

Sluttrapport:

**Levendekjøling med CO2 effekt av vannkvalitet på stressresponsen hos
oppdrettslaks.**

Av

Atle Foss, Endre Grimsbø, Anders Mangor Jenssen og Bjørn Roth

Introduksjon

Fra Januar 2010 skulle forskriftene om bedøvelse og avliving av oppdrettsfisk gitt av det norske Fiskeri- og kystdepartementet (FKD) i 2006, trådt i kraft. I den forbindelse skulle bruk av CO₂ eller annen gass prinsipielt være forbudt brukt til bedøvelse og avliving av fisk, men fortsatt lovlig brukt til sedering (beroligelse). For levendekjøling eksisterte det kun vage formuleringer for reguleringer om mulige hastigheter for temperaturfall. I et brev fra Fiskeri og havbruksnæringens landsforbund (FHL) til FKD den 24.09.09 ble det understreket at det ikke fantes tilstrekkelig dokumentasjon for at FKD kunne regulere levendekjøling og gassbruk ut fra dyrevernmessige hensyn. Samtidig har et ekspertpanel i European Food Safety Association (EFSA)¹ gjennomført en risikoanalyse på velferden hos Atlantisk laks under slakt. I likhet med norske forskrifter klarer heller ikke EFSA å kvantifisere betydningen av hverken temperaturfall eller gassbruk. Dette resulterte i at FKD ved brev (15.10.2009) ba Mattilsynet om å utsette forbudet inntil det forelå mer kunnskap og bedre dokumentasjon m.h.p. velferdsaspektene knyttet til praktisk gjennomføring av bedøvelse med alternative metoder, bl.a. ved bruk av eksisterende teknologi, samt at alternativ bruk av gass ble utredet.

Den største faglige utfordringen i denne sammenheng er at toleransegrenser for CO₂ i sjøvann ikke er kjent for laks og en har stort sett basert kunnskapen på de erfaringer som er gjennomført ved norske slakterier, hvor fisken i tillegg utsettes for en rekke andre påkjenninger, som for eksempel trengning og pumping²⁻⁶. Det har dermed vært vanskelig å bestemme effektene av enkeltfaktorer i slakteprosessen. I forbindelse med et samarbeid mellom industri- og forskningsaktører i det NFR-finansierte KMB-prosjektet '*Welfare of Farmed Fish from Harvest to Killing- Meeting the Future Challenge (Farewell)*' og SVANS med støtte fra bl.a Marine Harvest ble det i mars 2010 gjennomført en serie pilotforsøk på stress og bedøvelse hos laksefisk eksponert for forskjellige konsentrasjoner av gasser som nitrogen (N₂), karbondioksid (CO₂) og karbonmonoksid (CO) mot kontrollgrupper på enten friskt sjøvann eller pH manipulert sjøvann (reduisert pH v.h.a. HCl). Resultatene var oppsiktsvekkende. Her ble det vist, at med tilstrekkelige pO₂ nivåer kunne en både sedere og bedøve fisk med CO₂ uten nevneverdig utslag på velferden målt i adferd, laktat eller cortisol respons. I likhet med pilotforsøkene viste videre studier gjennomført i Farewell-prosjektet at laksefisk har langt større toleranse for temperaturfall enn tidligere antatt⁷. I nevnte prosjekt ble det funnet at laks tåler et fall på så mye som 12 °C i løpet av kun 30 minutter, men at et hurtig temperaturfall utover dette gav et dramatisk fysiologisk utslag. Like interessant er det at de sekundære stressresponser gjennom håndtering inn i ulike temperaturer også ble redusert ved lavere temperaturer, hvor største utslag på stress ble observert ved høye temperaturer⁷. På kjølesiden viser dette at 12 graders temperaturfall klart er innenfor rammen for hva som er velferdsmessig og kommersielt akseptabelt i en tidlig fase av kjøling. Disse forsøkene demonstrerer nødvendigheten av å ha eksakt kunnskap om hvordan enkelte forhold rundt slakte-prosessen virker inn på fisken, før oppdrettsnæringen tvinges til å måtte bruke store økonomiske ressurser i omstillingsprosessen.

Temperatur er den parameteren som kontrollerer og begrenser alle fysiologiske og adferdsmessige mekanismer hos ektoterme organismer og beskrives som den abiotiske hovedfaktor for fisk⁸. Fisk er i all hovedsak i stand til å tilpasse seg til gradvise endringer i temperatur innenfor et gitt spredningsområde, vanligvis forårsaket av naturlige sesong- og tidevannsavhengige svingninger i vertikale vannlag. Raske økninger eller senkninger kan imidlertid forårsake fysiologiske og adferdsmessige forstyrrelser og ha en vesentlig effekt på fiskens velferd⁹⁻¹². Imidlertid viser en rekke

nyere studier at det er de fysiske-mekaniske belastningene som ofte forekommer i tid nær en kjøleprosess, d.v.s. faktorer som flytting, trengning og pumping, som har en negativ effekt på fisken^{7;13}. Liknende effekter har også tidligere blitt påvist ved økte tettheter, d.v.s. trengning² og det hersker ingen tvil om at de rent fysiske belastningene fisken opplever i en slik prosess, ikke alltid er tilfredsstillende slik praksisen er i dag. For vannkvalitet og gass er det kjent at fisk har chemoreseptorer for CO₂ på første gjellebue, og en aktivering av disse vil medføre frigjøring av katekolaminer, økende blodtrykk og ventilasjonsrate¹⁴. Dette er en naturlig fysiologisk reaksjon for å sikre økt H⁺ ekskresjon kombinert med økning av bikarbonatnivået for å regulere syre-base balansen med et økt CO₂-nivå i blodet. De tidligere omtalte velferdskriteriene ved bruk av CO₂ gjelder i all hovedsak de eksterne forhold rundt endring i vannets pH¹⁵⁻¹⁷, ettersom et økt CO₂ nivå eller acidose i blod i seg selv ikke vil utløse de primære stressresponser hos fisken¹⁴, men moduleres gjennom hypoksi¹⁸. Dermed vil velferdskriteriene hos fisk i en kjøletank være mer avhengig av sjøvannets pH og pO₂ som igjen blir regulert gjennom løst CO₂ og NH₄⁺, samt O₂-nivå enn av selve partialtrykket av CO₂ både i vann og blod. I praksis betyr dette at så lenge pH/O₂ er innenfor toleransenivået for fisken, kan en teoretisk inducere en tilstand av hypercapnia som fordelaktig reduserer fiskens evne til å respondere på omgivelsene.

Gjennom et forskningsprosjekt støttet av Regionalt Forskningsfond Vestlandet, FHF og Marine Harvest, har en hatt som mål å undersøke i større detalj effekten av levendekjøling og CO₂ på velferden hos laksefisk. I dette prosjektet ble det satt opp 4 delmål som skulle kartlegge bruken av levendekjøling og CO₂ under ulike bruk. Disse omfatter:

Delmål 1: Kvantifisere toleranse for variabel vannkvalitet: Fisk vil under kontrollerte betingelser utsettes for ulike vannkvaliteter (med samtidig varierte nivå av CO₂, O₂, NH₄⁺ og pH) for å avdekke fysiologiske og respiratoriske grenseverdier hvor primære og sekundære stress- responser utløses, hormonelt eller genetisk.

Delmål 2: Reduksjon av stress ved kombinert gass- og temperatursedering: Avdekke i hvilken grad tilsetning av gass (CO₂, O₂ og N₂), fiskens egen utskillelse av CO₂ og konsum av O₂, samt senkning av temperatur innen gitte toleranseområder positivt kan redusere fiskens evne til å respondere mot gitte stressorer som lavt oksygeninnhold og fysisk-mekanisk belastning. Dette for å kunne bli i stand til å kvantifisere velferdsgevinst i alle ledd fra transport, via pumping, sedering, bedøvelse og avlivning.

Delmål 3: Optimalisere levendekjøling under transport: Gjennomføre sammenlignbare studier av fisk under lukket vs. åpen kjøletransport og studere betydningen av dette under slakt.

Delmål 4: Kjøling under slakt- Effekter på kvalitet: Optimaliserte kjøle- og gassbetingelser gitt fra øvrige delmål vil testes ut i kommersiell skala hvor total velferd og kvalitet undersøkes.

Prosjektet består i hovedsak av 2 deler. Del 1 omfatter hvordan levendekjøling m/ CO₂ påvirker fisk i slakteprosessen og del 2 omfatter forsøk med kjøling og CO₂ i tunnel-respirometer slik at en kan måle fiskens direkte fysiologiske respons for ulike vannparametere.

Del I: Forsøk med Tunell respirometer på kjøling og CO2

Bakgrunn

I forsøkene ønsket man å undersøke effekten av nedkjøling og CO2 tilsetning på atferd og fysiologi til laks i forbindelse med sedasjon før slakting. Hensikten med nedkjøling har vært både å sedere fisken og å redusere fiskens aktivitet og bedre kvaliteten ved at en får mindre slagskader, mindre laktatproduksjon, mindre pH-fall og lengre prosesseringstid før dødsstivheten inntreffer (Skjervold et al 2002). Levende fisk blir raskere nedkjølt enn død fisk ved at blodet kjøles ned over gjellene og transporteres ut i kroppen. I Norge er det flere slakterier som praktiserer levendekjøling ved at fisk pumpes fra brønnbåt til RSW tank hvor temperaturen er 1°C. Brønnbåter i Skottland kjøler fisk en grad hver time på vei til slakteriet, hvor fisken så pumpes direkte til slakting. Overføring av fisk fra høy til lav temperatur er vist å være akseptabel når ikke temperaturspranget er for stort eller sluttemperaturen er for lav. Direkte overføring fra 16-4 °C er akseptabelt, mens ved direkte overføring fra 16-0°C så finner en at flere fisker dør, og laktatnivået blir høyt (Foss et al., 2012). Gradvis nedkjøling av laks fra over 1 h og fra 16-0°C over 5 timer ga relativt lav stressrespons, mens nedkjøling i løpet av 1 time ga sterke stressrespons og store problemer med respirasjon og osmoregulering (Foss et al. 2012). Nedkjøling har likevel ikke vært tilstrekkelig sedasjon for å immobilisere fisken før slakting. I mange tilfeller går fisken gjennom en slagmaskin som skal gjøre fisken bevisstløs før bløgging. Dersom fisken ikke er immobilisert før slag, kan dette medføre feilslag uten tap av bevissthet før bløgging. Dette er ikke akseptabelt i forhold til slakteforskrifter.

