aksens aktivitet fra begynnelsen av skjellenes vekstfase til prøvetaking (Aerts et al., 2015). Kortisolnivåene i regnerende skjell representerer kun kortisol produsert i perioden fra skjellene begynte å vokse tilbake, og tar ikke hensyn til kortisolnivåene som var i de gamle skjellene før de ble fjernet (Aerts et al., 2015; Hanke et al., 2019). Med bakgrunn i dette kan det være mulig å benytte regnerende skjell for å se nærmere på HPI-aksens aktivitet i en mer avgrenset periode.

Det er kjent at steroidhormoner samler seg i inerte biologiske materialer, og man kan anta at skjell fanger opp sirkulerende steroider og frigjør dem saktere enn kortsiktige svingninger i sirkulerende plasmanivåer. Man kan tenke seg at skjell hos teleoster kan reflektere gjennomsnittlig steroidhormonnivå gjennom langsom, passiv diffusjonsutveksling med nærtsittende vev og blodsirkulasjonen (Laberge et al., 2019). Det har vist seg vanskelig å få tak i estimer av gjennomsnittlig, kronisk kortisolinnhold i villfisk, da stresshormonene øker raskt etter fangst (Pankhurst, 2011). Laberge et al. (2019) mente derfor at skjell bare kan være en nyttig indikator for kronisk stress om kortisolnivåene i skjellene ikke påvirkes av kortsiktige svingninger i plasma etter fangst. I likhet med resultatene funnet av Laberge et al. (2019) ser en heller ikke i dette forsøket en sammenheng mellom plasmakortisol og kortisol i skjell hos fisk utsatt for en akutt stressor. Dette blir også understreket hos Carbajal et al. (2019) som observerte at kortisol i skjell korrelerte bedre med plasmakortisol hos kronisk stresset fisk sammenlignet med kontrollgruppen.

Både Aerts et al. (2015) og Laberge et al. (2019) brukte destillert vann i skjellenes vaskeprosedyre. Denne metoden har blitt kritisert av Carbajal et al. (2018) som viste at vaskemetodene brukt spiller en rolle for bevaringen av kortisolkonsentrasjonen i skjellene. I denne artikkelen ble viktigheten av en vaskeprosedyre med 2-propanol fremhevet. Forsøket viste at 2-propanol eliminerte ekstern forurensing (kortisol i slim og vann) samtidig som den bevarte steroidinnholdet i matrisen. I likhet med hår vasket med vann (Hamel et al., 2011), kan det se ut som flere vask med vann kan fjerne endogent kortisol fra skjell (Carbajal, 2018). Med bakgrunn i dette er det en mulighet for at kortisolkonsentrasjonen i skjellene funnet av Laberge et al. (2019) hadde gitt et annet bilde ved bruk av 2-propanol i vaskeprosedyren. Som nevnt tidligere ble det observert en økning av kortisol i skjell i dette forsøket, men om dette er på grunn av den akutte stressresponsen eller tidligere stressfulle hendelser er vanskelig å si. Det er derfor et behov for flere studier hvor man ser nærmere på kortisolkonsentrasjonen i fiskeskjell ved akutt og kronisk stressbelastning.

Laberge et al. (2019) så nærmere på hvor på fiskens kropp skjellene hadde høyest kortisolkonsentrasjon. De observerte at skjellene rundt midtlinjen hadde den høyeste konsentrasjonen av kortisol, og foreslo at dette er på grunn av at den økte vaskularisering rundt midtlinjeregionen øker kortisolavsetningen fra blod til skjell. I dette forsøket ble skjellene samlet fra den dorso-laterale siden av fisken (figur 10), og det er mulig prøvene burde vært tatt rundt midtlinjen for å få de beste resultatene.

