

MASTEROPPGAVE

Emnekode: AK306F

Navn på kandidat: Benedikte Hokland Ottestad

Effekten av lufteksponering og trenging på primære og sekundære stressresponser hos atlantisk laksesmolt (*Salmo salar* L.)

Dato: 29.05.2020

Totalt antall sider: 40

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	i
Forord	iii
Sammendrag	iv
Summary	v
1.0 Innledning.....	1
1.1 Dyrevelferd og fisk.....	2
1.2 Stress	4
1.2.1 stressrespons.....	4
1.2.2 Allostase	5
1.3 Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis (HPI-aksen)	6
1.3.1 CRH/CRF og den hypothalamiske kontroll av ACTH.....	8
1.3.2 Adrenokortikotropisk hormon ACTH.....	8
1.3.3 Kortisol som stressindikator.....	9
1.4 Stressorer	9
1.4.1 Lufteksponering	9
1.4.2 Transport	10
1.5 Hensikten med denne studien.....	11
2.0 Material og metode.....	12
2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk	12
2.2 Forsøksfisk og forhold	12
2.3 Pre-stress og forsøksoppsett	12
2.3.1 Prøvetaking.....	13
2.4 Analytiske prosedyrer	13
2.4.1 ACTH.....	13
2.4.2 Plasma kortisol	14
2.4.3 Laktat, glukose og hemoglobin	15
2.5 Statistisk analyse	15
3.0 Resultater.....	16
3.1 Primær stressrespons	16
3.1.1 Plasmakortisol	16
3.1.2 ACTH.....	17
3.2 Sekundære stressresponser	17
3.2.1 Glukose.....	17
3.2.2 Laktat.....	18
3.2.3 Hemoglobin.....	18
4.0 Diskusjon.....	20
4.1 Akvakultur og stress.....	20
4.2 Primære stressresponser hos laksesmolt	21
4.3 Sekundære stressresponser hos laksesmolt	23
4.3.1 Glukose.....	23

4.3.2 Laktat.....	24
4.3.3 Hemoglobin.....	25
5.0 Konklusjon	27

Forord

Denne oppgaven teller 60 studiepoeng, og er en del av kravet for å oppnå Mastergrad i Akvakultur ved Fakultetet for biovitenskap og akvakultur ved Nord Universitet.

Først og fremst vil jeg takke veileder Martin Haugmo Iversen, du har lært meg utrolig mye, gitt meg gode tilbakemeldinger på arbeidet jeg har gjort, og jeg har hatt stor glede av å følge dine forelesninger gjennom dette studieforløpet.

Jeg vil også takke Deepti Manjari Patel, for god opplæring og hjelp til analysearbeid på laboratoriet. Du har virkelig stått på for å hjelpe til. Takk til Roald Jacobsen og Bjørnar Eggen for hjelp under forsøket, og takk til Ole Troland og Onkel Einar for hjelp til siste finpuss på oppgaven.

Så må jeg også få takke Salmon Center Bodø og Monica Nilsen for at jeg har fått lov å sitte her og ferdigstille masteroppgaven min, siden universitetet har vært stengt som følge av koronapandemien.

Til slutt vil jeg vise enorm stor takknemlighet til mine medstudenter Vilde Charlotte Alsos og Brandon Robert Garcia. Uten dere hadde jeg ikke kommet meg igjennom dette studiet på en så morsom, lærerik og minnerik måte. På masterrommet har vi hatt det mye gøy, vi har hatt frustrerende og hektiske dager, samt utallige koselige lunsjer sammen. Selv med korona og andre utfordringer vi har møtt på veien, har vi klart å motivere og oppmuntre hverandre.

Nord Universitet, Bodø

29.05.2020

Benedikte Hokland Ottestad

Sammendrag

Å drive oppdrett med god fiskevelferd er viktig, da det er en forutsetning for å oppnå blant annet god fiskehelse og lav dødelighet. En faktor som har mye å si for fiskevelferden er stress. At en fisk blir stresset i løpet av en produksjonssyklus er en selvfølge. Stress er en naturlig respons for at fisken skal kunne respondere og tilpasse seg stressorer den måtte oppleve, og er avgjørende for overlevelse. Dette kan være prosesser som vaksinerings, sortering, transport, overføring til sjøvann, lusetelling, lusebehandling og slakt. Stress fører blant annet til utskillelse av kortisol. Det er hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen (HPI-aksen) som stimulerer kortisolutskillelsen, som er en av de primære stressresponsene. Denne vil igjen kunne føre til sekundære stressrespons, som omfatter metabolske, cellulære, osmoregulatoriske og hematologiske endringer, som er fysiologiske tilpasninger.

I dette forsøket ble det sett på hvilken effekt en sammensatt stressor av lufteksponering, sammentrenging og transport har på de primære og sekundære stressresponsene. Resultatene viste forhøyede verdier både hos plasmakortisol og plasma-ACTH (primære). Plasmakortisol viste signifikante forhøyede verdier til pre-stress 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 og 24 timer etter stress, og var tilbake til pre-stressnivå 168 timer etter stress. Det var også et dropp i plasmakortisol 12 timer etter stress, før den økte igjen. Dette kan være et resultat av en «utslitt» HPI-akse som fører til en sen effekt på stressresponsen. Plasma-ACTH viste forhøyede verdier allerede pre-stress, men ingen signifikante forskjeller ble funnet sammenlignet med pre-stress. De sekundære stressindikatorer som ble målt var glukose, laktat og hemoglobin i blodet. Alle viste signifikante forskjeller fra pre-stress, men bare laktat og hemoglobin korrelerte med plasmakortisol. Disse resultatene indikerer en kraftig primær og sekundær stressrespons, og man kan anta en redusert velferd for fisken.

Summary

Fish farming with good fish welfare is important as it is a prerequisite for achieving good fish health and low mortality. A factor that says a lot about fish welfare is stress. That a fish is stressed during a production cycle is a matter of course. Stress is a natural response for the fish to respond and adapt to the stressors it may experience and is crucial for survival. These can be processes such as vaccination, sorting, transport, seawater transfer, lice counting, lice treatment and slaughter. Stress causes, among other things, secretion of cortisol. It is the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPI) axis that stimulates cortisol secretion, which is one of the primary stress responses. This could in turn lead to secondary stress responses, which include metabolic, cellular, osmoregulatory and hematological changes, which are physiological adaptations.

In this experiment, we looked at the effect of a compound stressor of air exposure, confinement and transport on the primary and secondary stress responses. The results showed elevated values in both plasma cortisol and plasma ACTH (primary). Plasma cortisol showed significant pre-stress values at pre-stress 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 24 hours after stress, and returned to pre-stress level 168 hours after stress. There was also a drop in plasma cortisol 12 hours after stress, before increasing again. This may be the result of a "worn out" HPI axis leading to a late effect on the stress response. Plasma ACTH already showed elevated values pre-stress, but no significant differences were found compared with pre-stress. The secondary stress indicators that were measured were glucose, lactate and hemoglobin in the blood. All showed significant differences from pre-stress, but only lactate and hemoglobin correlated with plasma cortisol. These results indicate a strong primary and secondary stress response, and one can assume a reduced welfare for the fish.

1.0 Innledning

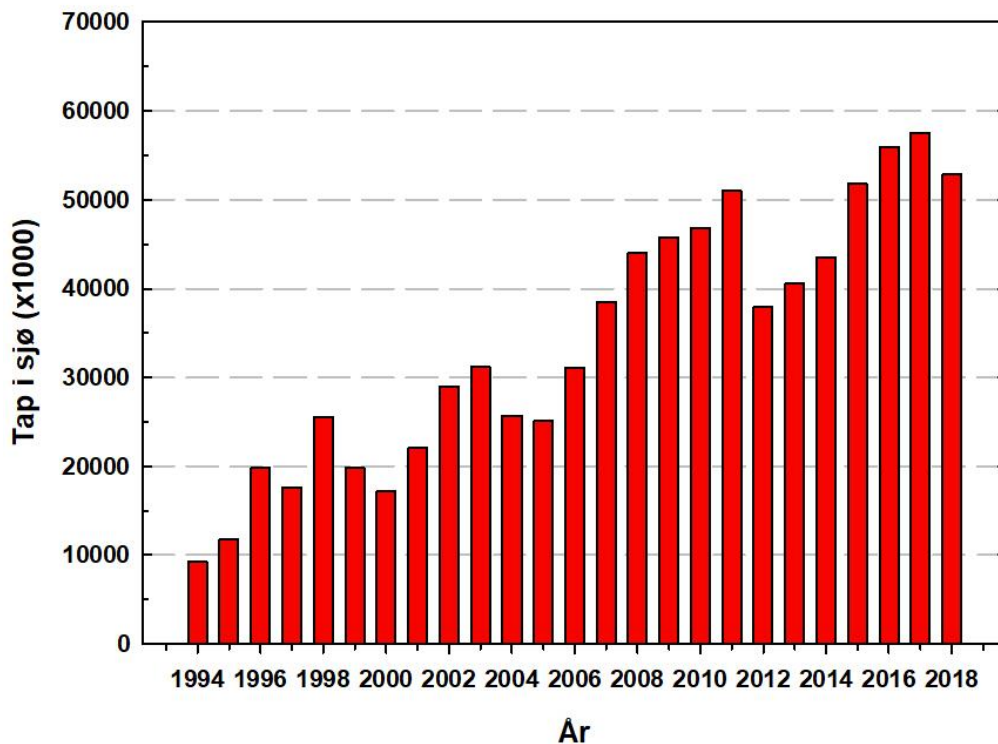
Jorden står i dag ovenfor flere sammensatte utfordringer rundt klima og miljø, økonomi, og sosiale forhold. Samtidig står vi ovenfor et presset mat- og ernæringsbehov for en voksende befolkning, med begrensede naturressurser. Fiskeri og havbruk er en viktig bidragsyter til verdens velvære og velstand. I løpet av de siste fem tiårene har verdensforsyningen med fiskemat overgått den globale befolkningsveksten, og overskredet kjøttproduksjon fra alle landdyr til sammen. Dette gjør fisk en viktig kilde til næringsrik mat og animalske proteiner for de fleste av verdens befolkning (FAO, 2018).

Fiskeri og akvakultur forsynte verden med 171 millioner tonn fisk i 2016. Av dette utgjorde akvakultur, 47 prosent av totalen, eller 53, hvis man ikke inkluderer fisk som går til ikke-matproduksjon, som produksjon av fiskemel og fiskeolje. Akvakulturæringen har hatt en imponerende vekst, mens fiskerinæringen har stått relativt stille siden slutten av 1980-tallet, og siden 2014 har konsumet av fisk fra akvakultur overgått fisk fra fiskerinæringen. Det er forespeilet at akvakultur vil stå for 60 prosent av all matfiskproduksjonen innen 2030 (FAO, 2018).

Den totale førstesalgsværdien fra fiskeri og akvakulturproduksjon i 2016 var estimert til 362 milliarder dollar (USD) hvor 232 milliarder dollar (USD) var fra akvakultur. Den globale akvakulturproduksjonen (inkludert akvatiske planter) var i 2016 på 110,2 millioner tonn, med en førstehandsverdi estimert til 243,5 milliarder dollar (USD). Etter Kina, er Norge den nest største eksportøren av fisk og fiskeprodukter. Norge har opprettholdt en stor fiskeflåte som fisker torsk, sild, makrell og annen hvitfisk, samt små pelagiske arter. Norge har også utviklet en omfattende oppdrettssektor for laksefisk (FAO, 2018). I 2019 eksporterte Norge 1,1 millioner tonn laks til en verdi av 72,5 milliarder NOK (Norges Sjømatråd, 2020).

Selv om akvakulturproduksjonen har blitt Norges nest største eksportnæring, etter olje og gass, har næringen sine utfordringer. Den er sårbar for sykdommer og ugunstige miljøforhold. Sykdomsutbrudd de siste årene har påvirket oppdrettslaks (Atlantisk laks) i Chile, østers i Europa og marint rekeoppdrett i flere land i Asia, Sør-Amerika og Afrika. Dette har ført til delvis eller noen ganger totalt produksjonstap (FAO, 2018). I Norge ser sykdomssituasjonen ut til å være stabil og under kontroll. De siste årene har i midlertidig laksenæringen vært under offentlig oppmerksomhet på grunn av den negative innvirkningen næringen har på villaksen gjennom rømming og lakselus. Det stilles også spørsmål knyttet til dyrevelferd og miljøpåvirkning i havbruksnæringen (Havforskningsinstituttet, 2019).