I tillegg til nedkjøling har det derfor vært vanlig å benytte tilsetning av CO2 i sedasjonsbadene før slakting. Ved denne behandlingen har man visuelle observasjoner på at fisken reagerer med stressrespons. Det har likevel vært usikkert hva som er årsaken til responsen. Dette har vært hovedbakgrunnen for forsøkene som har blitt gjennomført med svømmetunellen.

Ved bruk av svømmetunell kan man utføre svært spesifikke og kontrollerte forsøk. Vannkvalitet (temperatur og pH) kan reguleres svært nøyaktig, og fiskens respons på endringer i vannkvalitet kan registreres og dokumenteres.

Oppsett

Det ble benyttet en svømmetunell av typen SWIM 32 fra den danske produsenten Loligo. Svømmetunellen var tilkopledd vanntilførsel med mulighet for 4 ulike temperaturer, der den laveste var 6 °C. I tillegg ble det laget en stor prosesstank der både temperatur og pH (CO2 tilførsel) kunne justeres etter behov). Vann fra prosesstanken kunne ledes inn til svømmekammeret i tunellen via pneumatiske ventiler. Alle funksjoner som vannhastighet, pumper og ventiler ble styrt eksternt via grensesnittet Labview slik at forsøksleder ikke måtte oppholde seg i nærheten av tunellen, og dermed påvirke fisken.

Tunellen var også utstyrt med O2 probe (Optode – Aanderaa instruments, Norge) og pH probe (Endress & Hauser, Tyskland).

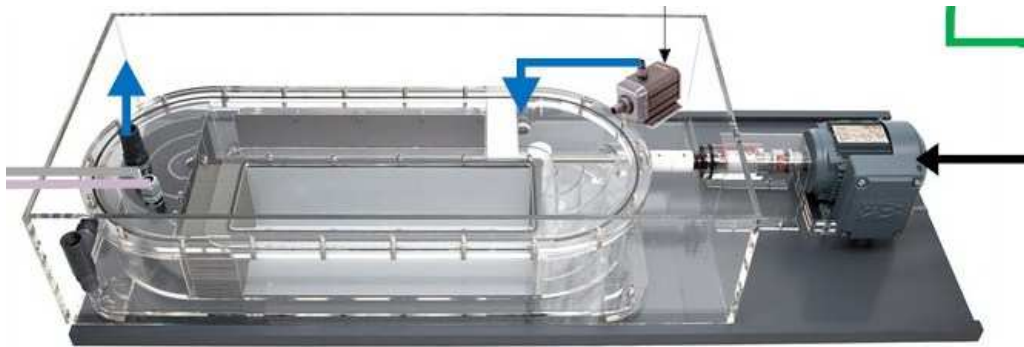


Fig 1. Svømmetunell.

Gjennomføring

Det ble benyttet laks i størrelsen 300-500 gram som på forhånd var oppstallet ved stasjonen i Austevoll. Før hvert forsøk ble enkeltfisk flyttet over i tunellen hvor den akklimerer i minimum ett døgn. Under akklimering var tunellen tilkoplek eksternt vann på ca 8 °C. Vannhastigheten ble individuelt tilpasset slik at fisken viste god svømmeatferd. Dette kunne variere noe fra fisk til fisk. Ved forsøksstart ble det målt oksygenopptak ved standard betingelser (temp, vannhastighet). I den første forsøksserien ble det benyttet nedkjølt vann uten tilsetninger av CO₂. Etter den initielle målingen av oksygenopptak, ble vann fra prosesstanken ført inn i tunellens svømmekammer der fiske oppholdt seg. Etter ca 30 minutters stabilisering av O₂ proben, ble fall i oksygen målt over en periode på ca 30 minutter. Fall i oksygen i tunellen ble omregnet til O₂ opptak/fisk, og videre til vekt spesifikt opptak.

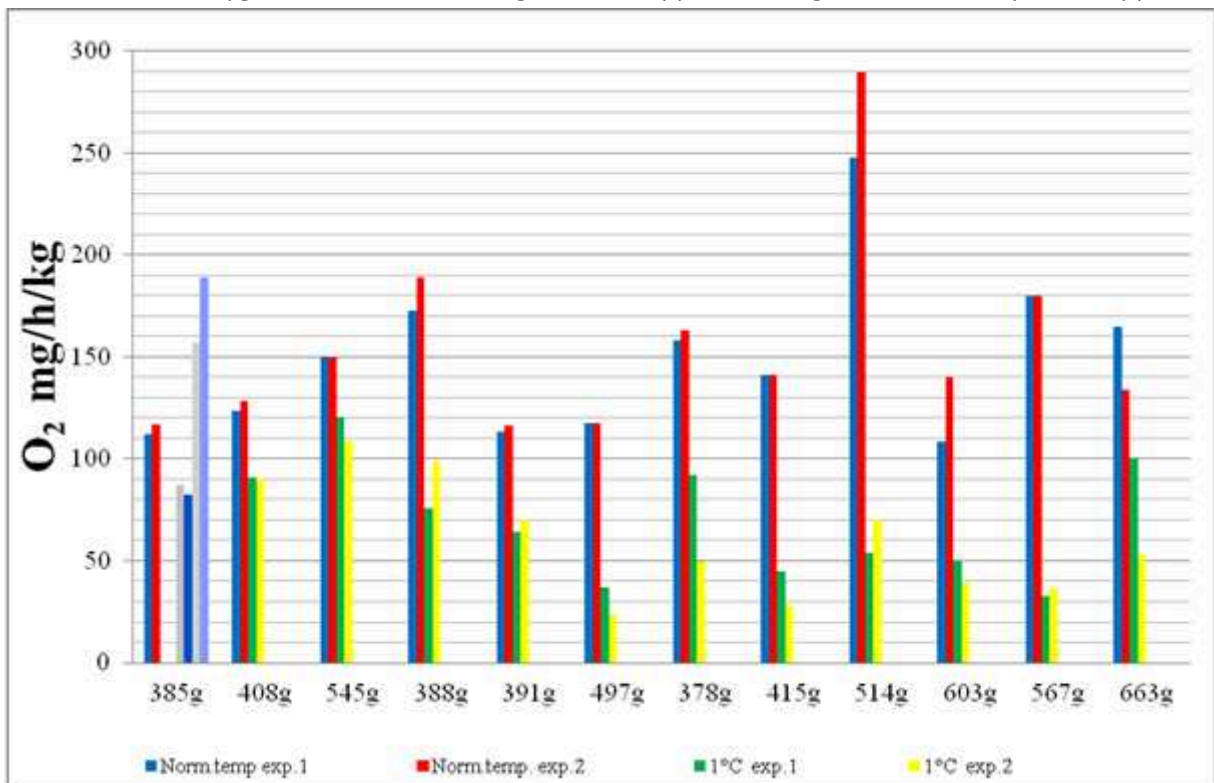
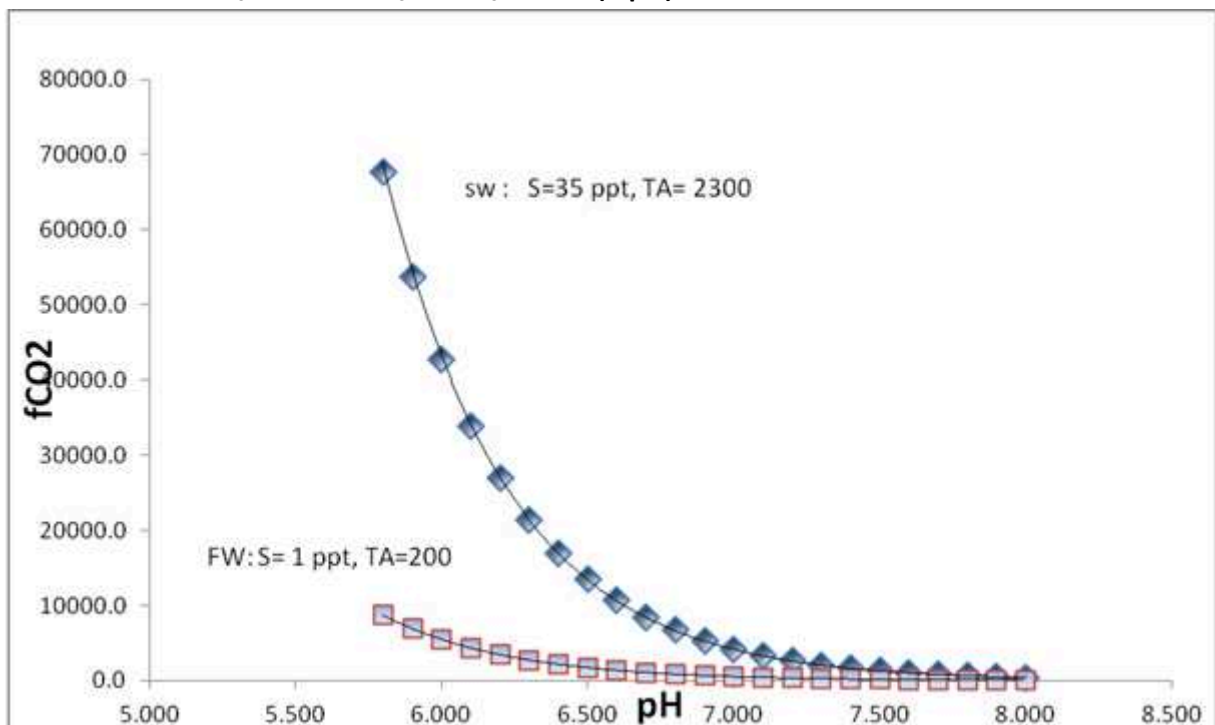
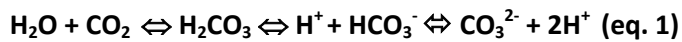