Kortikosteronnivåer i fjær (Romero & Fairhurst, 2016), i likhet med kortisolnivåer funnet i hår (Russell et al., 2012), synes å være «frosset i tid», og representerer perioden fjæren eller håret hadde aktiv vekst. I motsetning til disse resultatene tyder funn av Laberge et al. (2019) og denne undersøkelsen på at kortisolkonsentrasjonen i skjellene er dynamisk. Dette betyr at man trolig ikke kan bruke skjell til å se nærmere på kortisolutskillelsen til fisken over en livsperiode, men at den kan bli brukt til å vurdere kortisolutskillelsen over en kortere periode.

4.4 Hvordan tap av slim og skjell påvirker individet

For å kunne ta i bruk slim- og skjellprøver når man skal se nærmere på fiskens stressrespons, er det viktig å evaluere konsekvensene ved dette. Fiskens skjell fungerer som et skjold mot predatorer og parasitter, gir ekstern støtte til kroppen og er en viktig del av fiskens kamuflasje (Guerreiro et al., 2013). Huden er også individets førstebarriere mot infeksjoner, og selv en liten skade i hudlaget kan fungere som en inngang for infeksjon (Patel et al., 2020). I tillegg til dette kan noisiceptiorene i huden forårsake smerte, og i verste fall større sår som kan påvirke den osmoregulatoriske evnen (Noble et al., 2018). Konsekvensen av skjelltap kan være store for individene. Skjelltap involverer tap av epidermis, skjell og dermis. Det har blitt observert forstyrrelser i plasmaosmolalitet og natriumnivåer hos Atlantisk laks (Zydlewski et al., 2010) og kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Gadomski et al., 1994) ved fjerning av 10 % av individets skjell. Gadomski et al. (1994) observerte i tillegg en forhøyet konsentrasjon av plasmakortisol etter fjerning av skjell, med et toppunkt etter en time. Kortisolnivåene var tilbake til basalnivåer etter 12 timer. Bouck og Smith (1979) så nærmere på effektene av skjelltap hos coho-laks (*Oncorhynchus kisutch*), og så at fisk som hadde 10 % skjellavskrapning på kroppen hadde 50 % høyere dødelighet innen en periode på 10 dager ved overføring til saltvann. I det samme forsøket ble det også observert at fjerning av slim og skjell fra 25 % av kroppen ikke førte til forhøyet dødelighet i ferskvann, men en dødelighet på 75 % innen 10 dager i saltvann. Dette tyder på at skjellavskrapning vil være mer kritisk hos fisk som flyttes til sjøen. Tidspunktet for skjellprøver kan være essensielt for å opprettholde god velferd, og derfor vil det i videre forskning være interessant å se nærmere på hvilke tidspunkt i produksjonen som vil egne seg best for denne analysemetoden.

På grunn av skjellenes viktige rolle for vedlikeholdelse av hudens funksjon, vil det i løpet av noen uker bli dannet nye skjell dersom noen blir tapt (Ohira et al., 2007). Dersom forholdene ligger til rette, vil sårene leges raskt. Såret blir først dekket av slim, og deretter epitelceller (Quilhac & Sire, 1999). Det har tidligere blitt vist at det også er forskjeller mellom arter når det

kommer til tiden det tar å danne ny hud og skjell. Ohira et al. (2007) viste at dannelsen av nye skjell hos gullfisk tar et par uker. Prosessen av regenerering av skjell starter ved epiteldannelse og differensiering av skjelldannende celler (en til to dager), før produksjonen av ekstern matriks (dag tre til fem) og basalplatematriks (dag 6-14). Etter 14-28 dager vil skjellene forkalkes (Ohira et al., 2007). Hos laksefisk har det blitt vist at disse prosessene kan ta lengre tid. Hos regnbueørret var ikke huden fullstendig regenerert tre måneder etter sårskade, og skjellene var enda ikke tilbake ett år etter sårskade (Schmidt et al., 2016). Det bør merkes at Schmidt et al. (2016) så på dypere sår, og man ville trolig sett et annet resultat med mer overfladiske sår.