Siden 2002 har dødeligheten på laks i norsk havbruk vist en nedgående trend. Den har gått fra 20 prosent til ca. 15,4 prosent for den siste årsklassen laks (Fiskeridirektoratet, 2003, 2019; Kvistad, 2018). Ifølge Kvistad (2018) i Sjømat Norge, har dødelighet etter utsett vist en nedgående trend, mens frekvensen av dødfisk (antall, se figur 1) har økt senere i produksjonssyklusen. Dette kan relateres til effekten av håndtering av fisken sammen med forekomst av lakselus og sykdom som pankreassykdom (PD). Næringen har hatt en eventyrlig utvikling, men har fortsatt behov for å forbedre seg for å bli bedre på miljøutfordringer som lus, rømming, bruk av marine ingredienser til fôrproduksjon, fiskehelse og fiskevelferd (Statsminister, 2018).



Figur 1. Tap i sjø (antall) i perioden 1994 til 2018 (FDIR., 2019b)

1.1 Dyrevelferd og fisk

Å drive oppdrett med god fiskevelferd er viktig, da det er en forutsetning for å oppnå god fiskehelse og lav dødelighet, samtidig som det fører til en god kvalitet, godt omdømme og god lønnsomhet for oppdretterne. I Noble et al. (2018) beskriver de god velferd som å sørge for god behandling av dyret, og at dyret har en god opplevelse av livet. Mennesker ønsker ikke å se dyr lide eller bli utsatt for grusomheter, da dette blir sett på som uetisk og galt. Mellom vitenskapen og samfunnet generelt er det lite enighet om hva god dyrevelferd innebærer. Siden det mangler klarhet rundt begrepet, kan håndhevelse og oppfyllelse av dyrevelferd bli vanskelig å

gjennomføre. Ulike syn på dyrevelferd i ulike samfunnslag er ikke uvanlig (Noble et al., 2018), og begrepet brukes på mange forskjellige måter av mennesker med ulik vitenskapelig og ikke-vitenskapelig bakgrunn (Huntingford og Kadri, 2008).

Velferd er et betent tema, og stiller politiske spørsmål til hva er naturen, har dyr følelser, og om de føler smerte? (Iversen og Eliassen, 2012). Det er flere som har forsøkt å lage en felles forståelse for hva dyrevelferd er, og ved å identifisere de tre største vitenskapelige filosofier har Fraser et al. (1997) forsøkt å lage en tilnærming til begrepet dyrevelferd. Disse tre var; dyr skal leve «naturlige» liv (økofilosofi), dyr skal ha det bra (moraletikk), og dyr skal fungere bra (biologi, fysiologi).

Huntingford og Kadri (2008) har kommet med en annen tilnærming for å konkludere når dyr har god velferd. Disse tre punktene går ut på at: 1) dyret er tilpasset miljøet, med alle sine biologiske systemer i funksjon; 2) dyret lever et naturlig liv, med muligheten til å uttrykke sin adferd som den ellers ville ha gjort i det fri; og 3) dyret må ikke utsettes for negative opplevelser som smerte, frykt eller sult, og må ha tilgang til de positive opplevelsene som sosiale interaksjoner med artsfrender. Mellor og Stafford (2001) har også foreslått en mer praktisk tilnærming som består av fem områder/domener, hvor det kan skilles mellom god og dårlig dyrevelferd. Disse kalles «de fem frihetsgrader», og sier dyr skal være fri fra: 1. sult og tørst, 2. skadelig miljøskifter, 3. sykdom og skader, 4. adferdsrestriksjoner (inkludert plassmangel), og 5. mentale (psykiske) lidelser. Denne tilnærmingen blir i dag brukt inne lovgivning i flere land, og i det praktiske arbeidet som omhandler dyr (Fraser et al., 1997; Huntingford og Kadri, 2008; Mellor og Stafford, 2001).

Konseptet dyrevelferd har vært tatt i bruk for de dyrene som blir sett på som om at har evnen til å oppleve smerte, frykt og lidelse, og som derfor har blitt assosiert med arter med et høyere konjunktiv nivå, sammenlignet med fisk. (Ashley, 2007). Det foregår en vitenskapelig debatt om fisk kan oppleve smerte og frykt (Arlinghaus et al., 2009). Flere grupper mener fisk ikke er kapabel til å føle smerte, og disse gruppene hevder fisk mangler essensielle hjerneområder eller noen funksjonelt ekvivalenter sammenlignet med pattedyr (Rose, 2002). I motsetning antyder andre at det finnes anatomiske, fysiologiske og atferdsmessige bevis som gjør det tenkelig at fisk har potensialet til å oppleve lidelse i form av smerte og frykt gjennom forskjellige nociceptorer (Chandroo et al., 2004a; Chandroo et al., 2004b; Ellis et al., 2012; Lund et al., 2007; Sneddon, 2006) Dette har gjort det komplisert og omstridt å inkludere fisk under begrepet dyrevelferd og under «de fem frihetsgradene». I dag går fisk under Dyrevelferdsloven (2009),

som blant annet sier i §3 at dyr har egenverdi uavhengig av nytteverdien for mennesker, de skal behandles godt og beskyttes mot fare for unødvendige påkjenninger og belastninger.

1.2 Stress

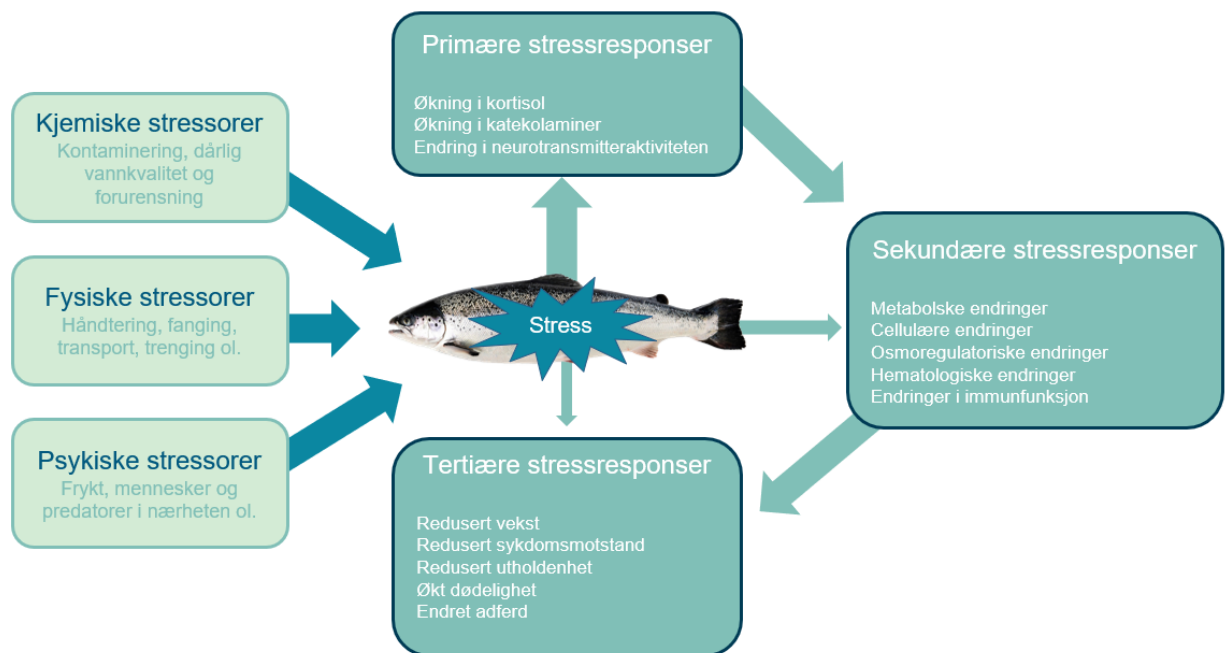
En faktor som har mye å si for fiskevelferden er stress. Begrepet stress kan defineres som en tilstand hvor homeostasen er truet eller forstyrret gjennom interne eller eksterne stimuli, definert som stressorer (Wendelaar Bonga, 2011). Homeostase er når de fysiologiske systemene, som er avgjørende for å leve, er i balanse eller i likevekt. Dette kan være systemer for pH-balanse, kroppstemperatur, glukosenivåer og oksygen (McEwen og Wingfield, 2003).

Stress er ikke til å unngå i naturen, og fiskens evne til å respondere og tilpasse seg når de bli utsatt for en stressor er avgjørende for overlevelse. Fisk reagerer på endringer i ytre og indre miljø ved å frigjøre hormoner i blodet. Rytmiske forandringer som dagslys og andre daglige rutiner, blir møtt med justeringer som opprettholder den dynamiske fysiologiske likevekten til en organisme (homeostase) (Wendelaar Bonga, 2011). Alle dyr vil også bli utsatt for store og uforventede endringer, som plutselig temperaturopp, møte med predatorer og dominante artsfrender, og forurensninger. Disse kan true fiskens velvære og overlevelse for dyret (Wendelaar Bonga, 2011). For å kunne opprettholde sin indre likevekt etter en stressor, må fisken ha en rekke adaptive mekanismer (Iversen, 2013; Iversen og Eliassen, 2014; Schreck, 2010; Wendelaar Bonga, 2011). Disse adaptive mekanismene er med på å tilpasse og overvinne stressoren, som fører til opprettholdt likevekt (homeostase). Vanlige stressorer for fisk i akvakultur er håndtering, håving, transport, vaksinerings og trenging (Iversen og Eliassen, 2014).

1.2.1 stressrespons

Stressresponsen hos fisk resulterer i en primær stressrespons som deles inn i to kategorier. Den ene er økt produksjon av katekolaminer (CA) adrenalin og noradrenalin, og den andre er økt produksjon av kortikosteroider (HPI-aksen), som skiller ut kortisol. Disse primære neuroendokrine responsene kan så føre til sekundære og tertiære effekter, som oppsummert i **figur 2** (Iversen, 2013; Iversen og Eliassen, 2012; Wendelaar Bonga, 2011). Den sekundære stressresponsen blir et resultat av den primære stressresponsen, hvor det skjer metabolske, cellulære, osmoregulatoriske, og hematologiske endringer, i tillegg til endring i immunfunksjonen. Alle disse endringene skyldes fysiologiske tilpasninger. Den tertiære stressresponsen inkluderer de fysiologiske og atferdsmessige endringene som skjer med hele dyret, som kan være gjenopprettende, tilpasningsdyktige eller patologiske (Wendelaar Bonga, 2011). Et dyr kan håndtere en stressor effektivt gjennom tilpasninger, og hvis stressoren er

kortvarig kan homeostase gjenopprettes uten alvorlige konsekvenser for dyret. Effekten av dette kan føre til forbedret ytelse i fremtiden, som sykdomsresistens eller unngåelse av rovdyr. I slike tilfeller kan den tertiære responsen være vanskelig å observere. Er stressoren av kronisk karakter, og tilpasningen til stressoren er arbeidskrevende eller fraværende, blir den tertiære stressresponsen langvarig og alvorlig (Wendelaar Bonga, 2011). Dette kan føre til blant annet bivirkninger på vekst, immunitet og atferd som fører til redusert overlevelse (Noble et al., 2018).



Figur 2 Fysiske, kjemiske og andre oppfattede stressorer som påvirker fisk, og fremkaller fysiologiske og lignende effekter. Disse deles inn i primære, sekundære og tertiære responser. Pilene viser de ulike responsrutene re-tegnet fra Barton (2002) i Iversen (2013)

1.2.2 Allostase

McEwen og Wingfield (2003) beskriver allostase som å oppnå stabilitet gjennom endringer. De beskriver dette som en prosess som støtter homeostase, hvor likevekten til en organisme blir opprettholdt gjennom stabilisering av de essensielle fysiologiske parameterne. Dette støttes opp av allostase, som skaper stabilitet gjennom endringene i samsvar med indre og ytre påkjenninger. Allostase blir kontrollert av de endokrine stressresponsene, hvor formidlerne av denne prosessen er hormoner som kortikosteroider, katekolaminer og cytokiner (McEwen og Wingfield, 2003; Schreck, 2010).

En allostatisk tilstand betyr en endring i aktivitetsnivået hos de primære budbringerne, som glukokortikosteroider. Dermed kan en allostatisk tilstand resultere i en ubalanse av disse

budbringerne, da produksjonen av disse enten blir overdrevet eller mangelfull. Hvis matinntak og annen lagret energi kan tilføre drivstoff til, og kontrollere homeostatiske mekanismer, vil en allostatisk tilstand bare vare i begrensede perioder. Varer ubalansen over lengre perioder, og den ikke kan bli opprettholdt av energilagrene, vil dette gå over i allostatisk overbelastning (McEwen og Wingfield, 2003).