Fig. 2. Oksygen opptak før og etter kjøling

Som vist i figur 2, er det et betydelig fall i oksygen opptak etter nedkjøling. Dette gjenspeiles også i fiskens atferd, der den i de fleste tilfellene ikke klarte å opprettholde svømmehastigheten på ca 1

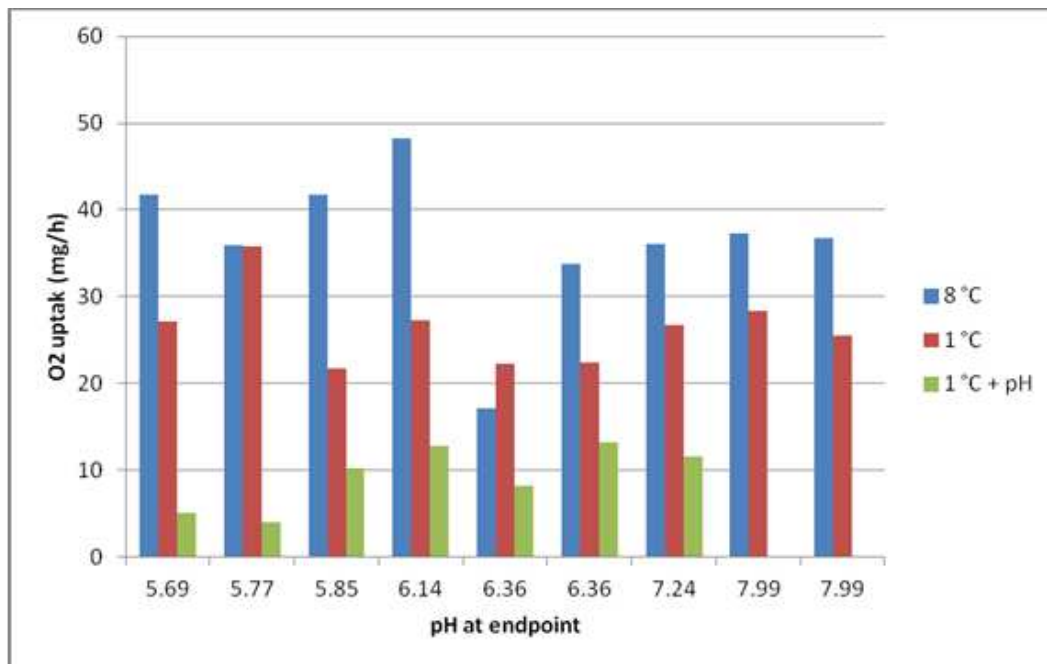
kroppslengde pr. sekund. Som figuren viser resgerte enkelte av fiskene med svært redusert oksygenopptak. Videoopptakene viser imidlertid at fisken virker "normal" med med redusert svømmeatferd.

I neste forsøksrunde ble det i tillegg til kaldt vann benyttet CO₂. Prosedyren for forsøkene var som beskrevet over, men etter at oksygenopptak var målt ved lav temperatur, ble det tilsatt CO₂ gass til det resterende volumet av prosesstanken. Innblanding av CO₂ i vann går relativt raskt, og det reagerer med vannmolekylene til karbonsyre (H₂CO₃), bikarbonat (HCO₃⁻) og karbonat (CO₃²⁻). En del av CO₂'et vil også foreligge som løst gass.



Figur 3. Innhold av CO₂ som funksjon av pH i saltvann og ferskvann.

Etter hvert som CO₂ løses i vann vil pH synke som følge av dannelsen av karbonsyre, men siden karbonsyre er en svak syre vil den laveste oppnåelige pH ligge på ca 5,5 i sjøvann med 34 ppt saltholdighet og 1 °C. Saltvann har normalt en høyere evne til å løse CO₂ på grunn av bufferkapasitet (Fig.3) (høyere alkalinitet). Etter at oksygenopptak ved lav temperatur var gjennomført, ble CO₂ vann tilført tunnelen på samme vis som kaldt vann. pH i tunnelen ble nøye overvåket gjennom hele forsøket.



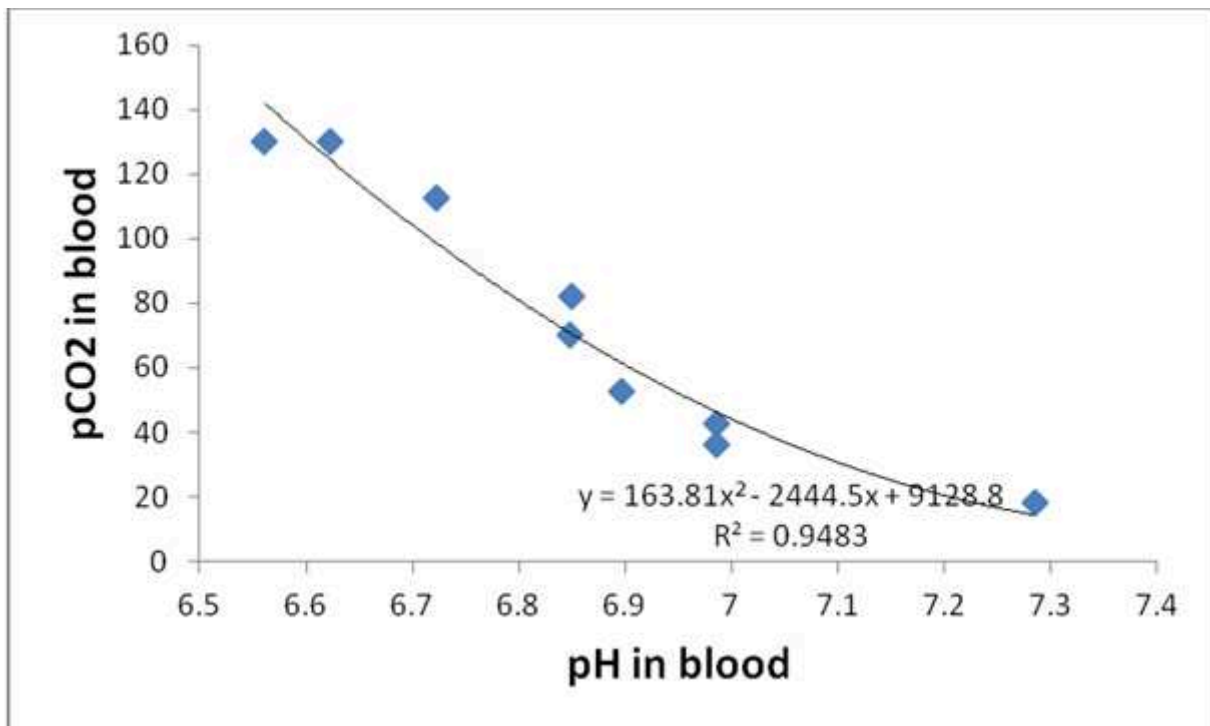
Figur 3. Oksygen optak ved ulike temperatur og pH.

Resultatene fra pH forsøkene viste at det er en del variasjon i oksygenopptak mellom individene. I gjennomsnitt finner man en reduksjon fra 36 mg/h til 26 mg/h ved å senke temperaturen fra 8 til 1 °C. Ved å redusere pH fra 8 til 6 oppnås en ytterligere reduksjon i oksygenopptak til 9 mg/h. Ved de to laveste pH'ene er oksygenopptaket redusert til ca 10% av opptaket ved 8°C.

Ved alle forsøkene som ble utført med CO₂ ble det observert stressrespons og fluktreaksjoner allerede ved svært moderate pH endringer. Oksygenmetningene ble nøye overvåket, og var aldri under 90% i svømmekammeret.