Skader på fiskens hud i oppdrettssammenheng stammer som regel fra håndtering, skarpe kanter i kar og merder, og aggresjon som kan komme av for høy tetthet eller underfôring (Noble et al., 2018). I tillegg til mekanisk belastning, er det en større påkjenning for hud og slimlag å bli eksponert for luft i forbindelse med lusetelling, sortering og vaksinerings (Takle et al., 2015). Bouck og Smith (1979) så ingen økt dødelighet i hverken ferskvann eller sjøvann etter 20% av slimet ble fjernet fra fisken. Sammenhengen av epidermal skade og velferd er tidligere blitt sett nærmere på av Noble et al. (2012b). Det ble påpekt at man ikke har sett en direkte sammenheng mellom hudskader og dødelighet, men en sammenheng mellom hudskader og infeksjoner som infeksjøs lakseanemi (Totland et al., 1996), vintersår (Løvoll et al., 2009) og piscirickettsiose (Smith et al., 1999). Det er en godt etablert sannhet at slimlaget hos fisk er viktig når det kommer til sykdomsmotstand, men det er lite forskning som har fokusert på konsekvensene av et ikke fullkomment slimlag (Svendsen & Bøggwald, 1997). Det er viktig at dette blir sett nærmere på før man tar i bruk slim som prøvemethode. Raj et al. (2011) viste at fjerning av slim kan føre til økt inntreden av Cyprinid herpesvirus 3 hos Karpe. Svendsen og Bøggwald (1997) så en signifikant forhøyet dødelighet hos små Atlantisk laks med et ikke intakt slimlag som ble utsatt for *Vibrio anguillarum* og *Aeromonas salmonicida*. Det er derfor interessant å se nærmere på konsekvensene av fjerning av slim for prøvetaking.

5 Konklusjon

Fordelene med å bruke slim og skjell over andre prøver er flere. Analyse av slim er en mindre invaderende prøvemethode sammenlignet med en blodprøve. Slimprøver er i tillegg lett å samle, samtidig som det er tidseffektivt. I tillegg kan det virke som at det er lettere å få et reelt bilde av basalnivå av kortisol i slim grunnet forsinkelsen ved utskillingen mellom blod og slim. Skjell kan også være en god prøvemethode, og skjellene vil trolig regenereres raskt etter fjerning. For å kunne bruke skjell er det viktig å se nærmere på å effektivere analyseprosessen slik at man kan fjerne så få skjell som mulig. Mengdene som ble benyttet i dette forsøket (300 mg) fjerner skjell fra et større område av fisken, og kan derfor føre til økt stress og derfor påvirke velferden til fisken. Hvis man får forbedret metodene slik at man trenger færre skjell, vil metoden muligens kunne være et godt hjelpemiddel for å se nærmere på langvarig stress i løpet av en produksjonssyklus.