Allostatisk overbelastning deles i to typer responser, allostatisk overbelastning type 1 og type 2. Type 1 er en tilstand hvor energikravet for å opprettholde livsstadiet og tilhørende utfordringer, overstiger energilagrene som er tilgjengelig for å gi tilstrekkelig energi. Denne typen er adaptiv, da «akutt livshistorie endringer» («emergency life history stage», ELHS) utløses, som igjen resulterer i en netto reduksjon av energibehovet hvor energibehovet tilpasses miljøet sitt energilager. Dette fører til en netto reduksjon av den allostatisk belastning (Goymann og Wingfield, 2004; McEwen og Wingfield, 2003).

Type 2 er en tilstand der skadelige utfordringer er kroniske, og fører til en vedvarende allostatisk tilstand, uavhengig av sesongmessige endringer i miljøet. Alvorlige patofysiologi kan oppstå hvis overbelastningen ikke reduseres på noen måte. Denne typen er maladaptiv, da energikravet og konsentrasjonen av glukokortikoider øker, men ikke overskrider energilagrene, slik at nødvendig ELHS trigges (Iversen og Eliassen, 2014; McEwen og Wingfield, 2003).

1.3 Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis (HPI-aksen)

Det er tre forskjellige endokrine akser som mer eller mindre er involvert i regulering og uttrykket av stress under påvirkning av stressorer. Disse er kortikotropiske akse, melanotropiske akse og tyrotropiske akse (Bernier et al., 2009). Denne oppgaven skal ta for seg den kortikotropiske aksens; HPI-aksen.

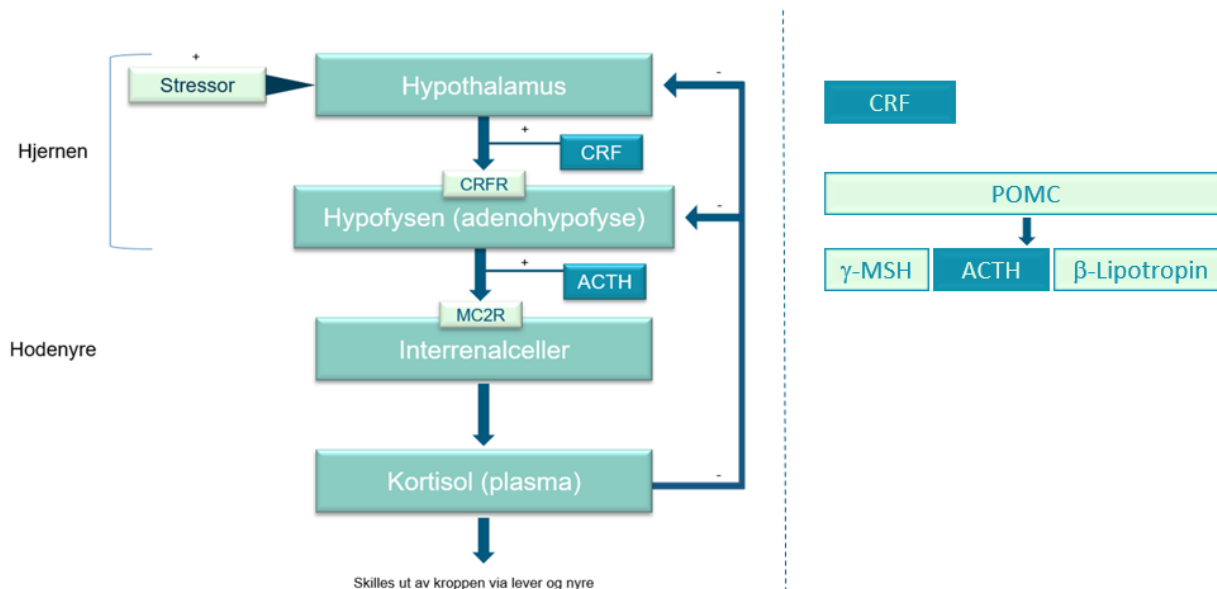
Funksjonen av HPI-aksen regulerer nivå av sirkulerende kortisol i beinfisk, og den er homolog til HPA-aksen (Hormonal-pituitary-adrenal axis) hos pattedyr. Selv om denne funksjonen er godt bevart hos virveldyr, er det noen forskjeller mellom fisk og pattedyr. Fisk har ikke binyrer som skiller ut glukokortikoider. I stedet har beinfisk celler som syntetiserer glukokortikoider (interrenale celler), som ligger spredt på i hodenyren, primært langs den bakre hovedvenen og dets forgreininger (Alsop og Aluru, 2011). Det nevroendokrine reguleringsystemet for fisk består av hypotalamus, hypofysen, og perifere endokrine kjertler eller celler som er regulert av utskillelse fra hypofysen (interrenalceller) (Alsop og Aluru, 2011).

Ved eksponering for en stressor, vil hypotalamus skille ut kortisol frigjøringsfaktor (CRF), som stimulerer forlappens (adenohypofysens) kortikotrope celler til å skille ut adrenokortikotrop

hormon (ACTH) til sirkulasjonen. ACTH er et av mange signalmolekyler avledet fra proopiomelanikortin (POMC) genet. Sirkulerende ACTH binder spesielt melanokortinreseptor type 2 (MC2R) uttrykt av interrenalcellene i hodenyren. Dette stimulerer så kortisolsyntese fra kolesterol, og utskillelsen av kortisol til blodstrømmen. (Alsop og Aluru, 2011).

I den første fasen av den akutte stressresponsen vil kortisol være mindre fremtredende enn adrenalin. Den viktigste funksjonen vil være å omfordele energi fra langtidsinvesteringer som vekst og reproduksjon, til øyeblikkelig overlevelse. En annen viktig faktor er reparasjon av hydromineralforstyrrelser etter stress i fisk. Hos fisk fungerer kortisol både som glukokortikoid og mineralkortikoid. Dette i motsetning til vertebrater som skiller kontrollen av disse funksjonene. Vertebrater bruker kortikosteron eller kortisol (avhenger av art) som glukokortikoid, og aldosteron som mineralkortikoid (Wendelaar Bonga, 2011). Glukokortikoid funksjon påvirker metabolismen og vekst, mens mineralkortikoid funksjon regulerer vann og ioner i vertebrater. Det er nødvendig med kortikoidreseptorer for kortisol, for å kunne formidle egenskapene til de gitte målvevene. Kortisol og aldosteron er kortikoidhormoner som styrer disse funksjonene gjennom spesielle reseptorer. Disse kalles glukokortikoid reseptor (GR) og mineralkortikoid reseptor (MR) (Iversen, 2013; Mommsen et al., 1999). Kortisol i blodbanen fungerer også som en negativ feedback, hvor det kontrollerer utskillelse ved alle nivå i HPI-aksen (Wendelaar Bonga, 2011).

Kortisol er det primære kortikosteroidet i beinfisk, og er delaktig i flere biokjemiske, fysiologiske og atferdsmessige funksjoner. Dette inkluderer frigjørelse av energi fra glykogenlagrene, for å komme seg etter en stressreaksjon, modulering av fôring, vekst, immunresponser, osmoregulering, og reproduksjon. Kortisolsignaler er ikke bare viktig for å komme seg etter stress, men også for å regulere mange av disse prosessene under normale forhold (Alsop og Aluru, 2011).



Figur 3 oversikt over HPI-aksens anatomi og signalveier. Re-tegnet fra: (Alsop og Aluru, 2011; Bernier et al., 2009)

1.3.1 CRH/CRF og den hypothalamiske kontroll av ACTH

Kortisol er den siste budbringeren av HPI-aksen, hvor CRF har en nøkkelrolle i kommunikasjonen mellom hjernen og det endokrine systemet under selve stressresponsen (Wendelaar Bonga, 2011). CRF er et peptid bestående av 41 aminosyrer, og er lik strukturen til urotensin I, funnet i urofysen hos beinfisk (Bernier et al., 2009). CRF blir produsert av nevroner fra preoptiske kjerne (NPO) i hypothalamus (Wendelaar Bonga, 2011), og spiller en viktig rolle i koordinering av neuroendokrine, autonome og atferds-responser til stress (Alsop og Aluru, 2011). Disse CRF-nevronene projiserer til hypofysen og stimulerer utskillelse av ACTH fra celler i den distale delen av adenohypofysen (Wendelaar Bonga, 2011). Det er flere faktorer som har en effekt på utskillelse av ACTH. CRF blir regnet som den viktigste regulerende faktoren (Bernier et al., 2009). Andre faktorer er blant annet arginin-vasotocin (AVT), tyreotropin (TRH), POMC-avledet ACTH og endorfiner (Flik et al., 2006).

1.3.2 Adrenokortikotropisk hormon ACTH

Proopiomelanokortin (POMC) er en forløper til flere peptider, som kan deles inn i tre grupper: ACTH, endorfinlignende og MSH (melanocytstimerende hormon) -lignende hormoner (se **figur 3**) (Alsop og Aluru, 2011; Bernier et al., 2009). ACTH er det minste peptidet i adenohypofyse (AN) som ligger i forlappen av hypofysen, med 39 aminosyrer i en enkel lineær kjede. Det produseres i *rostral pars distalis* (RPD) regionen av AN, hvor det igjen regulerer utskillelsen av kortisol. I fisk har ACTH en rolle om å regulere steroidogenesisen i de interrenale

cellene i hodenyren. MCR i hodenyren er målcellene for ACTH og de andre peptidene fra POMC (Bernier et al., 2009).

1.3.3 Kortisol som stressindikator

Plasmakortisol er brukt som en gyldig indikator på stress i fisk, men det har vært få studier som har målt den faktiske kinetikken av kortisol i fisk (Mommsen et al., 1999). I de senere år har det kommet flere studier rundt kortisol i fisk (Cao et al., 2017; Iversen og Eliassen, 2014; Iversen og Eliassen, 2012). Plasmakortisol gjenspeiler nettoeffekten av produksjon, og utskillelsesraten av hormonet. Utskillelsen av kortisol avhenger av dynamikken av bindende proteiner (kortisolbindende protein og albumin), reseptorer i målvev, og selve katabolisme av kortisol (Mommsen et al., 1999).

For å bruke kortisol som en indikator på stress, må dette kunne måles. Det finnes flere metoder for prøvetaking av kortisol. Metoder som ikke krever blodprøvetaking, kan måle kortisol i urin, avføring, skjell/slim og vannprøver. Ellers blir steroidhormoner vanligvis målt ved hjelp av radio-immunologiske-analyse (RIA) eller enzymbundet immunologisk analyse (ELISA) i plasma eller vevshomogenater (Ellis et al., 2013).

Kortisol er med på å regulere energimetabolismen, oksygenopptak, hydro-mineralbalansen og andre funksjoner i immunforsvaret. Tidligere studier har vist at kortisol ofte er assosiert med de skadelige effektene av stress, som redusert vekst og reproduksjonsevne (Mommsen et al., 1999; Schreck, 2010), reduserte funksjoner av immunsystemet (Ellis et al., 2012), og overlevelse (Iversen og Eliassen, 2012). Fisk som ikke får tid til å komme seg fullstendig etter stress vil kunne oppleve dødelighet som følge av stressorer, som i utgangspunktet ikke ville vært dødelige (Iversen og Eliassen, 2014).

1.4 Stressorer

Produksjonssyklusen til en atlantisk laks inneholder flere kritiske produksjonsfaser. Fra yngel til slakt går laksen igjennom håndteringsprosesser som vaksinerings, sortering, transport, overføring til sjøvann, lusetelling, lusebehandling og slakt (Burnley et al., 2012; Gómez et al., 2016). Dette er vanlige stressfaktorer for laks, som aktiverer en allostatisk respons gjennom HPI-aksen, noe som resulterer i økte blodnivåer av katekolaminer og kortisol (Iversen og Eliassen, 2014; Wendelaar Bonga, 1997, 2011).

1.4.1 Lufteksponering

Lufteksponering er en vanlig utfordring, både for kommersielle -og rekreasjonsfiskere. Mange fisk blir, av ulike årsaker, sluppet fri etter de er blitt fisket opp av vannet (Cooke og Cowx, 2006). En rekreasjonsfisker kan ta opp fisk fra vannet for målinger og fotografering (Pelletier

et al., 2007), mens i fiskeribransjer vil bifangst utsettes for luft under sortering (Davis, 2002). En fangsthendelse og tilhørende håndtering kan medføre kraftige stressresponser med etterfølgende høy dødelighet hos fisken. Dette på grunn av fiskens evne og behov for å ta opp oksygen fra akvatiske miljøer (Cook et al., 2015). Det er vanskelig å sette en standard for hvor tolerant en fisk er for lufteksponering, da man må ta hensyn til faktorer som ulike miljøtilstander, art og livsstadier (Cook et al., 2015). Det blir gitt ulike råd rundt lufteksponering av fisk, hvor flere anbefaler å holde fisken konsekvent under vann. Dette stemmer overens med studier som har vist at lufteksponering er ekstremt skadelig for fisk utsatt for fysiologiske forstyrrelser assosiert med sportsfiske (Ferguson og Tufts, 1992).