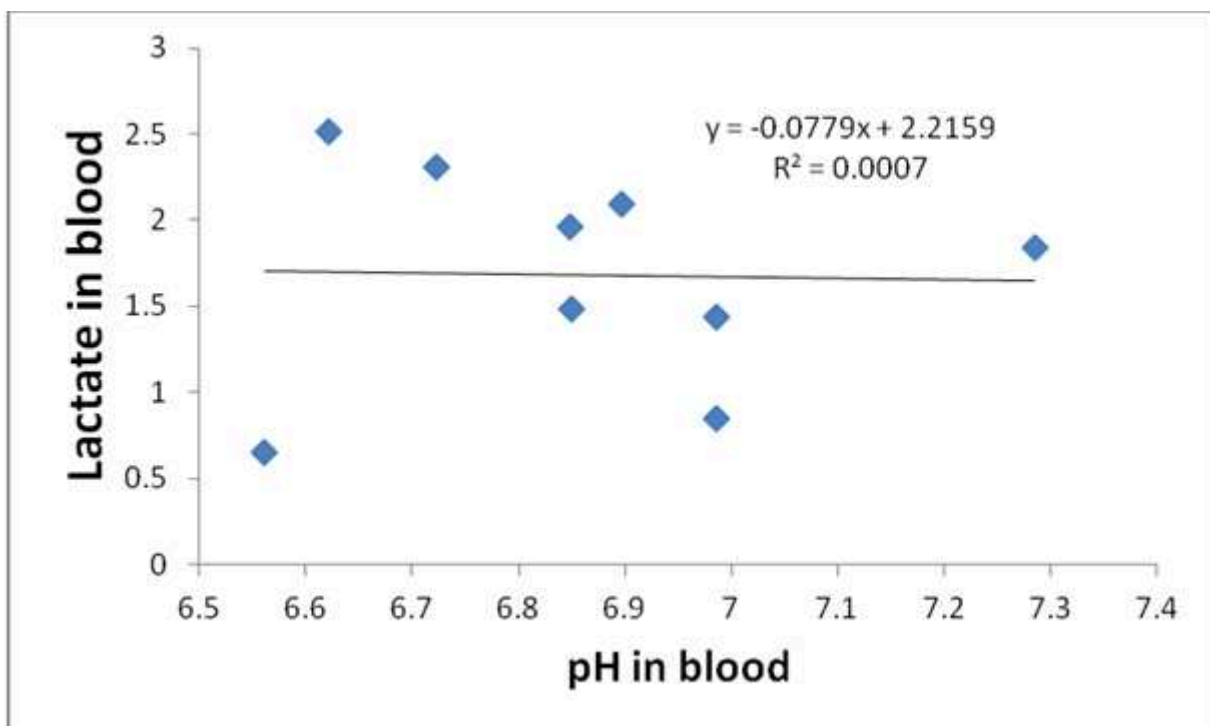
Blodeverdier

Etter at hver fisk var ferdig målt i svømmetunellen ble den hurtig tatt opp fra svømmekammeret og avlivet med et slag i hodet. En blodprøve på ca 1 ml ble deretter tatt fra hjertet, og innen 2 minutter analysert på I-STAT. Dette instrumentet er kalibrert for klinisk bruk innen human medisin, og vil ikke gi helt korrekte verdier for blodgasser ved lavere temperaturer. Verdiene vil likevel vise endringer som skjer i forhold til eksterne faktorer. Det viste seg i enkelte tilfeller å være vanskelig å få analysedata dersom temperaturen var for lav. Det ble benyttet to ulike kassetter til I-STAT CG4+ og CG8+ . CG8+ dekker de samme parametrene som CG4+ bortsett fra laktat.

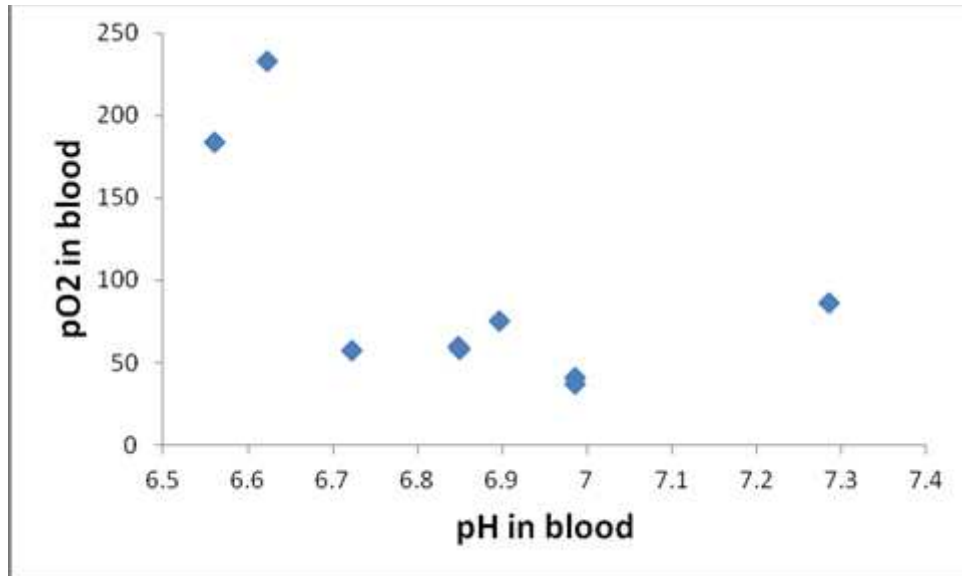


Figur 4. Verdier av pCO₂ i blodprøve etter CO₂ behandling i tunell.

Figur 4 viser at det er en klar sammenheng mellom pH i blod og oppløst CO₂. Dette er ikke uventet, og bekrefter at blodet blir surere som følge av CO₂ og ikke laktat (fig. 5). Lactate ble i tillegg målt med en Lactate Pro blodanalyser som gav bekreftende resultater til I-STAT'en. Som vist i figur 5, er det ingen sammenheng mellom pH i blod og laktatverdier.

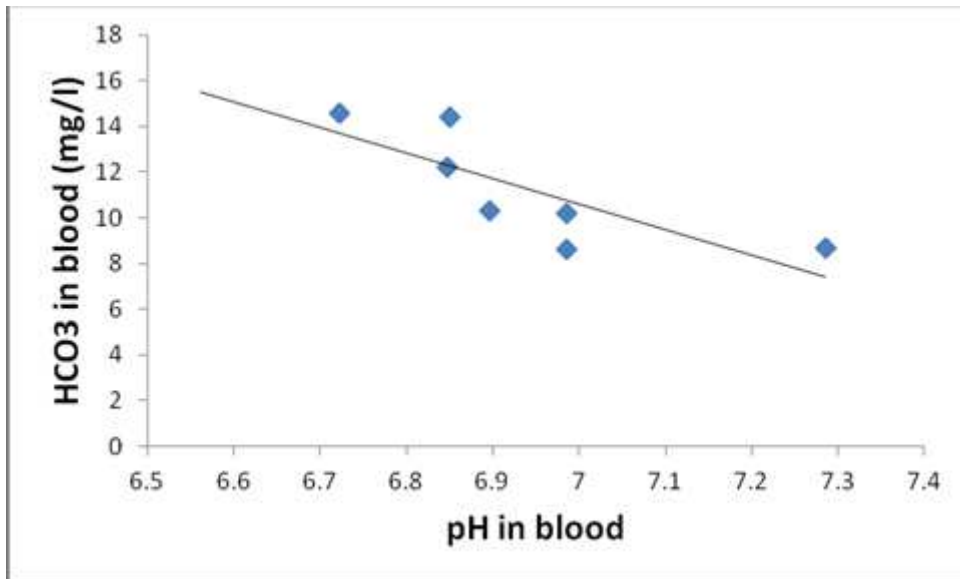


Figur 5. Laktat verdier i helblod.



Figur 6. pO2 i helblod

Som vist i fig. 6 synes det å være liten sammenheng mellom oksygeninnhold i blod og pH. Blodets evne til å binde oksygen avtar med synkende pH på grunn av lavere affinitet til hemoglobinet. De relativt lave verdiene skyldes at blodet er tatt fra den venøse delen av systemet. To verdier skiller seg ut ved de laveste pH'ene. Disse verdiene er 4 ganger høyere enn ved høyere pH og kan tyde på at det er et resultat av en root effekt som man vanligvis forbinder med fylling av svømmeblære. Dette er imidlertid usikkert, spesielt fordi laks har liten eller ingen evne til å fylle svømmeblære fysiologisk – den tar luft fra overflaten.



Figur 7. Bikarbonat i helblod (I-STAT)

Når pH i blodet synker som følge av hypercapnia eller økt laktat som følge av anaerob metabolisme, vil det normalt frisettes bikarbonat fra de røde blodcellene for å buffre systemet. I forsøkene med CO₂ ser man en forventet økning i bikarbonat verdiene etter eksponering for økt CO₂. Dette sammenfaller også med de målte pH verdiene i blodet.

Det ble ikke registrert systematiske endringer i Na, K eller Ca etter behandling med CO₂.

Atferd

Ved forsøksstart ble fisken plassert i tunellen, og vannhastighetene ble satt til ca 1 kroppslengde pr. sekund. Dette er en hastighet som fisken under normale omstendigheter ikke har problemer med å følge. Etter å ha oppholdt seg i tunnelen i minst 24 timer ved denne hastigheten, ble hastigheten justert slik at fisken hadde normal "cruising" atferd, dvs svømmer med jevne bevegelser uten å komme borti bunn eller sider av svømmekammeret. Ved utmattelse eller ved for høy vannhastighet vil fisken "legge seg bakpå" med halefinnen hvilende mot bak-risten. I slike tilfeller må enten forsøket avsluttes (ny fisk), eller vannhastigheten reduseres til fisken svømmer normalt. Ved nedkjøling ble fisken i de fleste tilfeller noe "tregere", og vannhastigheten måtte enkelte ganger reduseres for at fisken ikke skulle hvile seg på bakristen. Redusert vannhastighet og redusert svømming vil også påvirke oksygenopptaket, slik at det observerte fallet i oksygenopptak ved nedkjøling sannsynligvis er større enn det ville vært med samme vannhastighet. Under forsøkene ble fisken filmet fra to ulike vinkler (ovenfra og fra siden) mens oksygenopptaksmålingene ble utført.