Litteraturliste

- Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A., & Tort, L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237(1-4), 167-178. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.03.018
- Aerts, J., Metz, J. R., Ampe, B., Decostere, A., Flik, G., & De Saeger, S. (2015). Scales tell a story on the stress history of fish. *PLOS ONE*, 10(4). doi:10.1371/journal.pone.0123411
- Alsop, D., & Aluru, N. (2011). The Pituitary | Development of the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 1450-1456). San Diego: Academic Press.
- Baker, M. R., Gobush, K. S., & Vynne, C. H. (2013). Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. *Journal for Nature Conservation*, 21(5), 309-318. doi:10.1016/j.jnc.2013.03.003
- Barkowski, N. A., & Haukenes, A. H. (2014). Investigating the Utility of Measuring 11 α -Ketotestosterone and Vitellogenin in Surface Mucus as an Alternative to Plasma Samples in Assessments of the Reproductive Axis of White Bass. *North American Journal of Aquaculture*, 76(2), 112-118. doi:10.1080/15222055.2013.860066
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol*, 42(3), 517-525. doi:10.1093/icb/42.3.517
- Bermejo-Nogales, A., Nederlof, M., Benedito-Palos, L., Ballester-Lozano, G. F., Folkedal, O., Olsen, R. E., . . . Pérez-Sánchez, J. (2014). Metabolic and transcriptional responses of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to environmental stress: New insights in fish mitochondrial phenotyping. *General and Comparative Endocrinology*, 205, 305-315. doi:10.1016/j.ygcen.2014.04.016
- 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(2), 230-240. doi:10.1016/j.ygcen.2003.09.016
- Bernier, N. J., Flik, G., & Klaren, P. H. M. (2009). Regulation And Contribution Of The Corticotropic, Melanotropic And Thyrotropic Axes To The Stress Response In Fishes. In N. J. Bernier, G. Van Der Kraak, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds.), *Fish neuroendocrinology* (Vol. 28, pp. 235-311). London: Elsevier.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini, D., Radaelli, G., & Simontacchi, C. (2010). Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquaculture Research*, 41(8), 1261-1267. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02417.x
- Bortolotti, G. R., Marchant, T. A., Blas, J., & German, T. (2008). Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology*, 22(3), 494-500. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01387.x
- Bouck, G. R., & Smith, S. D. (1979). Mortality of Experimentally Descaled Smolts of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Fresh and Salt Water. *Transactions of the American Fisheries Society*, 108(1), 67-69. doi:10.1577/1548-8659(1979)108<67:MOEDSO>2.0.CO;2
- Boxaspen, K., Agnalt, A.-E., Gjørseter, J., Jørgensen, L. L., & Skiftesvik, A. B. (2005). *Kyst og havbruk 2005 (2/2005)*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11250/114112>
- Braithwaite, V. A., & Huntingford, F. A. (2004). Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Animal Welfare*, 13, 87-92.
- Broom, D. M. (2016). Fish brains and behaviour indicate capacity for feeling pain. *Animal Sentience*(10).

- Cao, Y., Tveten, A.-K., & Stene, A. (2017). Establishment of a non-invasive method for stress evaluation in farmed salmon based on direct fecal corticoid metabolites measurement. *Fish & Shellfish Immunology*, *66*, 317-324. doi:10.1016/j.fsi.2017.04.012
- Carbajal, A. (2018). *Cortisol in skin mucus and scales as a measure of fish stress and habitat quality*. (PhD in Animal Medicine), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Carbajal, A., Monclús, L., Tallo-Parra, O., Sabes-Alsina, M., Vinyoles, D., & Lopez-Bejar, M. (2018). Cortisol detection in fish scales by enzyme immunoassay: Biochemical and methodological validation. *Journal of Applied Ichthyology*, *34*(4), 967-970. doi:10.1111/jai.13674
- Carbajal, A., Reyes-López, F. E., Tallo-Parra, O., Lopez-Bejar, M., & Tort, L. (2019). Comparative assessment of cortisol in plasma, skin mucus and scales as a measure of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in fish. *Aquaculture*, *506*, 410-416. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.04.005
- Cockrem, J. F., Bahry, M. A., & Chowdhury, V. S. (2019). Cortisol responses of goldfish (*Carassius auratus*) to air exposure, chasing, and increased water temperature. *General and Comparative Endocrinology*, *270*, 18-25. doi:10.1016/j.ygcen.2018.09.017
- Cook, N. J. (2012). Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science*, *92*(3), 227-259. doi:10.4141/cjas2012-045
- Damsgård, B., Juell, J. E., & Braastad, B. O. (2006). *Welfare in farmed fish* (5/2006). Retrieved from Tromsø: <http://hdl.handle.net/11250/283476>
- De Mercado, E., Larrán, A. M., Pinedo, J., & Tomás-Almenar, C. (2018). Skin mucus: A new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture*, *484*, 90-97. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.10.031
- Duncan, I. J. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue scientifique et technique*, *24*(2), 483-492.
- Easy, R. H., & Ross, N. W. (2010). Changes in Atlantic salmon *Salmo salar* mucus components following short- and long-term handling stress. *Journal of Fish Biology*, *77*(7), 1616-1631. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02796.x
- Ellis, T., Berrill, I., Lines, J., Turnbull, J. F., & Knowles, T. G. (2012a). Mortality and fish welfare. *Fish Physiol Biochem*, *38*(1), 189-199. doi:10.1007/s10695-011-9547-3
- Ellis, T., James, J. D., Stewart, C., & Scott, A. P. (2004). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, *65*(5), 1233-1252. doi:10.1111/j.0022-1112.2004.00499.x
- Ellis, T., Sanders, M. B., & Scott, A. P. (2013). Non-invasive monitoring of steroids in fishes. *Veterinary Medicine Austria*, *100*(9-10), 255-269.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. M. (2012b). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol Biochem*, *38*, 163-188. doi:10.1007/s10695-011-9568-y
- Espmark, Å. M. O., Kolarevic, J., Aas-Hansen, Ø., & Nilsson, J. (2015). *Pumping og håndtering av smolt* (6/2015). Retrieved from <https://nofima.no/pub/1226450/>
- Esteban, M. Á. (2012). An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, *2012*. doi:10.5402/2012/853470
- Farbridge, K. J., & Leatherland, J. F. (1992). Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. *Fish Physiol Biochem*, *10*(1), 67-73. doi:10.1007/BF00004655
- Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., & Afonso, L. O. B. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-

- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(2), 194-204.
doi:10.1016/j.fsi.2007.10.009
- FDIR. (2019, 24.10.19). Laks, regnbueørret og ørret - matfiskproduksjon. Tap av laks, regnbueørret og ørret i produksjonen etter art og fylke. Retrieved from <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret/Matfiskproduksjon>
- Ferguson, R. A., & Tufts, B. L. (1992). Physiological Effects of Brief Air Exposure in Exhaustively Exercised Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications for "Catch and Release" Fisheries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(6), 1157-1162. doi:10.1139/f92-129
- Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Herrera, M., & Ibarz, A. (2019). Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress-attenuating diets: Correlations between plasma and mucus. *Aquaculture*, 499, 185-194. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.09.039
- Fraser, D., Weary, D. M., Pajor, E. A., & Milligan, B. N. (1997). A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Animal Welfare*, 6, 187-205.
- Fryer, J. N. (1989). Neuropeptides regulating the activity of goldfish corticotropes and melanotropes. *Fish Physiol Biochem*, 7(1), 21-27. doi:10.1007/BF00004686
- Gadomski, D. M., Mesa, M. G., & Olson, T. M. (1994). Vulnerability to predation and physiological stress responses of experimentally descaled juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Environmental Biology of Fishes*, 39(2), 191-199. doi:10.1007/BF00004937
- Grefsrud, E. S., Svåsand, T., Glover, K., Husa, V., Hansen, P. K., Samuelsen, O. B., . . . Stien, L. H. (2019). *Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2019 - Miljøeffekter av lakseoppdrett (2019-5)*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11250/2640589>
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., & Esteban, M. Á. (2016). Using skin mucus to evaluate stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 323-330. doi:10.1016/j.fsi.2016.11.005
- Guerreiro, P., Costa, R., & Power, D. (2013). Dynamics of scale regeneration in seawater- and brackish water-acclimated sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiol Biochem*, 39(4), 917-930. doi:10.1007/s10695-012-9751-9
- Gösta, S. (Producer). (u.å.). The fishes of Finland. [Illustrasjon] Retrieved from <http://www.luontoportti.com/suomi/no/kalat/laks-no>
- Hagen, I. J., Kusakabe, M., & Young, G. (2006). Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11 β -hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: Relationship with in vitro cortisol production. *General and Comparative Endocrinology*, 145(3), 254-262. doi:10.1016/j.ygcen.2005.09.014
- Halse, J. (2018). CRH. In Store Medisinske Leksikon. Retrieved from <https://sml.snl.no/CRH> Retrieved 16.10.18.
- Hamel, A. F., Meyer, J. S., Henchey, E., Dettmer, A. M., Suomi, S. J., & Novak, M. A. (2011). Effects of shampoo and water washing on hair cortisol concentrations. *Clinica Chimica Acta*, 412(3), 382-385. doi:10.1016/j.cca.2010.10.019
- Hanke, I., Ampe, B., Kunzmann, A., Gärdes, A., & Aerts, J. (2019). Thermal stress response of juvenile milkfish (*Chanos chanos*) quantified by ontogenetic and regenerated scale cortisol. *Aquaculture*, 500, 24-30. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.09.016
- Hatløy, T. (2015). *Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus-hypofyse-interrenalaksen, og dets betydning på dyrevelferden hos diploid og triploid atlantisk laksesmolt (Salmo salar L.)*. (Master), Universitetet i Nordland, Bodø. Retrieved from <https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2353116/Hatloey.pdf?sequence=1>