Lufteksponering skjer også i dagens akvakulturnæring. Under vaksineringsprosedyrer vil hvert enkelt individ i populasjonen bli eksponert for luft. Oppdrettslaks er også svært utsatt for lakselus, og det stilles strenge krav til telling og rapportering av lakselus. Lusetelling vil også utsette laksen for flere stressorer. Håving, trenging, lufteksponering, bedøvelse og lufteksponering igjen er vanlig håndtering av laksen før den blir returnert til merden igjen. Lusetelling er viktig for å opprettholde kontroll over lakselus i akvakulturanleggene. Ifølge forskriften om Forskrift om lakselusbekjempelse (2012) skal lakselus telles minst hver 7. dag ved temperaturer over 4 °C, og minst hver 14. dag ved temperaturer under 4 °C. For hver telling vil minimum 10-20 laks i hver merd i hele Norge gå gjennom prosedyren. Antall laks avhenger av hvor i landet anlegget ligger, og hvilken tid på året det er.

1.4.2 Transport

I Norge lider laksenæringen av kraftige dødeligheter etter overføring til sjø. Dette skyldes sannsynligvis dårlige håndteringsprosedyrer før og etter transport av smolt til sjølokalitetene (Iversen et al., 2005). Transport består av flere traumatiske hendelser, som fanging, lasting, transport, lossing, og trenging. Slike stressorer kan føre til omfattende stressresponser i anadrom laksefisker (*Salmo spp.* og *Oncorhynchus spp.*) (Iversen et al., 2005; Iversen et al., 1998). Tidligere studier har vist at lasteprosessen fremkaller en langt større stressrespons enn transport med brønnbåt og lastebil (Farrell et al., 2010; Iversen et al., 2004; Iversen et al., 2005; Iversen et al., 1998). Flere studier har vist til at transport med brønnbåt og lastebil har en viktig restitusjonsfunksjon. Uten en mulighet til å restituere, på grunn av kort transport, dårlig vær eller dårlige veiforhold, mellom de største stressorene (last -og lossing), vil laksesmoltens evne til å håndtere ekstra stressorer bli redusert (Iversen og Eliassen, 2009).

1.5 Hensikten med denne studien

En ønsker i denne undersøkelsen studere effekten av lufteksponering kombinert med håving og transport og hvordan disse stressorene påvirker de primære og de sekundære stressresponsene hos atlantisk laksesmolt.

2.0 Material og metode

Forsøk og analyse ble utført ved Mørkvedbukta forskningsstasjon ved Nord Universitet, avdeling Bodø, Norge. Forsøksperioden varte fra 09.11.19 til 25.11.19.

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 og forhold

78 stykk 1-årsmolt av Atlantisk laks, med gjennomsnittlig kroppsvekt på $544 \text{ g} \pm 258$ (S.D.) og gjennomsnittlig kroppslengde på $33,47 \text{ cm} \pm 4,76$ (S.D.) ble brukt i dette forsøket. Laksen ble hentet fra Salten Smolt avd. Breivik (N SD03) 08.05.2019, og fraktet til Mørkvedbukta forskningsstasjon med brønnbåt. Laksen var av stammen SalmoBreed 18-02 QTL-IPN, og ble levert til Salten Smolt som rogn i februar 2018, og klekket 02.03.2018.

Fisken ble flyttet inn i hall 3, i et $1,5 \text{ m}^3$ kar. Fisken ble stående i karet fra ankomst 08.05.2019 til forsøksstart 09.11.2019. Fisken fikk kontinuerlig tilførsel av sjøvann med en stabil salinitet på 33,5‰. Vanntemperaturen før forsøket var $7,7 \pm 0,7^\circ\text{C}$, og oksygenivået var $85,2 \pm 6,4 \%$ O_2 metning. Ved forsøksstart ble fisken stresset med lufteksponering før den ble flyttet til hall 6 med et transportkar (transporttid 15 min). Ved ankomst i hall 6 ble 6 fisk (0h) bedøvd (5mg/L metomidate), mens resten av fisken ble fordelt i 10 kar á 6 fisk per kar ($0,5 \text{ m}^3$). Under forsøksperioden ble tankene skjermet for innsyn og forstyrrelser med en ugjennomsiktig plastplate, og det var også skiltet med adgang forbudt for å minimere eventuelle forstyrrelser.

2.3 Pre-stress og forsøksoppsett

For å kunne bestemme effekten av sammentrenging (14 min og 30 sek), lufteksponering (90 sek), håndtering (håving 2 minutter) og transport (transporttid 15 min) som stressfaktor på primære (plasmakortisol) og sekundære (laktat, glukose og hemoglobin) stressresponser ble blodprøver tatt. Det ble tatt blodprøver før oppstart av forsøket (pre-stress), og 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 og 168 timer etter fisken var utsatt for stress. Før forsøksstart ble blodprøver av 12 fisk (pre-stress) tatt. Dette ble gjort for å se hvordan de ulike blodverdiene (hemoglobin, laktat, glukose etc.) hos fisken opprinnelig var. Dette ble kontrollgruppen.



Figur 4. Stressor med 90 sekunders lufteksponering og sammentrenging. Total varighet på stressor 15 minutter og 30 sekunder. Fisken ble deretter håvet og flyttet til en annen forsøkshall. Transporttid 7 minutter. Foto: Martin H. Iversen

2.3.1 Prøvetaking

6 fisk fra ett kar ble håvet ut og plassert i 10 L bønne med bedøvelse (Metomidate, 5mg/ L). Dosen på 5 mg/ L har tidligere vist å blokkere enhver økning i plasmakortisol etter inntrådt anestesi (Iversen et al., 2003). Etter anaestesi ble fisken avlivet med slag mot hodet. Vekt og lengde ble målt, før fisken ble lagt på et Brett dekket med aluminiumsfolie. Blodprøve ble tatt ved å tappe blod fra caudalvenen med 0,6 x 25 mm hepariniserte sprøyter. Blodet ble ført over i 1,5 ml eppendorfrør, mens en liten rest i sprøyten ble brukt til å måle Hemoglobin, laktat og glukose fortløpende (se kapittel 2.4.3 s.15). Blodet ble sentrifugert ved 2000 rpm i 10 minutter. Blodplasma ble pipettert ut og ført over i nye eppendorfrør, og fryst ned på -40 °C frem til videre analyser.

2.4 Analytiske prosedyrer

2.4.1 ACTH

ACTH-nivåene ble målt ved bruk av CUSABIO Fish adrenocorticotropic hormone (ACTH) ELISA-sett (CSB-E15926Fh Cusabio Houston, TX, USA). Analysene ble gjennomført etter

protokollen som fulgte med settet. Kort forklart ble standarder (0, 75, 150, 300, 600 og 1200 pg/mL) og kontroll virvelmikset og sentrifugert i noen sekunder før pipetert (50 µL) i hver sin brønn i ELISA-brettet. Plasmaprøvene ble fortynnet (1:1) med PBS (25 µL plasma + 25 µL PBS). 50 µL fortynnet plasma ble pipetert i hver sin brønn. Alle standarder ble målt i triplikat og plasma i duplikat. Deretter ble 50 µL enzym-konjugat tilsatt i hver brønn og mikset. Analysebrettet ble forseglet med medfulgt forseglar, og inkubert i 60 minutter mørkt og ved 37 °C. Etter inkubering ble væsken pipetert ut av analysebrettet før vasking. Vaskingen ble gjentatt tre ganger. Her ble hver brønn ble fylt med 200 µl «vaskebuffer» og så tømt ved en rask bevegelse over vasken. Brettet ble så slått mot papir for å få ut de siste dråpene. Så ble 50 µL HRP-avidin tilsatt i hver brønn, mikset godt, forseglar og satt i inkubator i 30 minutter på 37 °C. Samme vaskeprosedyre som beskrevet tidligere ble så gjentatt før 50 µL «substrat» A og «substrat» B ble tilsatt hver brønn i mørke, mikset godt, forseglar og inkubert i 15 minutter på 37 °C. Siste steg var å tilsette 50 µL «stoppløsning» i hver brønn, før analysebrettet ble plassert i en ELISA-maskin (Tecan Sunrise Remote, Bergman diagnostika, Østerrike), og avlest ved 450 nm. Intra- og interassay koeffisienten var henholdsvis >10% og 15.3% (CSB-E15926Fh, Cusabio Houston, TX, USA)

2.4.2 Plasma kortisol

Plasmakortisol-nivåene ble målt i duplikater ved bruk av kortisol ELISA-kit (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany). Analysene ble gjennomført etter produsentens protokoll. Standarder (0, 20, 50, 100, 200, 400 og 800 ng/ml), kontroll og plasmaprøver ble vortext og pipetert (20 µl) i hver sin «brønn». Standardene og kontrollen ble målt i triplikat, og plasmaprøvene som duplikat. Så ble det tilført 200 µl enzym konjugat i hvert rom og mikset godt i 10 sekunder. Brettet ble så satt til inkubering i 60 minutter, mørkt og i romtemperatur. Etter inkubering ble rommene tømt for væske med en rask bevegelse opp ned i vasken. Brønnene ble deretter vasket med Wash Solution (400 µl) tre ganger. Mellom hver vask ble gjenværende væske tømt ut i vasken og brettet ble slått opp ned mot tørkepapir på benken for å få ut de siste dråpene. Etter vask ble 100 µl med «substratløsning» pipetert i hvert rom, før 15 minutter med inkubering. Siste steg var å stoppe enzymreaksjonen ved å tilsette 100 µl «stoppløsning» i hvert rom. Brettet ble så plassert i en ELISA-maskin (Tecan Sunrise Remote, Bergman diagnostika, Østerrike), og avlest ved på 450nm. Intra- og interassay koeffisienten var henholdsvis >10% og 11.1% (CSB-E08487f, Cusabio Houston, TX, USA). Plasmakortisol ble oppgitt i nmol/L (nM; ng/mL=2.76 nM)

2.4.3 Laktat, glukose og hemoglobin

Laktat, glukose og hemoglobin ble bestemt på helblod umiddelbart etter prøvetaking ved hjelp av håndholdte enheter. For laktat ble en Lactate Scout+ (EKF, Leipzig, Tyskland) brukt, med målelengde på 0,5 – 25 mmol/L. For glukose ble en Contour XT blodsukkerapparat (Ascensia Diabetes Care) brukt, med en målelengde på 0.6– 33.3 mmol/L. For hemoglobin ble en HemoCue Hb 801 (HemoCue AB, Ängelholm, Sverige) brukt, med en målelengde på 0,62 – 15,9 mmol/L

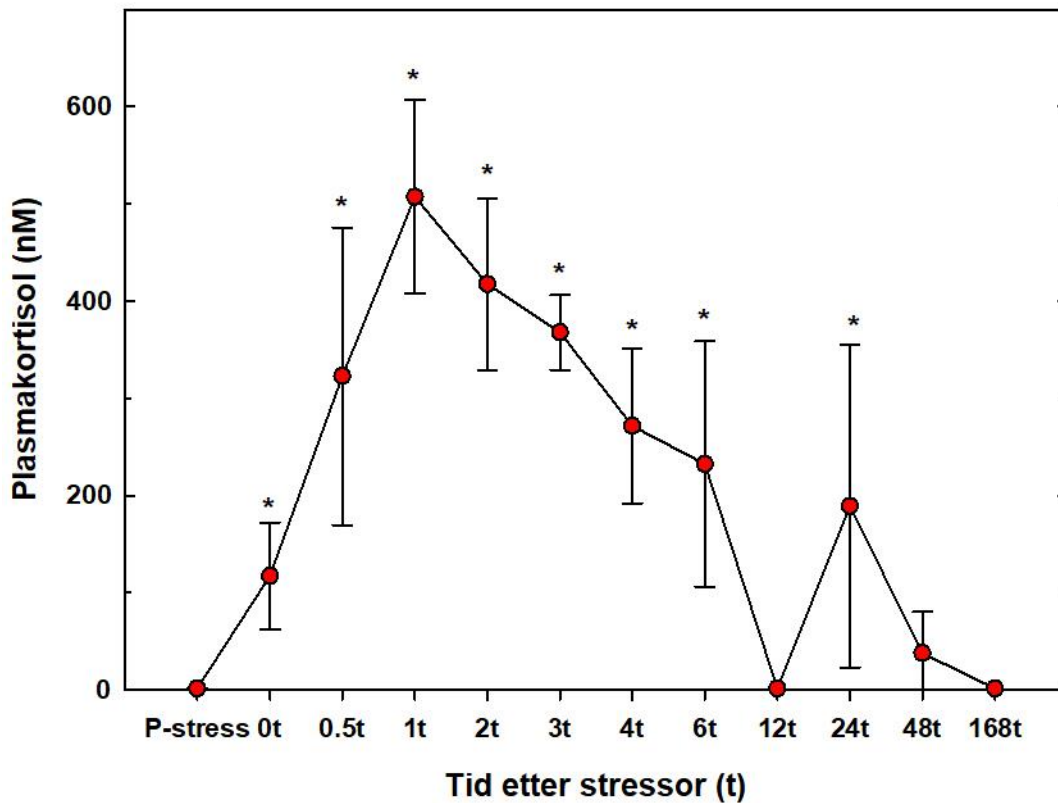
2.5 Statistisk analyse

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. Endring i kortisol fra pre-stress til et annet tidspunkt etter flytting og applisert stressor innen en forsøksgruppe, benyttet en enveis variansanalyse (oneway-ANOVA) (Sokal og Rohlf, 1987). 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, ACTH, og sekundære stressresponser som glukose, laktat og hemoglobin ble det gjennomført en ikke-lineær regresjonsanalyse (Pearson r). Signifikant forskjell ble bestemt på 0.05 nivå. Alle resultater er uttrykt i gjennomsnitt med standardavvik ($\bar{n} \pm SD$). Signifikante forskjeller i figurene innen en gruppe ved ulike prøvetakingstidspunkt sammenliknet med pre-stress ble indikert med *.