Ved tilsetning av nedkjølt vann anrikt med CO₂ ble pH gradvis senket fra ambient (ca 8) ned til pH i prosesstanken ved fortykning. Nesten umiddelbart etter at påfylling med CO₂ vann startet, begynte fisken å vise tydelige tegn på stress ved at den endret svømmeatferd bl. a ved å snu seg medstrøms i kammeret. Fisken viste også fluktrespons ved harde sammenstøt med vegger og lokk (se videoklipp). Etter noen minutter ble fisken merkbart mindre aktiv men med kraftige ventilasjonsbevegelser, for deretter å legge seg på rygg eller side. Fra denne tilstanden kunne fisken rehabiliteres ved å sende inn CO₂ fritt vann.

Del II: Storskala forsøk levendekjøling med CO2

Bakgrunn

For å avdekke hvordan levendekjøling med CO2 innvirker på fisken i en slakteri situasjon ble det til sammen gjennomført 7 storskala forsøk. Forsøkene ble gjennomført på henholdsvis Ulvan, Hjelmeland og Eggbønes. Målsetning med forsøkene var å avklare levendekjøling og CO2 betydning for stress i en slaktesituasjon med flere variabler som:

- 1) Vinter versus sommer situasjon
- 2) Brønnbåt versus ventemerd
- 3) Endrende vannkvalitet
- 4) Levendekjøling med og uten CO2
- 5) Pumping og trengetider.

Ved å undersøke ulike situasjonen vil en kunne kvantifisere betydningen av levendekjøling m/CO2 på det totale stressbildet fisken gjennomgår ved slakting og eventuell fordeler og ulemper gitt i en bestemt slaktesituasjon. For å vurdere dette måtte også vannkvaliteten i levendekjølingstanken vurderes hvorvidt fisken endret respons med hensyn til endringer i vannkvalitet. Ved to tilfeller ble også mikrobiologi i vann og utblødningstanken målt.

Storskala forsøkene ble gjennomført etter følgende plan:

Mars 2011- To forsøk på henholdsvis Ulvan og Hjelmeland for å dokumentere effekten av slakteprosessen i en vintersituasjon både fra merd og brønnbåt. Måleparametere: Temperatur, trengetid, pumping, endring i vannkvalitet

August-September 2011: To forsøk på henholdsvis Ulvan og Hjelmeland for å dokumentere effekten av slakteprosessen i en vintersituasjon både fra merd og brønnbåt. Måleparametere: Stress, temperatur, trengetid, pumping, endring i vannkvalitet

Januar 2012. Forsøk på Eggbønes for å vurdere effekten av stress gjennom trening, pumping og levendekjøling m/ CO2. Samt dokumentere vannkvalitet i en ny tank.

Februar 2013. Forsøk på Ulvan for å vurdere effekten av trening, pumping, levendekjøling på kvaliteten hos laksefisk gjennom lagringsforløpet. Dette forsøket var i samarbeid med NFR prosjektet Drypplaks.

Januar 2014. Forsøk på Ulvan. Målsetning var å kvantifisere betydningen av CO2 på stress i levendekjølingstanken. Forsøk ble gjennomført med og uten CO2, hvor fisken respons gjennom bedøvelse og avliving også ble vurdert.

Fiskens respons ble i all hovedsak målt gjennom endringer av blodparametere, sammensatt med adferdsrespons. Parametere målt er gassregulering gjennom $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$ og HCO_3^- , samt sekundære effekter gjennom blodsukker, osmoregulering gjennom natrium, kalium og Hct, samt forming av laktat og frigjøring av interacellulær kalium og kalsium. Sammensatt vil disse parametere gi et bilde av fiskens fysiologiske tilstand som en effekt av omgivelsene.

Vannkvalitet i kommersielle slakterier med kjøletank og CO₂-sedering

Fra Januar 2010 skulle forskriftene om bedøvelse og avliving av oppdrettsfisk gitt av det norske Fiskeri- og kystdepartementet (FKD) i 2006, trådt i kraft. I den forbindelse skulle bruk av CO₂ eller annen gass prinsipielt være forbudt brukt til bedøvelse og avliving av fisk, men fortsatt lovlig brukt til sedering (beroligelse). I et brev fra Fiskeri og havbruksnæringens landsforbund (FHL) til FKD den 24.09.09 ble det understreket at det ikke fantes tilstrekkelig dokumentasjon for at FKD kunne regulere levendekjøling og gassbruk ut fra dyrevernmessige hensyn ettersom toleransegrenser for CO₂ i sjøvann ikke er kjent for laks og en har stort sett basert kunnskapen på de erfaringer som er gjennomført ved norske slakterier, hvor fisken utsettes for en rekke andre stressorer som trengning og pumping. For vannkvalitet og gass er det kjent at fisk har chemo-reseptorer for CO₂ på første gjellebue, og en aktivering av disse vil medføre frigjøring av katekolaminer, økende blodtrykk og økt ventilasjonsrate. Dette er en naturlig fysiologisk reaksjon for å sikre økt H⁺ ekskresjon kombinert med økning av bikarbonatnivået for å regulere syre-base balansen med et økt CO₂-nivå i blodet. De tidligere omtalte velferdskriteriene ved bruk av CO₂ gjelder i all hovedsak de eksterne forhold rundt endring i vannets pH, ettersom et økt CO₂ nivå eller acidose i blod i seg selv ikke vil utløse de primære stressresponser hos fisken, men moduleres gjennom hypoksi. Dermed vil velferdskriteriene hos fisk i en kjøletank være mer avhengig av sjøvannets pH og pO₂ som igjen blir regulert gjennom løst CO₂ og NH₄⁺, samt O₂-nivå enn av selve partialtrykket av CO₂ både i vann og blod. I praksis betyr dette at så lenge pH/O₂ er innenfor toleransenivået for fisken, kan en teoretisk inducere en tilstand av hypercapnia som fordelaktig reduserer fiskens evne til å respondere på omgivelsene. Dette kombinert med lav temperatur og derved lav metabolisme vil etter all sannsynlighet forsvare større tetthet, bedre O₂-betingelser og forbedre velferdskriterier assosiert med videre håndtering og prosessering i en transport- og slakteprosess, synonymt med bedre total velferd, kvalitet og økonomi.

I dette prosjektet har det blitt tatt vannprøver i kjøletanker ved tre slakterier som benytter metode med kombinert nedkjøling og sedering ved hjelp av CO₂. Vannkvaliteten i disse tankene har blitt dokumentert i tidsserier gjennom hele produksjonsdager. Det har blitt utført prøvetaking både sommers- og vinterstid ettersom man opererer med litt forskjellig dosering av CO₂ i forhold til sjøtemperatur, og også fordi det ble utført flere andre eksperimenter i prosjektet hvor sjøtemperatur spilte inn.

Målingene av vannkvalitet har fokusert på nivåer av CO₂, totalt oppløst ammoniakk (TAN) og totalt innhold av organisk karbon (oppløst stoff, TOC). Dette er de parameterne vi anser som viktigst å holde kontroll på gjennom dagen, og som vil kunne ha størst innvirkning på generell velferd i kjøletanken. CO₂-nivå styres ved anlegget etter pH i vannet ettersom det finnes få gode, pålitelige og enkle måter å måle CO₂ på. På vinterstid styres nivået til en pH på ca. 5.7, og på sommerstid ligger CO₂-nivåene litt lavere, som gir en pH som da er noe høyere (ca. 5.9). Ammoniakk skilles ut av fisken selv, og ettersom vannet i kjøletanken bare delvis blir fornyet vil det skje en naturlig økning i konsentrasjonen av TAN gjennom dagen. TAN betyr totalammoniakk, og består av både ugiftig ionisert ammonium (NH₄⁺) og giftig uionisert ammoniakk (NH₃). Likevekten mellom disse er slik at jo lavere pH er, jo mindre vil foreligge som giftig NH₃. Totalt organisk karbon gir et mål for hvor mye organisk materiale som befinner seg i kjøletanken. Typisk vil dette dreie seg om fiskeslim, skjell, blod og i mindre grad faeces fra fisken ettersom den er sultet på forhånd. Under er presentert målte resultater fra de respektive slaktelokalitetene i de to årstidene.