- Hauge, A. (2018). Feedback. In Store medisinske leksikon. Retrieved from <https://sml.snl.no/feedback> Retrieved 17.10.18.
- Huntingford, F. A., & Kadri, S. (2008). Welfare and Fish. In E. J. Branson (Ed.), *Fish Welfare* (pp. 19-31). United Kingdom: Blackwell Publishing
- 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 of the World Aquaculture Society*, *40*(2), 216-225. doi:10.1111/j.1749-7345.2009.00244.x
- Iversen, M., & Eliassen, R. A. (2012). *Stressovervåkning av settefiskproduksjonen i Mainstream Norway AS 2009-2011 : stresskartlegging av laksesmolt (Salmo salar L.), og effekten av stressreducerende tiltak på stressnivå, dyrevelferd og produksjonsresultatet* (Vol. 5/2012). Bodø: Universitetet i Nordland.
- 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*(2), 233-241. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02091.x
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., & Eliassen, R. A. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, *221*(1), 549-566. doi:10.1016/S0044-8486(03)00111-X
- 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*(1), 373-382. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.10.019
- Iversen, M., Finstad, B., & Nilssen, K. J. (1998). Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts. *Aquaculture*, *168*(1), 387-394. doi:10.1016/S0044-8486(98)00364-0
- Iversen, M. H. (2013). *Stress and its impact on animal welfare during commercial production of Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. (Doktorgradsavhandling, Universitetet i Nordland), Retrieved from <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/299967>
- Iversen, M. H., & Eliassen, R. A. (2014). The effect of allostatic load on hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar L.*). *Fish Physiol Biochem*, *40*(2), 527-538. doi:10.1007/s10695-013-9863-x
- Kersey, D. C., & Dehnhard, M. (2014). The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *General and Comparative Endocrinology*, *203*, 296-306. doi:10.1016/j.ygcen.2014.04.022
- Key, B. (2016). Why fish do not feel pain. *Animal Sentience*(3).
- Khansari, A. R., Balasch, J. C., Vallejos-Vidal, E., Parra, D., Reyes-López, F. E., & Tort, L. (2018). Comparative Immune- and Stress-Related Transcript Response Induced by Air Exposure and Bacterin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Mucosal Surfaces. *Frontiers in immunology*, *9*(MAY), 856. doi:10.3389/fimmu.2018.00856
- Laberge, F., Yin-Liao, I., & Bernier, N. J. (2019). Temporal profiles of cortisol accumulation and clearance support scale cortisol content as an indicator of chronic stress in fish. *Conservation Physiology*, *7*(1). doi:10.1093/conphys/coz052
- Lillehaug, A., Nygaard, S., Eggset, G., & Poppe, T. (1999). Vaksinasjon. In T. Poppe (Ed.), *Fiskehelse og fiske sykdommer* (pp. 292). Oslo: Universitetsforlaget.
- Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C. R., Tunsjø, H. S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H., & Grove, S. (2009). Atlantic salmon bath challenged with *Moritella viscosa* – Pathogen