3.0 Resultater

3.1 Primær stressrespons

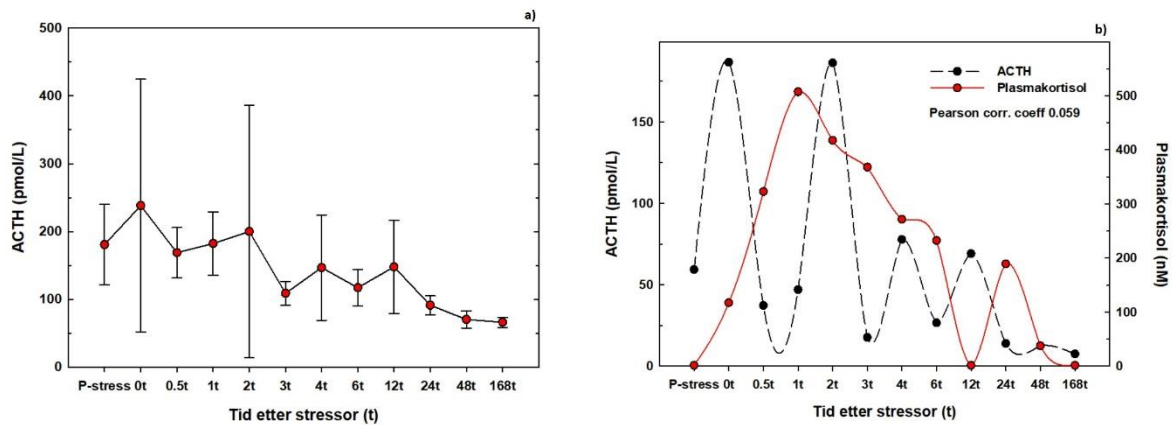
3.1.1 Plasmakortisol



Figur 5. Gjennomsnittlige verdier av kortisol i plasma, ($\bar{n} \pm SD$) før og etter lufteksponering og transport. *indikerer signifikante forskjeller fra pre-stress.

Figur 5 viser de gjennomsnittlige hvilenivåene av ($\pm SD$) plasmakortisolverdiene målt i blodplasma før og etter påført stress. Plasmakortisol før oppstart (pre-stress) var på $1,60 \pm 0,29$ nM. Kortisol hadde høyeste måling på $507,11 \pm 99,72$ nM (1 time etter stress), og lavest på $1,68 \pm 0$ nM (12 og 168 timer etter stress). Plasmakortisol var signifikant høyere sammenlignet mot pre-stress for tidspunktene 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, og 24 timer etter stress.

3.1.2 ACTH

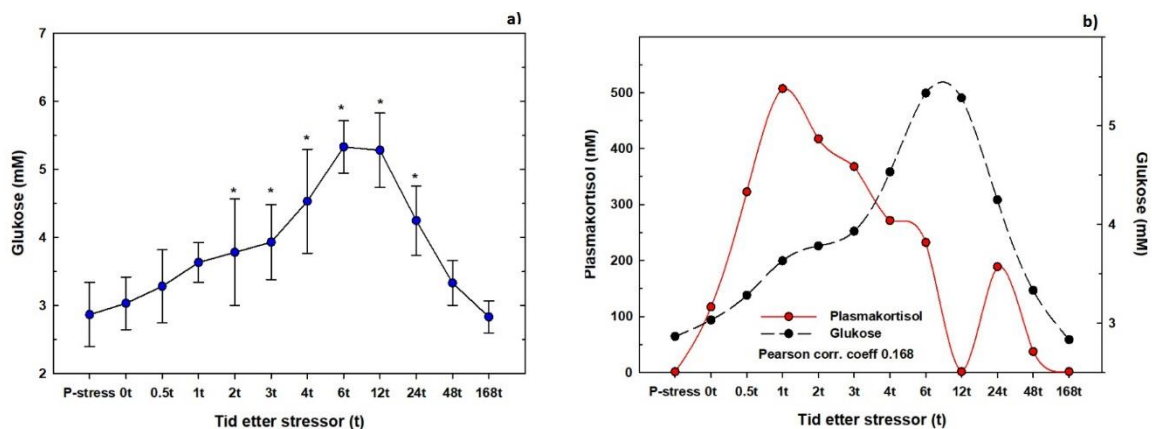


Figur 6 a) Gjennomsnittlige verdier av ACTH ($\bar{n}\pm SD$) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport. b) Gjennomsnittlige verdier av ACTH (pmol/L) og plasmakortisol (nM) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport, og sammenhengen mellom disse parameterne (Pearson r).

Figur 6 a og b viser de gjennomsnittlige hvilenivåene av ACTH målt i blodplasma før og etter påført stress. ACTH før stress hadde en gjennomsnittlig verdi på $180,71\pm 59,28$ pmol/L. Toppen av ACTH kom rett etter stress (0 timer etter stress), og viser $238,1\pm 186,62$ pmol/L. Den laveste verdien kom etter 168 timer etter stress, og viser $66,13\pm 7,42$ pmol/L. Det var ingen signifikante forskjeller fra pre-stress og ingen sammenheng mellom disse parameterne (Pearson r).

3.2 Sekundære stressresponser

3.2.1 Glukose

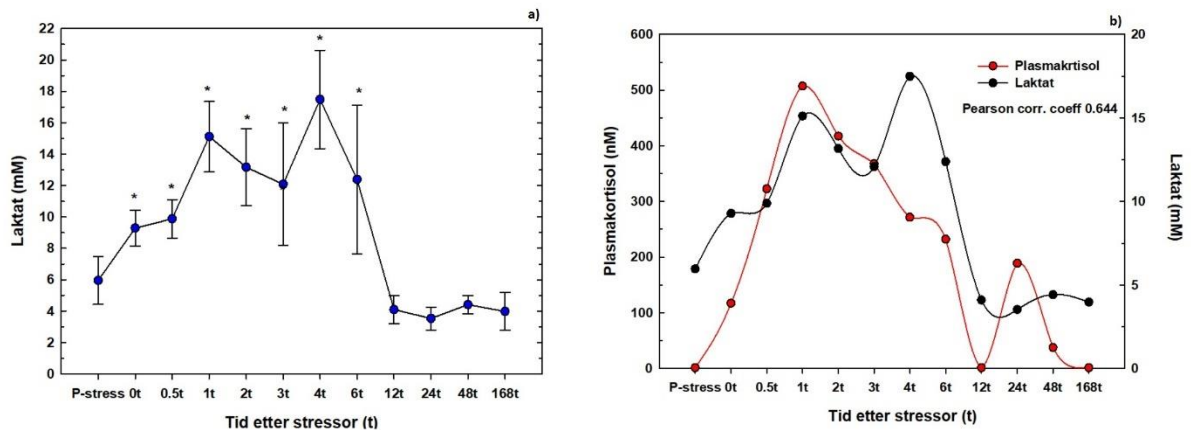


Figur 7. a) Gjennomsnittlige verdier av plasmaglukose ($\bar{n}\pm SD$) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport. b) Gjennomsnittlige verdier av plasmaglukose (mM) og plasmakortisol (nM) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport, og sammenhengen mellom disse parameterne (Pearson r).

Figur 7 a og b viser de gjennomsnittlige verdiene av glukose (mM) i blodplasma før og etter stress. Gjennomsnittlige verdier pre-stress glukose var $2,87\pm 0,47$ mM. Toppen av glukose kom etter seks timer etter stress, og var på $5,33\pm 0,38$ mM. Den laveste verdien kom etter 168 timer

etter stress, og var på $2,83 \pm 0,23$ mM. Det var signifikante forskjeller mellom pre-stress glukose og glukose ved tidspunktene 2, 3, 4, 6, 12 og 24 timer etter stress. Det var ingen sammenheng mellom plasmakortisol og glukose (Pearson r).

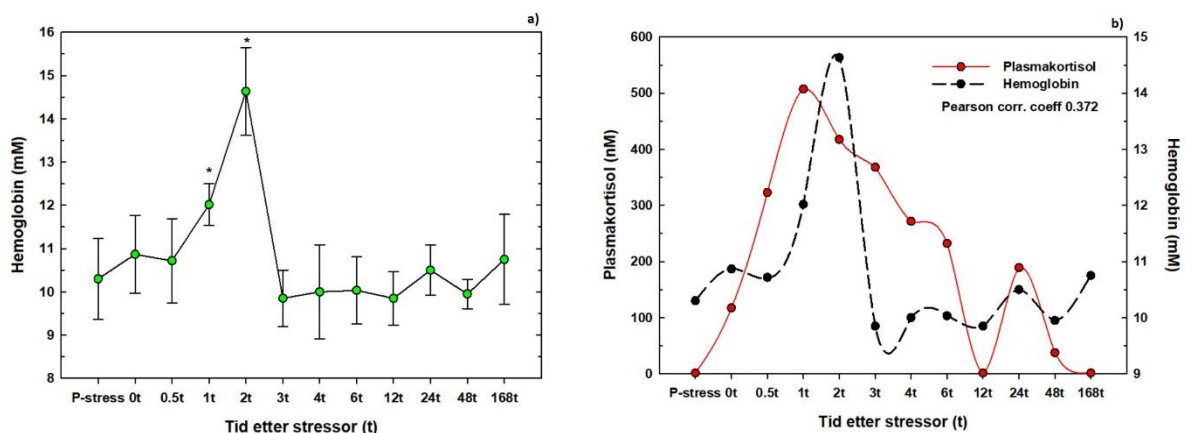
3.2.2 Laktat



Figur 8. a) Gjennomsnittlige verdier av plasmalaktat ($\bar{n} \pm SD$) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport. b) Gjennomsnittlige verdier av plasmalaktat (mM) og plasmakortisol (nM) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport, og sammenhengene mellom disse parameterne (Pearson r).

Figur 8 a og b viser de gjennomsnittlige verdiene av laktat (mM) målt i blodplasma før og etter stress. Gjennomsnittlige verdier pre-stress laktat var $5,96 \pm 1,52$ mM. Høyeste verdi $17,48 \pm 3,13$ mM ble målt 4 timer etter stress, og tilsvarende ble lavest verdi målt 24 timer etter stress $3,53 \pm 0,72$ mM. Det var signifikante forskjeller mellom pre-stress laktat og laktat ved tidspunktene 1, 2, 3, 4 og 6 timer etter stress. Det ble påvist en korrelasjon ($p < 0,00001$) mellom laktat og plasmakortisol, (0,664) ved Pearson r Sig. (2-tailed),

3.2.3 Hemoglobin



Figur 9. a) Gjennomsnittlige verdier av plasmahemoglobin ($\bar{n} \pm SD$) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport. b) Gjennomsnittlige verdier av plasmahemoglobin (mM) og plasmakortisol (nM) før (pre-stress) og ved ulike tidspunkt etter lufteksponering og transport, og sammenhengene mellom disse parameterne (Pearson r).

Figur 9 viser gjennomsnittlig verdier av hemoglobin (mM) målt i blodprøve før og etter stress. Gjennomsnittlige verdier pre-stress hemoglobin var $10,30 \pm 0,94$ mM. Høyeste verdi $14,63 \pm 1,01$ mM ble målt 2 timer etter stress, og tilsvarende ble lavest verdi målt 3 ($9,85 \pm 0,65$ mM) og 12 timer ($9,85 \pm 0,62$ mM) etter stress. Det var signifikante forskjeller mellom pre-stress hemoglobin og hemoglobin ved tidspunktene 1 og 2 timer etter stress. Det ble påvist en korrelasjon ($p < 0,001$) mellom hemoglobin og plasmakortisol, ($r = 0,372$) ved Pearson r (2-tailed).