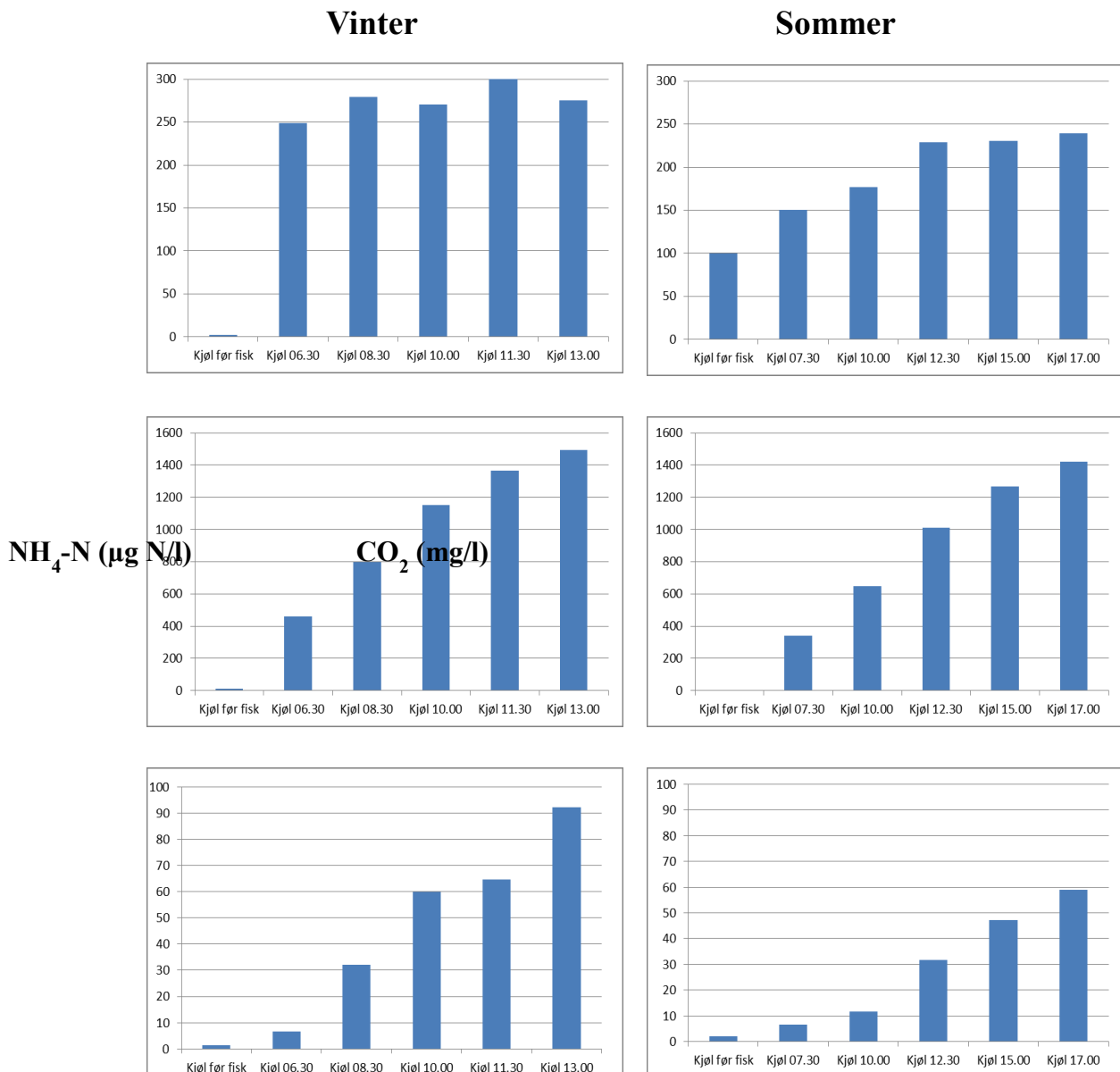
Hjelmeland

Prøver ble hentet under vintersituasjon (sjøtemperatur 3.5°C) den 29. mars 2011. Vannprøvene ble tatt fra samme punkt i kjøletanken fra tidlig morgen (før fisk ble introdusert) og med jevne mellomrom gjennom produksjonsdagen. Temperatur i kjøletanken gjennom hele dagen varierte lite

og lå stabilt mellom 0.9 og 1.2 °C. Målt pH varierte mellom 5.56 og 5.69 og oksygenivå i tanken var over 85% metning gjennom hele dagen.

Prøvene fra sommersituasjon (sjøtemperatur 16.1 °C) ble tatt 30. august 2011. Vannprøver ble samlet på samme måte som beskrevet ovenfor. Temperatur i kjøletanken var 2 °C ved start av dagen og synkende. Ved siste prøvetaking ble det målt 0.5 °C i tanken. Målt pH varierte mellom 5.91 og 6.08. Oksygenmetning var høyere enn 100% gjennom hele dagen.

Nedenfor er de målte parametere (CO₂, NH₄ og TOC) presentert i grafisk form.

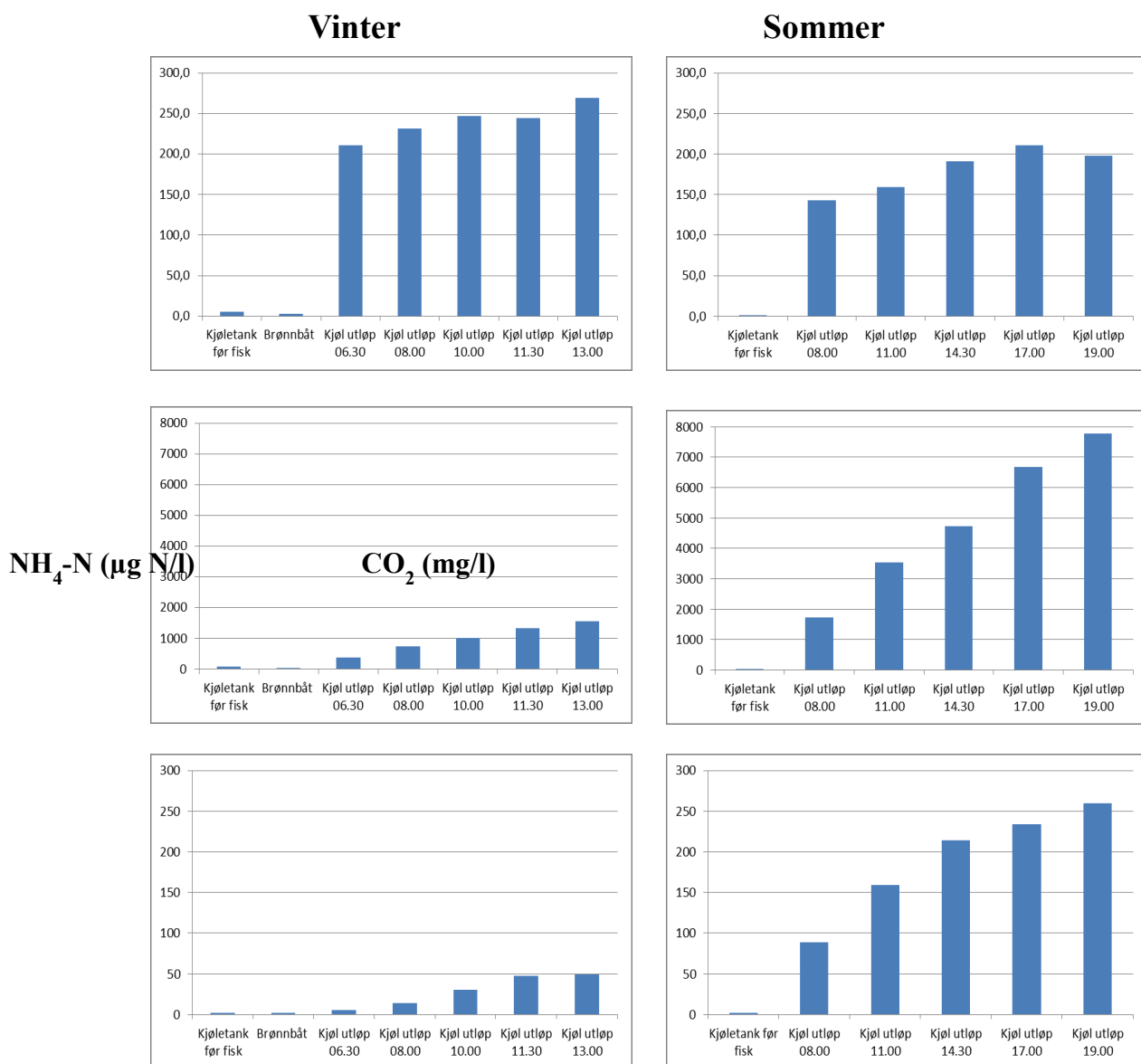


Figur 8: Fritt CO₂ (mg/l), NH₄ (total ammoniakk, µg N/l) og TOC (totalt organisk karbon, mg C/l) målt i levendekjølingstanken gjennom en produksjonsdag på Hjelmeland under sommer- og vintersituasjon.

Prøver ble hentet under vintersituasjon (sjøtemperatur 4.5°C) den 25. mars 2011. Vannprøvene ble tatt fra samme punkt i kjøletanken fra tidlig morgen (før fisk ble introdusert) og med jevne mellomrom gjennom produksjonsdagen. Temperatur i kjøletanken gjennom hele dagen varierte lite og lå stabilt på ca. 0.5 °C. Målt pH varierte mellom 5.71 og 5.84 og oksygennivå i tanken var over 85% metning gjennom hele dagen.

Prøvene fra sommersituasjon (sjøtemperatur 14.1 °C) ble tatt 13. september 2011. Vannprøver ble samlet på samme måte som beskrevet ovenfor. Temperatur i kjøletanken var 2 °C ved start av dagen, men steg til ca. 6 °C midt på dagen ettersom det var tekniske problemer med nedkjølingen. Ved siste prøvetaking ble det målt 4.1 °C i tanken. Målt pH varierte mellom 5.85 og 5.95. Oksygenmetning var høyere enn 80 % gjennom hele dagen.