- invasion and host response. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(6), 877-884. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.019
- Madaro, A., Olsen, R. E., Kristiansen, T. S., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Flik, G., & Gorissen, M. (2015). Stress in Atlantic salmon: response to unpredictable chronic stress. *J Exp Biol*, 218(16), 2538. doi:10.1242/jeb.120535
- Mason, J. W., Giller, E. L., Kosten, T. R., Ostroff, R. B., & Podd, L. (1986). Urinary free-cortisol levels in posttraumatic stress disorder patients. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 174(3), 145-149. doi:10.1097/00005053-198603000-00003
- Mellor, D. J., & Stafford, K. J. (2001). Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare. *Australian Veterinary Journal*, 79(11), 762-768. doi:10.1111/j.1751-0813.2001.tb10895.x
- Miller, W. L. (1988). Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews*, 9(3), 295-318. doi:10.1210/edrv-9-3-295
- 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(3), 211-268. doi:10.1023/a:1008924418720
- Noble, C., Berrill, I. K., Waller, B., Kankainen, M., Setälä, J., Honkanen, P., . . . Kadri, S. (2012a). A multi-disciplinary framework for bio-economic modeling in aquaculture: a welfare case study. *Aquaculture Economics & Management*, 16(4), 297-314. doi:10.1080/13657305.2012.729250
- Noble, C., Cañon Jones, H. A., Damsgård, B., Flood, M. J., Midling, K. Ø., Roque, A., . . . Cottee, S. Y. (2012b). Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish Physiol Biochem*, 38(1), 61-83. doi:10.1007/s10695-011-9557-1
- Noble, C., Nilsson, J., Stion, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J., & Gismervik, K. (2018). *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*. In (pp. 328). Retrieved from <https://nofima.no/wp-content/uploads/2016/06/Velferdsindikatorer-for-oppdrettslaks-2018.pdf>
- Nærings- og Fiskeridepartementet. (2015). *Forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett*. (Meld. st. 16 (2014-2015)). Retrieved from <https://www.regjeringen.no/contentassets/6d27616f18af458aa930f4db9492f5e5/no/pdfs/stm201420150016000dddpdfs.pdf>
- Ohira, Y., Shimizu, M., Ura, K., & Takagi, Y. (2007). Scale regeneration and calcification in goldfish *Carassius auratus* : quantitative and morphological processes. *Fisheries Science*, 73(1), 46-54. doi:10.1111/j.1444-2906.2007.01300.x
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y., & Skjermo, J. (2012). *Verdiskapning basert på produktive hav i 2050*. Retrieved from https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri_og_havbruk/publikasjoner/verdiskapning-basert-pa-produktive-hav-i-2050.pdf
- Pankhurst, N. W. (2011). The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 265-275. doi:10.1016/j.ygcen.2010.07.017
- Patel, D. M., Kitani, Y., Korsnes, K., Iversen, M. H., & Brinchmann, M. F. (2020). A Truncated Galectin-3 Isolated from Skin Mucus of Atlantic Salmon Binds to and Modulates the Proteome of the Gram-Negative Bacteria. *Marine drugs*, 18(2). doi:10.3390/md18020102
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1987). Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *Journal of Fish Biology*, 30(3), 363-374. doi:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05761.x

- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*, 7(1), 253-258. doi:10.1007/BF00004714
- Pickering, A. D., Pottinger, T. G., & Christie, P. (1982). Recovery of the brown trout, *Salmo trutta L.*, from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology*, 20(2), 229-244. doi:10.1111/j.1095-8649.1982.tb03923.x
- Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., & Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13(1), 29-49. doi:10.1007/s10499-004-9035-1
- Quilhac, A., & Sire, J. Y. (1999). Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a Cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Anatomical Record*, 254(3), 435-451. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(19990301)254:3<435::AID-AR15>3.0.CO2-D
- Raj, V. S., Fournier, G., Rakus, K., Ronsmans, M., Ouyang, P., Michel, B., . . . Vanderplasschen, A. (2011). Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. *Veterinary Research*, 42(1), 92. doi:10.1186/1297-9716-42-92
- Romero, L. M., & Fairhurst, G. D. (2016). Measuring corticosterone in feathers: Strengths, limitations, and suggestions for the future. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 202, 112-122. doi:10.1016/j.cbpa.2016.05.002
- Rose, J. D. (2002). The Neurobehavioral Nature of Fishes and the Question of Awareness and Pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10(1), 1-38. doi:10.1080/20026491051668
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589-601. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
- Sadoul, B., & Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, 94(4), 540-555. doi:10.1111/jfb.13904
- Schmidt, J. G., Andersen, E. W., Ersbøll, B. K., & Nielsen, M. E. (2016). Muscle wound healing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 48, 273-284. doi:10.1016/j.fsi.2015.12.010
- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 549-556. doi:10.1016/j.ygcen.2009.07.004
- Schönbörner, A., Boivin, G., & Baud, C. (1979). The mineralization processes in Teleost fish scales. *Cell and Tissue Research*, 202(2), 203-212. doi:10.1007/BF00232235
- Shephard, K. L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(4), 401-429. doi:10.1007/BF00042888
- Simontacchi, C., Poltronieri, C., Carraro, C., Bertotto, D., Xiccato, G., Trocino, A., & Radaelli, G. (2008). Alternative stress indicators in sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *Journal of Fish Biology*, 72(3), 747-752. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01717.x
- Sire, J.-Y., & Akimenko, M.-A. (2004). Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio reiro*). *The International Journal of Developmental Biology*, 48, 233-247. doi:10.1387/ijdb.15272389
- Smith, P. A., Pizarro, P., Ojeda, P., Contreras, J., Oyanedel, S., & Larenas, J. (1999). Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37(3), 165-172. doi:10.3354/dao037165
- Sneddon, L. U. (2003). The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*, 83(2), 153-162. doi:10.1016/S0168-1591(03)00113-8

- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1987). *Introduction to biostatistics*. New York: Freeman.
- Statistisk sentralbyrå. (2019, 24. oktober). Nytt toppår for oppdrettslaks. Retrieved from <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/nytt-toppar-for-oppdrettslaks>
- Stien, L. H., Bracke, M. B. M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., . . . Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5(1), 33-57. doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01083.x
- Sumpter, J. P. (1997). The endocrinology of stress. In G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, & C. B. Schreck (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture* (Vol. 62). Cambridge: Cambridge University Press.
- Svendsen, Y. S., & Bøgwald, J. (1997). Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(5), 317-325. doi:10.1006/fsim.1997.0087
- Tacchi, L., Lowrey, L., Musharrafieh, R., Crossey, K., Larragoite, E. T., & Salinas, I. (2015). Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 435, 120-127. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.09.027
- Takle, H., Ytteborg, E., Nielsen, K. V., Karlsen, C. R., Sveen, L., Colquhoun, D., . . . Nilsen, A. (2015). *Sårproblematikk og hudhelse i laks- og regnbueørrettoppdrett* (5/2015). Retrieved from Tromsø: <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900989>
- Totland, G. K., Hjeltnes, B. K., & Flood, P. R. (1996). Transmission of infectious salmon anaemia (ISA) through natural secretions and excretions from infected smolts of Atlantic salmon *Salmo salar* during their presymptomatic phase. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26(1), 25-31. doi:10.3354/dao026025
- Van den Heuvel, L. L., Stalder, T., du Plessis, S., Suliman, S., Kirschbaum, C., & Seedat, S. (2020). Hair cortisol levels in posttraumatic stress disorder and metabolic syndrome. *Stress*, 1-13. doi:10.1080/10253890.2020.1724949
- Varsamos, S., Flik, G., Pepin, J. F., Bonga, S. E. W., & Breuil, G. (2006). Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(1), 83-96. doi:10.1016/j.fsi.2005.04.005
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol Rev*, 77(3), 591-625. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591
- Wendelaar Bonga, S. E. (2011). *Hormonal Responses to Stress* (Vol. 2). San Diego, USA: Academic Press.
- Zydlewski, J., Zydlewski, G., & Danner, G. R. (2010). Descaling Injury Impairs the Osmoregulatory Ability of Atlantic Salmon Smolts Entering Seawater. *Transactions of the American Fisheries Society*, 139(1), 129-136. doi:10.1577/T09-054.1