4.0 Diskusjon

4.1 Akvakultur og stress

Norge er i dag verdens største produsent av Atlantisk laks, og har siden starten på 1970-tallet til i dag økt produksjonen kraftig. I følge FDIR. (2019a) stod det over 421 millioner laks i merder langs Norges kyst per 31.12.2018. I en rapport av Olafsen et al. (2012) ble det satt et mål for sjømatnasjonen Norge om en årlig vekst på 4 prosent, som tilsvarer blant annet 5 millioner tonn i 2050. Her ble det anslått et potensial for å femdoble produksjonen av laks og ørret i Norge innen 2050. For å kunne gjøre dette stilles det store krav til miljø- og sykdomsutfordringer, innovasjon innen fôr, fiskehelse, avl og teknologi. I den senere tid er fiskevelferd også blitt et viktig tema, da det er viktig å ta vare på dyrene sine, og fisk er blitt innlemmet i Dyrevelferdsloven (2009). For å kunne øke produksjonen er det viktig å vite hvordan de ulike delene av produksjonen påvirker fiskens helse og velferd. Det diskuteres mye rundt velferd, da det er vanskelig å vite hvordan en fisk faktisk opplever de ulike produksjonsstadiene og håndteringen den blir utsatt for. Vi vet at stress er en viktig faktor å ta hensyn til når vi snakker om dyrevelferd, da store eller langvarige stressbelastninger vil få negative konsekvenser for fiskens helse og overlevelse (Iversen og Eliassen, 2014).

Stress er ikke til å unngå for laks i oppdrett, og siden de lever i fangenskap har fisken ingen mulighet til å unnsnippe menneskeskapte stressorer. Laksenæringen har de siste årene hatt en dødelighet på 10-20 %, som i den store sammenhengen omfatter mange individer laks som går tapt gjennom produksjonssyklusen. Dette antallet blir sett på som uakseptabelt og lite bærekraftig (Takle et al., 2015). Stress, som følge av stressende håndteringsprosesser er årsaken til deler av denne dødeligheten. I dette studie har en fokusert på stressorene lufteksponering sammen med sammentrenging og transport. En av de første utfordringene laks møter i produksjonen er vaksinerings på parr-stadiet. Under denne prosessen vil hver enkelt parr tatt ut av vannet og eksponert for luft. Lusetelling er også en lufteksponerende prosess. Vaksinerings av atlantisk lakseparr er en viktig og nødvendig prosedyre i akvakultur. Vaksinen er med på å forhindre utbrudd av flere forskjellige bakterie- og virussykdommer. Det er også den største grunnen til redusert bruk av antibiotika i norsk akvakultur, og at produksjonen fortsatte å øke på 1990-tallet (Drangsholt et al., 2011; Gudding et al., 1999). For å opprettholde helsen og velferden på atlantisk laks, blir hvert individ vaksinert før den fraktes ut i havet. Selve vaksineringsprosessen kan føre til uunngåelig stress, og er ofte assosiert med korttidsøkning i plasmakortisol (Funk et al., 2004; Skinner et al., 2010). Lite forskning har sett på omfanget av

lusetelling på Atlantisk laks, og man kan kanskje sammenligne dette med laks som blir utsatt for sportsfisking med «catch and release». Temaet har mange kunnskapshull, og potensialet er stort for forskning som vil være direkte fordel for forvaltning og fiskevelferd (Cook et al., 2015).

Pelletier et al. (2007) har undersøkt ulike veiledninger rundt catch-and-release, hvor ulike byråers retningslinjer motsier hverandre på flere områder. Disse inkluderte blant annet lufteksponering, som var det mest omtalte problemet blant byråene. Det er derfor viktig å utforme en terskel for lufteksponering som blir forstått og kan puttes i praksis. Selv om det er fastsatte terskler for noen fiskerier og arter, vil fortsatt forskning og utdanning være sentral i denne problemstillingen. Dessverre vil det aldri komme en «en sko som passer alle»-anbefaling, og vitenskapelige resultater vil uunngåelig være kontekstspesifikk (Cook et al., 2015).

I «catch and release»-studier er det vanligst å måle kortisol, glukose og laktat. Disse er nyttige for å evaluere omfanget av fysiologiske forstyrrelser relatert til en primær (kortisol) eller en sekundær (glukose, laktat) stressrespons (Cooke et al., 2013). Siden laks blir utsatt for lufteksponering og transport flere ganger i løpet av produksjonssyklusen, er det interessant å se hvilken effekt dette har på fiskens stressrespons, som igjen kan si noe om velferden til fisken.

4.2 Primære stressresponser hos laksesmolt

Kortisol er en mye brukt biomarkør for å studere stress, og i hovedsak er det plasmakortisol som blir brukt til å se nærmere på fiskens primære stressrespons (Baker et al., 2013). Hvilenivåer av plasmakortisol blir brukt for å dokumentere eller påvise kroniske stressbelastninger hos laksefisk. Kronisk stress kan assosieres med hvilenivå av plasmakortisol nede på 27,5 nM, mens ustressede laksefisker normalt ligger under 13,8 nM (0-5 ng/ml) (Pickering og Pottinger, 1989). I følge Wendelaar Bonga (2011) varierer hvilenivået av plasmakortisol hos fisker fra 5 til 30 nM. Basalnivået for pre-stress i dette forsøket lå på 1,60 nM, som er under nivået som blir ansett som normalt. Etter lufteksponering og transport ble det observert en signifikant økning i plasmakortisol etter en halv time, mens toppnivået ble observert en time etter påførte stressorer. Disse forhøyede konsentrasjonene av plasmakortisol indikerer en belastning på HPI-aksen og en primær stressrespons. En kan anta at forsøksfisken var i allostatisk overbelastning type 1, hvor overbelastningen er adaptiv. Dette betyr at fisken kan hente seg inn igjen, og opprettholde homeostase. Som en kan se hadde fiskens plasmakortisol et dropp ned på pre-stressnivå etter 12 timer, før den ble signifikant høyere igjen 24 timer etter stressor. Lignende observasjoner er gjort tidligere hvor Iversen et al. (2009) observerte samme droppet av plasmakortisol hos Atlantisk laksesmolt 24 timer etter transport.

Farbridge og Leatherland (1992) så en lignende topp av plasmakortisol åtte timer etter stress hos regnbueørret. Årsaken til dette fenomenet kan være mange. Det kan være mulighet for at fisken er blitt forstyrret i forsøkshallen av en ukjent stressor, men dette er lite sannsynlig da forsøkshallen hadde fullstendig adgangskontroll. En mer sannsynlig årsak kan være en «utslitt» HPI-akse, som etter eksponering over lengre tid gir en sen effekt på stressresponsen. Før forsøksstart ble fisken stående i en hall i nærheten av sprengningsarbeid over en lengre periode. Det var sprengning hver dag i en måned før forsøksoppstart. Sprengningen hadde kraftige ringvirkninger, hvor en kunne observere krysninger på overflaten av vannet ved hver sprengning. Det er vist tidligere stor variasjon i basalnivåer av plasmakortisol når fisken har vært utsatt for slik belastning over tid. Iversen og Eliassen (2014) gjorde et forsøk hvor de sammentrengte laksesmolt daglig i 4 uker før de ble vaksinert. Denne fisken opplevde svært dårlig fiskevelferd, da de mistet kontroll over reguleringen av hvilenivåene av plasmakortisolen.

Økninger i plasma-ACTH skjer før endringene i plasmakortisolnivå, men denne relative forskjellen i endringshastigheten for de to hormonene er mest uttalt i den tidlige fasen av stressresponsen (2-10 min) (Rotllant et al., 2003). Resultatene for ACTH viser en forhøyet konsentrasjon av plasma-ACTH før forsøksstart. Dette kan være en effekt av de nevnte sprengningene over tid. Pre-stress-nivåene av plasma-ACTH var på 180,7 pmol/L. Andre studier som har målt basalnivåer av plasma-ACTH har observert lavere verdier enn dette. Disse har blant annet vært; mindre enn 5,5 pmol/L hos coho laks (*Oncorhynchus kisutch*) (Sumpter et al., 1986), 8,8-22 pmol/L hos gullfisk (*Carassius auratus*) (Singley og Chavin, 1975; Singley og Chavin, 1976), og rundt 6,83-7,71 pmol/L for regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ved 0 timer trengning (Pottinger og Carrick, 2001). Swift (1982) fant ACTH-verdier mellom 11-44 pmol/L i regnbueørret, som blir sett på som «normal» området av plasma-ACTH. I Iversen og Eliassen (2014) indikerte resultatene at en fisk som kan ha kommet inn i en allostatisk overbelastning type 2, er oversensitiv til ACTH, har redusert effektiv negativ tilbakemeldingssystem, og en forhøyet basalnivå av plasmakortisol. Noe som kan gi effekt på dyrets velvære og trivsel. ACTH kontrollerer utskillelsen av kortisol, og det vil ikke nødvendigvis være noen korrelasjon mellom. Det stemmer med dette studiet, hvor ingen korrelasjon ble funnet.

4.3 Sekundære stressresponser hos laksesmolt

Den primære stressresponsen med utskillelse av katekolaminer og kortikosterioder, forårsaker den sekundære responsen, som inkluderer endringer i plasmaioner, metabolitter og hematologiske funksjoner. Dette vil så føre til fysiologiske endringer i respirasjon, metabolisme, hydromineralbalansen, syre-basebalanse, cellulære responser og immunologiske funksjoner. (Barton, 2002; Mommsen et al., 1999; Pickering & Pottinger, 1989).

4.3.1 Glukose

Den vanligste brukte indikatoren for de sekundære stressresponsene i fisk har vært glukose i blodet (Cook et al., 2012; Mommsen et al., 1999). Fysiologiske stressresponser er energikrevende (Barton, 2002), hvor dyret må bruke de begrensede energiressursene det har, til å håndtere utfordringene forbundet med stressoren. Dette går på bekostning av andre energikrevende prosesser, og kan føre til endringer i «emergency life history stage» (ELHS). Aktivering av ELHS fører til at dyret ledes vekk fra normale livshistoriske stadier (LHS) til en overlevelsmodus som reduserer allostatisk belastning, og gjenvinner positiv energibalanse (Wingfield, 2005). Selv om rollen til kortisol i energireguleringen ikke er tydelig, tror man at kortisol er med på å øke den levermetabolske kapasiteten, gjennom glukoneogenese og utskillelse av glukose fra leveren (Mommsen et al., 1999) Glukose blir foretrukket som energi i stressresponsen (Iversen og Eliassen, 2014), og hos fisk er den spesielt viktig for hjernen og muskler under stress. Når adrenalinnivåene er høye vil hjertefrekvensen og blodstrømmen øke, og det blir et økt behov for energitilførsel (Rothwell et al., 2005). Glukose som energi er en viktig del av gjenopprettingsprosessen (homeostase) til stressresponsen (Mommsen et al., 1999)

Det ble funnet signifikante økninger i blodglukose mellom pre-stress-fisk og fisk 2, 3, 4, 6, 12 og 24 timer etter stress. Toppen av glukose kom seks timer etter stress, og var på $5,33 \pm 0,38$ mM. Verdien på glukose pre-stress var på $2,87 \pm 0,47$ mM. Tilsvarende pre-stressverdier av glukose ($60 \text{ mg/dl} = 3,33 \text{ mmol/L}$) ble påvist av Fast et al. (2008) på atlantisk laks post-smolt (150 g). I dette forsøket ble det observert signifikant økning i glukose en time etter stress, og disse forble forhøyet i opptil tre timer. Toppen her var på 4,33 mM (ca. 78 mg/dl) Glukosenivåene var tilbake på pre-stressnivå etter 12 timer. Fisken her hadde mye kortere tid før den var tilbake til pre-stressnivå sammenlignet med fisken i dette forsøket. Glukosenivået var ikke tilbake til pre-stressnivå før etter 168 timer etter stress. Fisken i forsøket til Fast et al. (2008) gikk kun gjennom en 15 sekunders lufteksponering, mens fisken i dette forsøket gikk gjennom en lengre og mer omfattende rekke av stressorer, og gir en mulig forklaring på hvorfor det tok mye lenger tid før glukosenivåene var tilbake til pre-stress i dette forsøket.

Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom glukose og plasmakortisol i dette forsøket. En kan likevel se en tendens til at glukose følger kortisol ved å studere grafene. Tidligere studier har også vist tilsynelatende tilfeldige effekter av plasmakortisol på glukose, hvor glukose har både økt, blitt redusert, og forblitt uberørt (Cook et al., 2012; Iversen, 2013; Iversen og Eliassen, 2014; Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997). Årsaken til dette kan være ulik metabolsk status hos fisken før forsøksstart. Sultet eller fôret fisk vil ha forskjellig mageinnhold og blodsukkerkonsentrasjon. Sultet fisk før forsøksstart har vist å påvirke evnen til å starte en glukoserespons, og å øke følsomheten til leveren for adrenergiske stimuleringer (Barton, 2002; Van Heeswijk et al., 2006). Barton (2000) viste at selv om fisk kom fra samme miljøforhold og utsatt for samme stressorer, var det betydelig variasjon i glukoseresponsen. Dette kan tyde på at glukose alene ikke er en pålitelig indikator på sekundære stressresponser. Dette spesielt i fisk, hvor glukose har vist seg å variere mye, og ikke reguleres på samme måte som hos pattedyr (Mommsen et al., 1999). Økte nivåer av glukose kan brukes for å måle akutt stress, men istedenfor en standardnivå, burde plasmaglukose heller sammenlignes med ustresset fisk på grunn av faktorer som blant annet ernæringsstatus og diett (Noble et al., 2018).

4.3.2 Laktat

Laktat er et produkt av glykolysen i cellene når det ikke er tilstrekkelig med oksygen tilgjengelig for en aerob cellemetabolisme (Noble et al., 2018). Konsentrasjonen av laktat i blodet kan teoretisk forklare forholdet mellom laktat og muskelaktivitet, og dermed gjøre rede for det opplevde fysiske stresset. Høye laktatverdier har ofte en sammenheng med for lite tilgjengelig oksygen, og i dette forsøket kan en se en signifikant økning av laktat fra pre-stress til en time etter stress. Laktatverdiene pre-stress var på $5,96 \pm 1,52$ mM, og er noe forhøyet sammenlignet med kontrollverdier av laktat (1,2-5,1 mM) målt i andre studier (Hvas og Oppedal, 2019; Iversen og Eliassen, 2009; Iversen et al., 2005). Etter fire timer etter stress ble topp i laktat målt, og var på $17,48 \pm 3,13$ mM. Tilsvarende påviste Ferguson og Tufts (1992) i et forsøk med regnbueørret laktatverdier på $19,9 \pm 3,9$ mM fire timer etter lufteksponering og sammentrening. Det er også vist laktatverdier over 20 mM etter tung, fysisk trening (Olsen et al., 1995). Andre forsøk gjort på vanlige stressorer som transport og håndtering har vist en laktatopp som varierer fra 4,5-9,5 mM (Basrur et al., 2010; Espmark et al., 2015; Iversen og Eliassen, 2009; Iversen et al., 2005; Sadler et al., 2000). Dette kan tyde på at den mest potente stressoren på laktatnivåene var selve lufteksponeringen, og skyldtes mest sannsynlig liten tilgang på oksygen ved selve lufteksponeringen.

Økning i laktat blir ofte brukt som en indikator på aktivering av HPI-aksen (Wendelaar Bonga, 2011). Det tar litt tid før laktat vises i blodet, da det produseres i muskelcellene. Dette fører til at responsen blir forsinket med noen timer (Noble et al., 2018). Det ble påvist sterk korrelasjon ($p < 0,00001$) mellom laktat og plasmakortisol (0,664, Pearson r). Selve stressresponsen hos fisk medfører adferdsendringer, og ved akutt stress med etterfølgende økning i CA og plasmakortisol vil det utløse en «frys, flukt eller kjemp» respons (Ellis et al., 2012). Laks vil typisk forsøke å flykte med økt bruk av muskelaktivitet, og siden dette er en hvit muskel med lite blodtilførsel vil opphopningen av laktat oppstå hurtig, og i dette forsøket ble laktatresponsen forsterket av lufteksoneringen i forkant av trengingen og transporten. Andre fiskearter som rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*), kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) og torsk (*Gadus mohua*) kan man ikke påvise en klar sammenheng mellom plasmakortisol og laktat og skyldes nok en annen adferd under stress hvor kamuflasje og frysresponsen er sentral (Treasurer et al., 2018)

Siden glukose og laktat blir påvirket av generelle metabolske prosesser utenom stressresponsen, kan det være vanskelig å tolke hvilenivåene. Disse indikatorene er mest brukbare til å måle akutte stressresponser til spesifikke stressorer, som treningsstressorer for laktat. Disse er også forholdsvis billig og enkle å måle, da man kan bruke håndholdte apparater og en liten dråpe blod (Wells og Pankhurst, 1999).

4.3.3 Hemoglobin

Hemoglobin har som hovedoppgave å transportere oksygen i kroppen. Hos atlantisk laks er normale verdier av hemoglobin mellom 8,9-10,4 g/dl (5,52-6,45 mM) (Sandnes et al., 1988). I dette forsøket ble hemoglobin målt $10,30 \pm 0,94$ mM (pre-stress).

Det er forventet at laksefisker øker hemoglobin ved utmattelse, og returnerer til kontrollverdier etter en viss tid. Dette fordi Atlantisk laks og andre laksefisker er aktive og atletiske fisker, med imponerende aerob og anaerob kapasitet (Black et al., 1962; Farrell og Richards, 2009; Hvas og Oppedal, 2017). De har også en sterk adrenergisk dreven respons ved akutt stress for å håndtere og mobilisere hjerte -og blodomløpet hurtig (Barton og Iwama, 1991; Milligan, 1996; Reid et al., 1996), og de høyere hemoglobinnivåene etter stress kan skyldes kontraksjon av milten, og etterfølgende økning i de røde blodcellene (Hvas et al., 2018; Yamamoto, 1988). Milten er et viktig lagringsorgan for blodceller, og kan trekke seg sammen i teleost fisk under akutt stress (Pearson og Stevens, 1991; Ruane et al., 2000). Sammentrekning av milten resulterer frigjøring av blodceller i sirkulasjonen, og kan forklare økninger av erytrocytter (røde blodceller). Tilsvarende økning i hemoglobinnivåer etter en akutt stress er rapportert i andre studier (Olsen et al., 2008; Suski et al., 2007). Sammentrekning av milten er en viktig

mekanisme for å imøtekomme økte energi- og oksygenkrav under stress, siden oksygenets bæreevne i blodet økes betydelig (Hvas et al., 2018). I dette forsøket kan en se signifikant forskjell mellom pre-stress hemoglobin og hemoglobin 1 og 2 timer etter stress. Etter tre timer var nivået på det laveste. I et forsøk gjort av Hvas og Oppedal (2019) ble det dokumentert signifikant økning i hemoglobinkonsentrasjonen etter stress hos Atlantisk laks, for deretter returnere til kontrollnivåer, en time etter stress. Det ble også påvist korrelasjon ($p < 0,001$) mellom hemoglobin og plasmakortisol. Denne sammenhengen kan være forårsaket av plasmakortisol synergistiske effekt på CA og visa versa, siden den akutte mobiliseringen av røde blodceller er under adrenergisk kontroll (Bernier et al., 2009; Wendelaar Bonga, 2011).

Siden forsøket ikke har gjort rede for noen tertiære målinger som dødelighet og vekst, kan en ikke si for sikkert at stressor med lufteksponering, sammentrenging og transport vil påvirke denne stressresponsen. Det kan i midlertidig være lov å spekulere om denne belastningen er i tøffeste laget, og bør minimaliseres. Stressorene som inkluderer lufteksponering er ofte sammensatte, hvor fisken vil oppleve flere stressorer som jaging og sammentrenging sammen med lufteksponering over kort tid. Som nevnt tidligere kan langvarige og omfattende stressorer redusere fiskevelferden, som påvirker vekst og i verste fall forhøyet dødelighet. Ferguson og Tufts (1992) undersøkte dødelighet hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) eksponert for luft i 30 eller 60 sekunder etter utmattelse. Det viste en økt dødelighet fra 38% til 72%. Forskning på normal håndtering som sammentrenging etterfulgt av transport har vist seg å kunne gi en uønsket stressreaksjon og redusert velferd (Barton og Iwama, 1991; Iversen et al., 2005). Man burde derfor ikke introdusere flere stressorer som lufteksponering i denne likningen, denne burde i så fall minimeres, da dette vil øke risikoen for kompromittert fiskevelferd.

5.0 Konklusjon

Resultatene i dette forsøket indikerer at kombinasjonen med lufteksponering, sammentrenging og transport gir en kraftig primær og sekundær stressrespons. ACTH-nivåene var veldig forhøyet før forsøksstart. Disse verdiene gjenspeiler ikke normale hvilenivåer, og ville mest sannsynlig sett annerledes ut viss fisken ikke hadde vært utsatt for sprengningsarbeid i lang tid før forsøksstart. En kunne også se plasmakortisol korrelerte med både laktat og hemoglobin. Dette kan tolkes som at en signifikant økning av plasmakortisol aktiverer en «flykt»-respons, som stimulerer aktivering av disse sekundære stressresponsene. Stressresponsen er til for at fisken skal gjenvinne homeostase. Resultatene for de ulike stressindikatorerne tyder på at alle går tilbake til hvilenivåer, noe som tyder på at stressresponsen var adaptiv. Siden en ikke så på tertiære stressresponser er det vanskelig å si om denne type stressor ville ført til en maladaptiv stressrespons senere. Krevende stressresponser vil kunne gi alvorlige konsekvenser for fiskevelferden, og man kan tenke seg at denne fisken har opplevd dårlig velferd.

6.0 Referanser

- Alsop, D., og 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.
- Arlinghaus, R., Schwab, A., Cooke, S. J., og Cowx, I. G. (2009). Contrasting pragmatic and suffering-centred approaches to fish welfare in recreational angling. *Journal of Fish Biology*, 75(10), 2448-2463. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02466.x
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3), 199-235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001
- Baker, M. R., Gobush, K. S., og 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
- Barton, B. A. (2000). Salmonid Fishes Differ in Their Cortisol and Glucose Responses to Handling and Transport Stress. *North American Journal of Aquaculture*, 62(1), 12-18. doi:10.1577/1548-8454(2000)062%3C0012:SFDITC%3E2.0.CO;2
- 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
- Barton, B. A., og Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26. doi:10.1016/0959-8030(91)90019-G
- Basrur, T., Longland, R., og Wilkinson, R. (2010). Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem*, 36(3), 445-450. doi:10.1007/s10695-009-9314-x
- Bernier, N. J., Flik, G., og 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. V. D. Kraak, A. P. Farrell, og C. J. Brauner (Eds.), *Fish neuroendocrinology* (Vol. 28, pp. 235-311). London: Elsevier.
- Black, E. C., Connor, A. R., Lam, K.-C., og Chiu, W.-G. (1962). Changes in Glycogen, Pyruvate and Lactate in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) During and Following Muscular Activity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 19(3), 409-436. doi:10.1139/f62-024
- Burnley, T., Stryhn, H., og Hammell, K. L. (2012). Post-handling mortality during controlled field trials with marine grow-out Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 368, 55-60. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.006
- Cao, Y., Tveten, A. K., og Stene, A. (2017). Establishment of a non-invasive method for stress evaluation in farmed salmon based on direct fecal corticoid metabolites measurement. *Fish Shellfish Immunol*, 66, 317-324. doi:10.1016/j.fsi.2017.04.012
- Chandroo, K. P., Duncan, I. J. H., og Moccia, R. D. (2004a). Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3), 225-250. doi:10.1016/j.applanim.2004.02.004
- Chandroo, K. P., Yue, S., og Moccia, R. D. (2004b). An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. *Fish and Fisheries*, 5(4), 281-295. doi:10.1111/j.1467-2679.2004.00163.x
- Cook, K. V., Lennox, R. J., Hinch, S. G., og Cooke, S. J. (2015). FISH Out of WATER: How Much Air is Too Much? *Fisheries*, 40(9), 452-461. doi:10.1080/03632415.2015.1074570