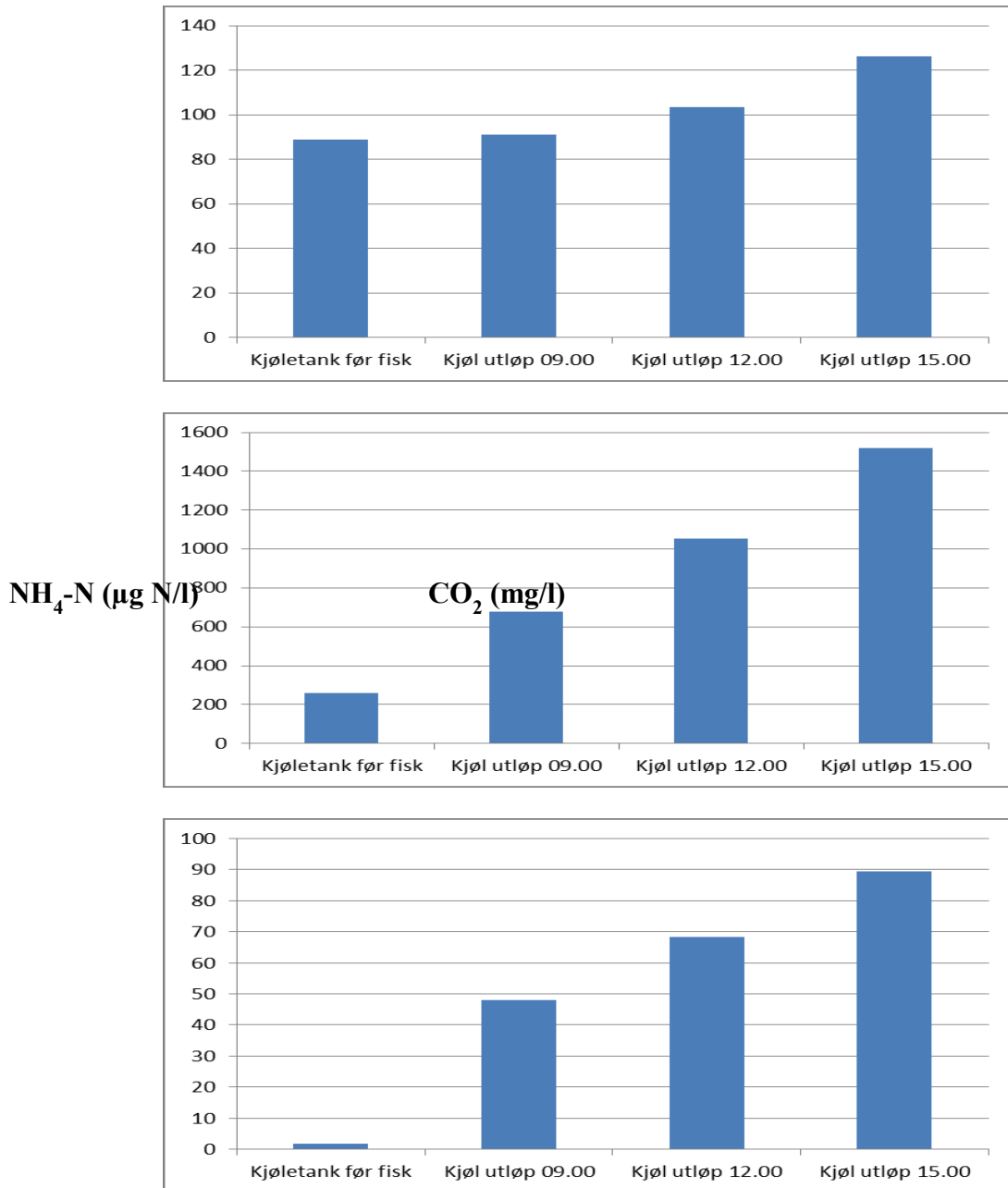
Nedenfor er de målte parametere (CO₂, NH₄ og TOC) presentert i grafisk form.



Figur 9: Fritt CO₂ (mg/l), NH₄ (total ammoniakk, µg N/l) og TOC (totalt organisk karbon, mg C/l) målt i levendekjølingstanken gjennom en produksjonsdag på Ulvan under sommer – og vintersituasjon.

Eggesbønes

Prøver fra dette slakteriet ble kun hentet under vintersituasjon (sjøtemperatur 5.6 °C), den 28. februar 2012. Vannprøvene ble tatt fra samme punkt i kjøletanken fra tidlig morgen (før fisk ble introdusert) og med jevne mellomrom gjennom produksjonsdagen. Temperatur i kjøletanken varierte lite og lå stabilt på ca. 2.5 °C. Målt pH varierte mellom 5.95 og 6.01 og oksygenivået i tanken var over 85% metning gjennom hele dagen.



Figur 10: Fritt CO₂ (mg/l), NH₄ (total ammoniakk, µg N/l) og TOC (totalt organisk karbon, mg C/l) målt i levendekjølingstanken gjennom en produksjonsdag på Eggesbønes.

Vurdering av vannkvalitetsparametere

Vannprøvene som ble tatt fra anlegget var alle innhentet og analysert etter akkrediterte metoder. For CO₂ er imidlertid ikke akkrediteringskriteriene oppfylt ettersom nivåene som brukes i en kjøletank er mye høyere enn det måleutstyret tillater. Prøvene er dermed fortynnet før analyse, noe som gir en høy nøyaktighet, men ikke høy nok sikkerhet til å oppfylle akkrediteringskravene.

CO₂

CO₂-nivå i kjøletankene styres ved anlegget etter pH i vannet ettersom det finnes få gode, pålitelige og enkle måter å måle CO₂ på. Gjennom dagen på vinterstid lå CO₂-nivået på ca. 200-260 mg/l som tilsvarer en pH på ca. 5.7. På sommerstid lå CO₂-nivåene noe lavere (150-200 mg/l) og pH var da også noe høyere (5.9). CO₂ er svært løselig i vann, og dermed lett å tilsette. Utfordringen vil generelt være å holde nivået stabilt over tid. I Optislakt-prosjektet ble det målt CO₂-nivåer gjennom en hel produksjonsdag ved fem anledninger. I alle de tilfellene ble det observert at konsentrasjonen økte raskt i kjøletanken om morgenen, og deretter holdt seg relativt stabilt gjennom dagen. Dette virker dermed å være en parameter man har god kontroll med, og at styringsmekanismene som justerer tilsetning av CO₂ basert på pH i kjøletanken fungerer tilfredsstillende. Det er likevel interessant å legge merke til de store nivåforskjellene mellom CO₂-nivået på Eggesbønes kontra Hjelmeland og Ulvan. Førstnevnte har omtrent halvparten så mye CO₂ tilsatt som de to andre vinterstid. Det kan nevnes at på det tidspunktet vi foretok arbeidet på Eggesbønes hadde slakteriet en del utfordringer med tidlig rigor mortis på fisken som ble slaktet. Dette ble hovedsakelig relatert til trengeprosessen, men det er også en mulighet at CO₂-nivåene her var lave og sederingen ikke like effektiv som normalt.

NH₃

For ammoniakk er nivåene nesten helt like ved alle anlegg, med unntak av prøvetakingen som ble gjort ved Ulvan sommerstid. Her er nivåene meget høye p.g.a. en uheldig episode hvor mye død og råtten fisk havnet i kjøletanken tidlig på dagen. Nivåene som ble målt (med unntak av det ene tilfellet) er ikke vurdert som fysiologisk belastende på fisken i kjøletanken. Som en enkel sammenlikning kan det nevnes at i oppdrett av fisk med resirkulasjonsteknologi holder man en TAN-verdi på 1000 µg/l som en grenseverdi for optimal vekst. Da er også pH godt over 7 i vannet.

TOC

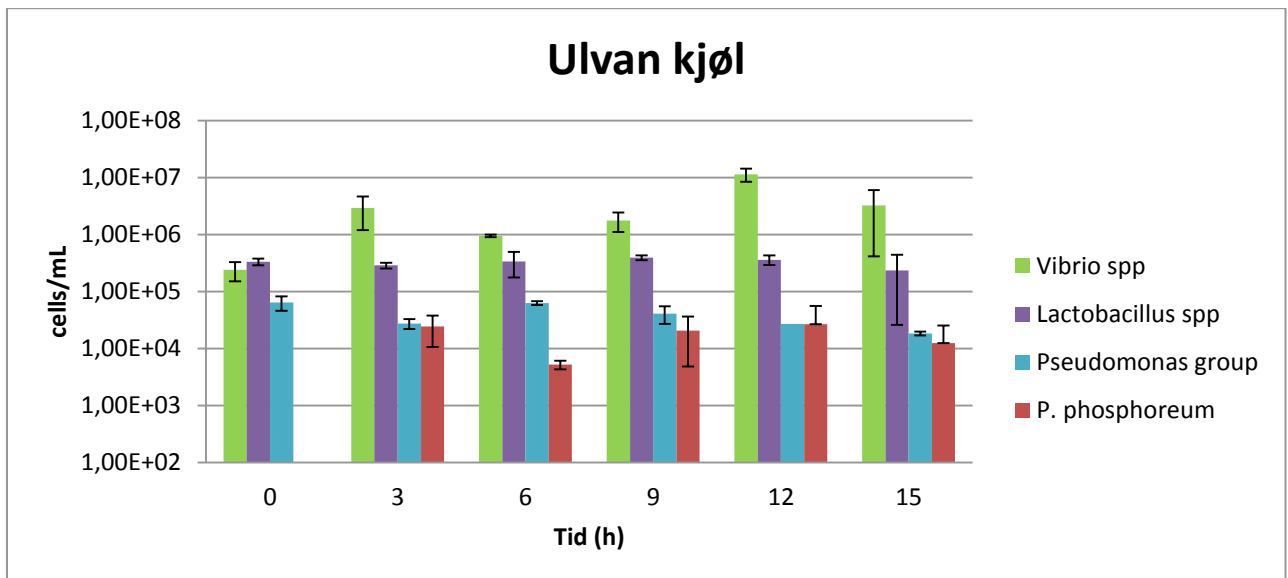
For TOC ble det observert noe større variasjon mellom anleggene, men ikke noe spesielt mønster ble observert mellom årstider. Denne parameteren vil stort sett avhenge av mengden biomasse som går gjennom kjøletanken, tilstand til fisken (f.eks. om det er mye død/råtten fisk) og grad av vannutskifting i tanken. Ved en anledning ble det målt veldig høyt innhold av TOC, men etter at det ble iverksatt rutiner som forhindret at dødfisk fra ventemerde ble pumpet inn i systemet har verdiene vært lavere. Dette er nok uansett den vann-parameteren vi anser å ha størst forbedringspotensial, men det sier seg selv at det vil være umulig å ha krystallklart vann i en tank med store mengder fisk som har vært gjennom fysisk krevende prosesser som trenging og pumping. Nivåene av TOC ble typisk målt til å ligge i området 50-90 mg C/l mot slutten av dagen. Til sammenlikning har man målt nivåer på 10-20 mg C/l ved lange brønnbåttransporter, mens det i et smolt-kar normalt vil være verdier på 1-3 mg C/l. TOC-nivå på Eggesbønes lå omtrent i samme området som slakteriene på Hjelmeland og Ulvan, men var egentlig forventet å ligge lavere. Det ble uttalt at vann-utskiftningen i kjøletanken på Eggesbønes var høyere enn ved de to andre anleggene, men dette gjenspeiles ikke i vannkvalitetsmålingene. En mulig forklaring er at biomasse-gjennomstrømmingen ved Eggesbønes er høyere enn ved de to andre, og at en høyere vannutskifting dermed ikke er tilstrekkelig til å oppnå en bedre vannkvalitet. Gjennom samtaler med personale på anlegget ble det ikke enighet om hvor mye av vannet som ble skiftet ut, d.v.s. av de vi pratet med var det ingen som visste dette sikkert.