- Cook, K. V., O'Connor, C. M., McConnachie, S. H., Gilmour, K. M., og Cooke, S. J. (2012). Condition dependent intra-individual repeatability of stress-induced cortisol in a freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 161(3), 337-343. doi:10.1016/j.cbpa.2011.12.002
- Cooke, S. J., og Cowx, I. G. (2006). Contrasting recreational and commercial fishing: Searching for common issues to promote unified conservation of fisheries resources and aquatic environments. *Biological Conservation*, 128(1), 93-108. doi:10.1016/j.biocon.2005.09.019
- Cooke, S. J., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Raby, G. D., Arlinghaus, R., Danylchuk, A. J., . . . Suski, C. D. (2013). The physiological consequences of catch-and-release angling: perspectives on experimental design, interpretation, extrapolation and relevance to stakeholders. *Fisheries Management and Ecology*, 20(2-3), 268-287. doi:10.1111/j.1365-2400.2012.00867.x
- Davis, M. W. (2002). Key principles for understanding fish bycatch discard mortality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(11), 1834-1843. doi:10.1139/f02-139
- Drangsholt, T. M. K., Gjerde, B., Ødegård, J., Fridell, F., og Bentsen, H. B. (2011). Quantitative genetics of vaccine-induced side effects in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 318(3), 316-324. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.05.044
- Dyrevelferdsloven. (2009). *Lov om dyrevelferd*. (LOV-2009-06-19-97). Retrieved from <https://lovdata.no/lov/2009-06-19-97>
- Ellis, T., Sanders, M., og Scott, A. P. (2013). Non-invasive monitoring of steroids in fishes. *Veterinary Medicine Austria*, 100(9-10), 255-269. Journal Article.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., og Martins, C. I. M. (2012). 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., og Nilsson, J. (2015). *Pumping og håndtering av smolt*. Retrieved from <https://nofima.no/publikasjon/1226450/>
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Roma: Food and Agriculture Organisation of the United Nations Retrieved from <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
- Farbridge, K., og Leatherland, J. (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
- Farrell, A. P., og Richards, J. G. (2009). Defining Hypoxia: An Integrative Synthesis of the Responses of Fish to Hypoxia. In J. G. Richards, A. P. Farrell, og C. J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 27, pp. 487-503): Academic Press.
- Farrell, A. P., Tang, S., Nomura, M., og Brauner, C. J. (2010). Toward Improved Public Confidence in Farmed Fish: A Canadian Perspective on Fish Welfare during Marine Transport. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(2), 225-239. doi:10.1111/j.1749-7345.2010.00350.x
- Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., og 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 and Shellfish Immunology*, 24(2), 194-204. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.009
- FDIR. (2019a, 24.10.2019). Laks, regnbueørret og ørret - matfiskproduksjon, Beholdning av laks, regnbueørret og ørret per 31. desember etter fylke. Retrieved from <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret/Matfiskproduksjon>

- FDIR. (2019b, 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., og 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
- Fiskeridirektoratet. (2003). *Nøkkeltall fra norsk havbruksnæring 2002*. Retrieved from file:///C:/Users/Benedikte/Downloads/nokkeltall-havbruk-2002%20(1).pdf
- Fiskeridirektoratet. (2019). *Nøkkeltall fra norsk havbruksnæring 2018*. Retrieved from file:///C:/Users/Benedikte/Downloads/nokkeltall-havbruk-2018%20(2).pdf
- Flik, G., Klaren, P. H. M., Van den Burg, E. H., Metz, J. R., og Huising, M. O. (2006). CRF and stress in fish. *Gen Comp Endocrinol*, 146(1), 36-44. doi:10.1016/j.ygcen.2005.11.005
- Forskrift om lakselusbekjempelse. (2012). *Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg*. (FOR-2018-04-19-674). Retrieved from <https://lovdata.no/forskrift/2012-12-05-1140>
- Fraser, D., Weary, D., Pajor, E. A., og Milligan, B. N. (1997). *A scientific concept of animal welfare that reflects ethical concerns* (Vol. 6).
- Funk, V. A., Jones, S. R. M., Kim, E., Kreiberg, H., Taylor, K., Wu, S., og Young, C. (2004). The effect of vaccination and sea water entry on immunocompetence and susceptibility to *Kudoa thyrsites* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 17(4), 375-387. doi:10.1016/j.fsi.2004.04.014
- Gómez, M. P. G., Marín Arribas, S. L., og Vargas-Chacoff, L. (2016). Stress response of *Salmo salar* (Linnaeus 1758) facing low abundance infestation of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000), an object in the tank, and handling. *Journal of Fish Diseases*, 39(7), 853-865. doi:10.1111/jfd.12419
- Goymann, W., og Wingfield, J. C. (2004). Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Animal Behaviour*, 67(3), 591-602. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.08.007>
- Gudding, R., Lillehaug, A., og Evensen, Ø. (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1-2), 203-212. doi:10.1016/S0165-2427(99)00133-6
- Havforskningsinstituttet. (2019). *Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2019*. Retrieved from <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/fisken-og-havet-2019-5>
- Huntingford, F. A., og Kadri, S. (2008). Welfare and fish. In E. J. Branson (Ed.), *Fish welfare* (pp. s. 19-32). Oxford, UK: Blackwell Publising Ltd.
- Hvas, M., Nilsen, T. O., og Oppedal, F. (2018). Oxygen Uptake and Osmotic Balance of Atlantic Salmon in Relation to Exercise and Salinity Acclimation. *Frontiers in Marine Science*, 5. doi:10.3389/fmars.2018.00368
- Hvas, M., og Oppedal, F. (2017). Sustained swimming capacity of Atlantic salmon. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 361-369. doi:10.3354/AEI00239
- Hvas, M., og Oppedal, F. (2019). Physiological responses of farmed Atlantic salmon and two cohabitant species of cleaner fish to progressive hypoxia. *Aquaculture*, 512. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734353
- Iversen, M. (2013). *Stress and its impact on animal welfare during commercial production of Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. (Doktorgradsavhandling, Universitetet i Nordland). Bodø.

- Iversen, M., og Eliassen, R. (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
- Iversen, M., og 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., og 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., og 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., Eliassen, R. A., Martens, L. G., og Chile, A. R. C. (2004). *Transport of Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts in Puerto Montt, Chile : the effects of high and low transport densities on primary, secondary and tertiary stress responses* (Vol. nr 18/2004). Bodø: Nordlandsforskning.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., og 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:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00111-X)
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., Eliassen, R. A., Carlsen, K. T., og 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:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.019>
- Iversen, M., Finstad, B., og Nilssen, K. J. (1998). Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168(1), 387-394. doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00364-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00364-0)
- Kvistad, A. (2018, 14. februar). Dødeligheten på laks går ned. Retrieved from <https://sjomatnorge.no/dodeligheten-pa-laks-gar-ned/>
- Lund, V., Mejdell, C. M., Rocklinsberg, H., Anthony, R., og Hastein, T. (2007). Expanding the moral circle: farmed fish as objects of moral concern. *Dis Aquat Organ*, 75(2), 109-118. doi:10.3354/dao075109
- McEwen, B. S., og Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1), 2-15. doi:10.1016/S0018-506X(02)00024-7
- Mellor, D. J., og 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
- Milligan, C. L. (1996). Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 113(1), 51-60. doi:10.1016/0300-9629(95)02060-8
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., og Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms and action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268. doi:10.1023/a:1008924418720
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarević, J., og Gismervik, K. (2018). *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd* (2. rev. utg. ed.). Tromsø: Nofirma.

- Norges Sjømatråd. (2020). Nøkkeltall. Retrieved from <https://nokkeltall.seafood.no/>
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y., og Skjermo, J. (2012). *Verdiskaping basert på produktive hav i 2050*. Retrieved from <https://www.regjeringen.no/globalassets/upload/fkd/vedlegg/rapporter/2012/verdiskaping-rapport-010812.pdf?id=2322968>
- Olsen, R. E., Sundell, K., Ringø, E., Myklebust, R., Hemre, G.-I., Hansen, T., og Karlsen, Ø. (2008). The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture*, 280(1-4), 232-241. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.05.006
- Olsen, Y. A., Einarsdottir, I. E., og Nilssen, K. J. (1995). Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134(1-2), 155-168. doi:10.1016/0044-8486(95)00008-P
- Pearson, M., og Stevens, E. (1991). Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem*, 9(1), 39-50. doi:10.1007/BF01987610
- Pelletier, C., Hanson, K., og Cooke, S. (2007). Do Catch-and-Release Guidelines from State and Provincial Fisheries Agencies in North America Conform to Scientifically Based Best Practices? *Environmental management*, 39, 760-773. doi:10.1007/s00267-006-0173-2
- Pickering, A., og Pottinger, T. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*, 7(1-6), 253-258. doi:10.1007/BF00004714
- Pottinger, T. G., og Carrick, T. R. (2001). ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 129(2-3), 399-404. doi:10.1016/S1095-6433(00)00357-3
- Reid, S. G., Vijayan, M. M., og Perry, S. F. (1996). Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165(8), 665-676. doi:10.1007/BF00301135
- 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
- Rothwell, S., Black, S., Jerrett, A., og Forster, M. E. (2005). Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.*, 140(3), 289-298. doi:10.1016/j.cbpb.2005.01.007
- Rotllant, J., Ruane, N. M., Caballero, M. J., Montero, D., og Tort, L. (2003). Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 136(3), 613-620. doi:10.1016/S1095-6433(03)00211-3
- Ruane, N. M., Nolan, D. T., Rotllant, J., Costelloe, J., og Wendelaar Bonga, S. E. (2000). Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the infective stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor. *Fish Shellfish Immunol*, 10(5), 451-463. doi:10.1006/fsim.1999.0260
- Sadler, J., Wells, R. M. G., Pankhurst, P. M., og Pankhurst, N. W. (2000). Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 184(3), 349-361. doi:10.1016/S0044-8486(99)00321-X
- Sandnes, K., Lie, Ø., og Waagbø, R. (1988). Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 32(1), 129-136. doi:10.1111/j.1095-8649.1988.tb05341.x

- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocrinol*, 165(3), 549-556. doi:10.1016/j.ygcen.2009.07.004
- Singley, J. A., og Chavin, W. (1975). The adrenocortical-hypophyseal response to saline stress in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 51(4), 749-756. doi:10.1016/0300-9629(75)90051-1
- Singley, J. A., og Chavin, W. (1976). The diel rhythm of circulating ACTH titer in the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 53(3), 291-293. doi:10.1016/s0300-9629(76)80038-2
- Skinner, L. A., Lapatra, S. E., Adams, A., Thompson, K. D., Balfry, S. K., McKinley, R. S., og Schulte, P. M. (2010). Supra-physiological levels of cortisol suppress lysozyme but not the antibody response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following vaccine injection. *Aquaculture*, 300(1), 223-230. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.01.002
- Sneddon, L. U. (2006). Ethics and Welfare: Pain Perception in Fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26(1):6-10. Journal Article.
- Sokal, R. R., og Rohlf, F. J. (1987). Introduction to biostatistics. In (pp. 178-179). New York: Freeman.
- Statsminister, E. S. (2018). Havbruksnæringen i samfunnet. Retrieved from <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/havbruksnaringen-i-samfunnet/id2598313/>
- Sumpter, J. P., Dye, H. M., og Benfey, T. J. (1986). The effects of stress on plasma ACTH, α -MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *Gen Comp Endocrinol*, 62(3), 377-385. doi:10.1016/0016-6480(86)90047-X
- Suski, C. D., Cooke, S. J., Danylchuk, A. J., O'Connor, C. M., Gravel, M.-A., Redpath, T., . . . Goldberg, T. L. (2007). Physiological disturbance and recovery dynamics of bonefish (*Albula vulpes*), a tropical marine fish, in response to variable exercise and exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 148(3), 664-673. doi:10.1016/j.cbpa.2007.08.018
- Swift, D. J. (1982). The measurement of acth in the plasma of rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*) using two commercial radioimmunoassay kits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 72(4), 679-681. doi:10.1016/0300-9629(82)90147-5
- Takle, H. R., Ytteborg, E., Nielsen, K. V., Karlsen, C. R., Nilsen, H. K., Sveen, L., . . . Nilsen, A. (2015). *Sårproblematikk og hudhelse i laks- og regnbueørrettoppdrett*. Retrieved from Tromsø: <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900989>
- Treasurer, J. W., Noble, C., Puvanendran, V., Planellas, S. R., og Iversen, M. (2018). Cleaner fish welfare. In (pp. 281-312). Sheffield: 5m Publishing, 2018.
- Van Heeswijk, J. C. F., Vianen, G. J., og van Den Thillart, G. E. E. J. M. (2006). The adrenergic control of hepatic glucose and FFA metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Increased sensitivity to adrenergic stimulation with fasting. *Gen Comp Endocrinol*, 145(1), 51-61. doi:10.1016/j.ygcen.2005.07.001
- Wells, R. M. G., og Pankhurst, N. W. (1999). Evaluation of Simple Instruments for the Measurement of Blood Glucose and Lactate, and Plasma Protein as Stress Indicators in Fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(2), 276-284. doi:10.1111/j.1749-7345.1999.tb00876.x
- 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 | Hormone Response to Stress. In *Encyclopedia of Fish Physiology* (Vol. 2, pp. 1515-1523): Elsevier.
- Wingfield, J. C. (2005). The concept of allostasis: coping with a capricious environment. *Journal of Mammalogy*, 86(2), 248-254, 247. doi:10.1644/BHE-004.1

Yamamoto, K. I. (1988). Contraction of spleen in exercised freshwater teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 89(1), 65-66. doi:10.1016/0300-9629(88)91139-5