Temperatur

Målt temperatur i kjøletanker ved de forskjellige anlegg varierte relativt mye mellom anleggene, og det ble også observert relativt store variasjoner gjennom døgnet ved enkelte anledninger. Fra å ligge stabilt på 0.5-0.6 °C gjennom hele dagen (Ulvan, vinterstid) til å variere mellom 2-6 °C (Ulvan, sommerstid). Temperaturen ble generelt målt til å være litt for høye, spesielt vinterstid. Vår erfaring gjennom laboratorieforsøk tilsier at en senkning i temperatur fra 5-6 °C i sjø til 2-3 °C i kjøletank knapt vil merkes av fisken, og vi kan trygt anbefale å senke temperaturen i kjøletanken ned mot 0.5 °C, spesielt når det er kaldt i sjøen.

Bakteriologi

Det ble ved to anlegg tatt vannprøver for analyse av bakteriologisk innhold i kjøle- og utblødningstankene. I kjøletanken ble utviklingen i bakteriologisk innhold undersøkt gjennom hele dagen, mens det i utblødningstanken ble tatt prøver ved start og slutt av produksjonsdagen.



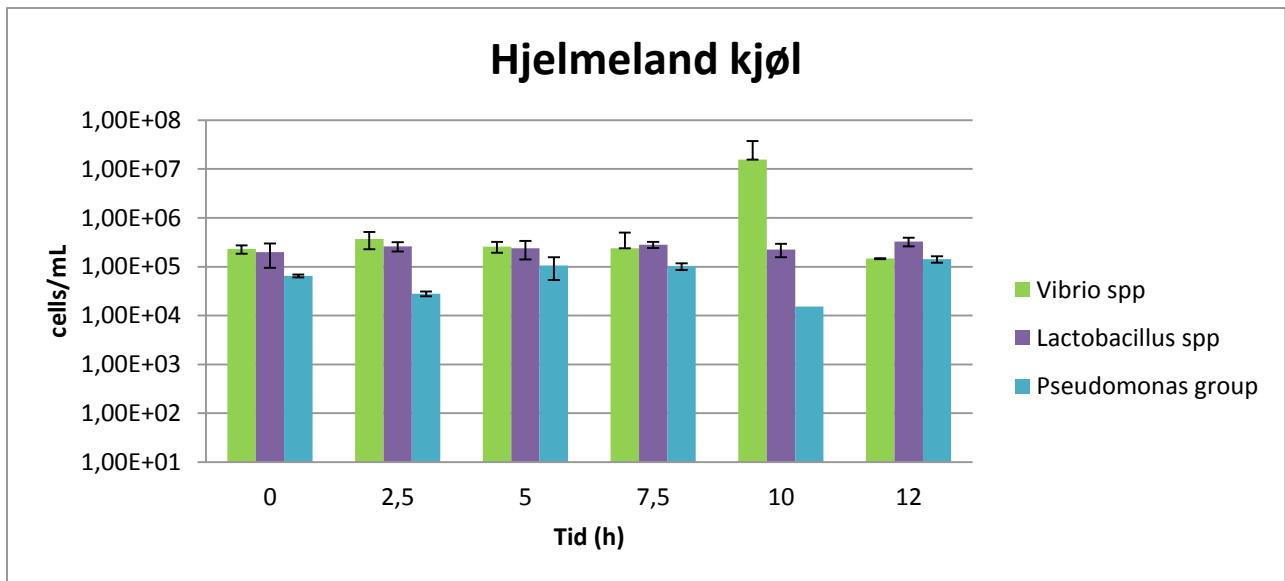
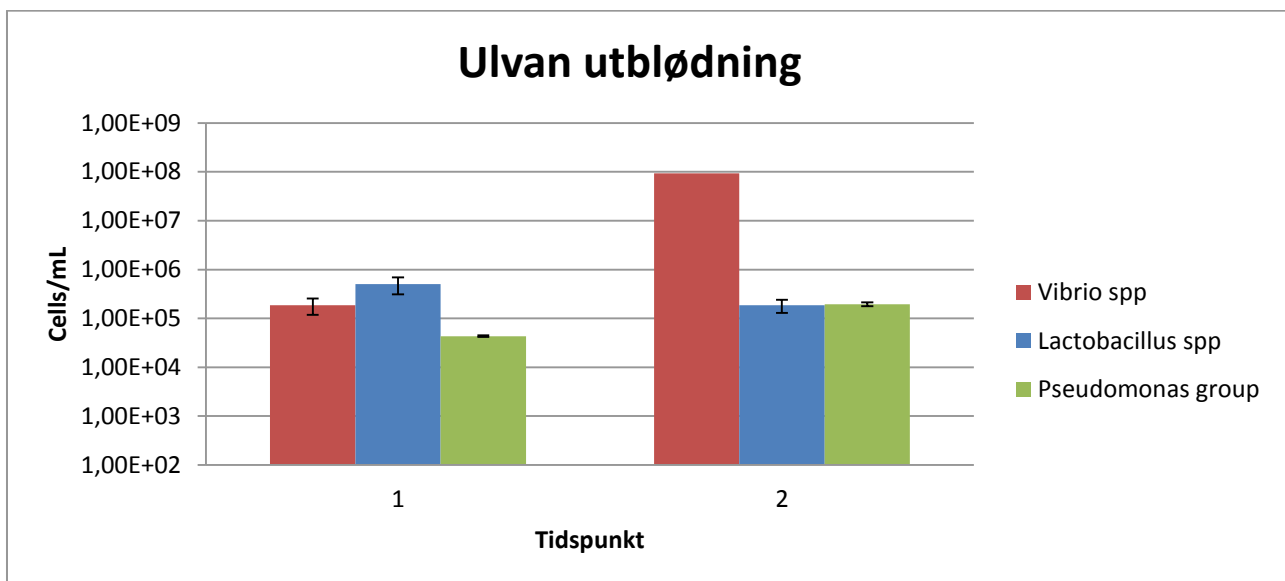


Fig. 11. Tetthet av bakterier i kjøletank ved slakteriene på Ulvan (øverst) og Hjelmeland (nederst) gjennom en produksjonsdag.



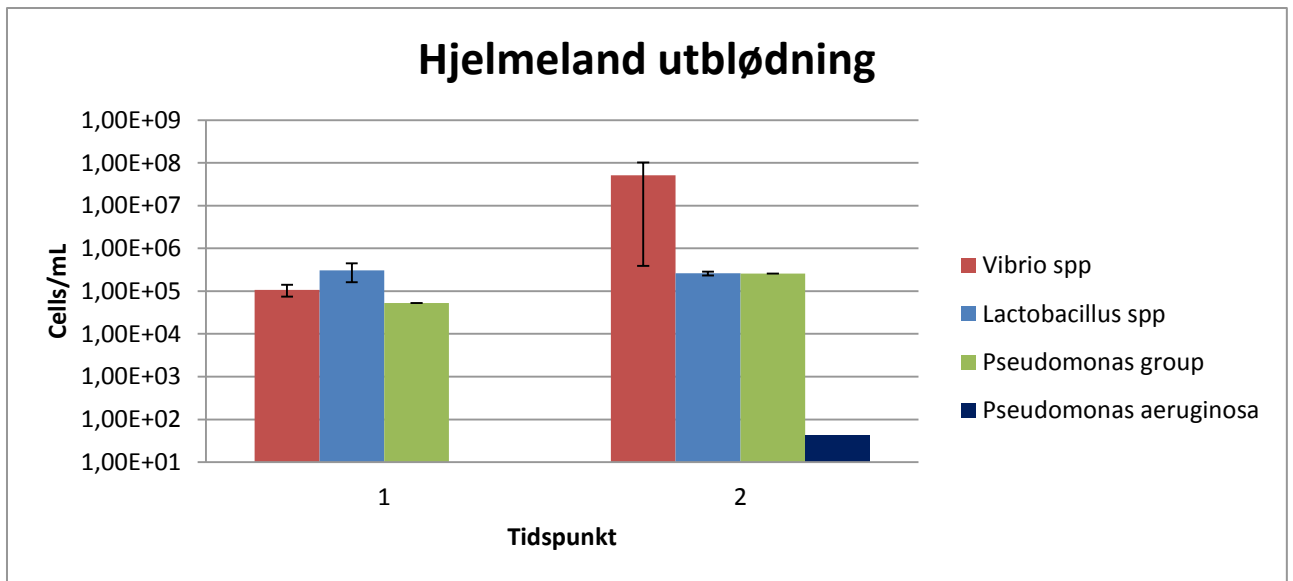


Fig. 12. Tetthet av bakterier i utblødningstank ved slakteriene på Ulvan (øverst) og Hjelmeland (nederst) gjennom en produksjonsdag.

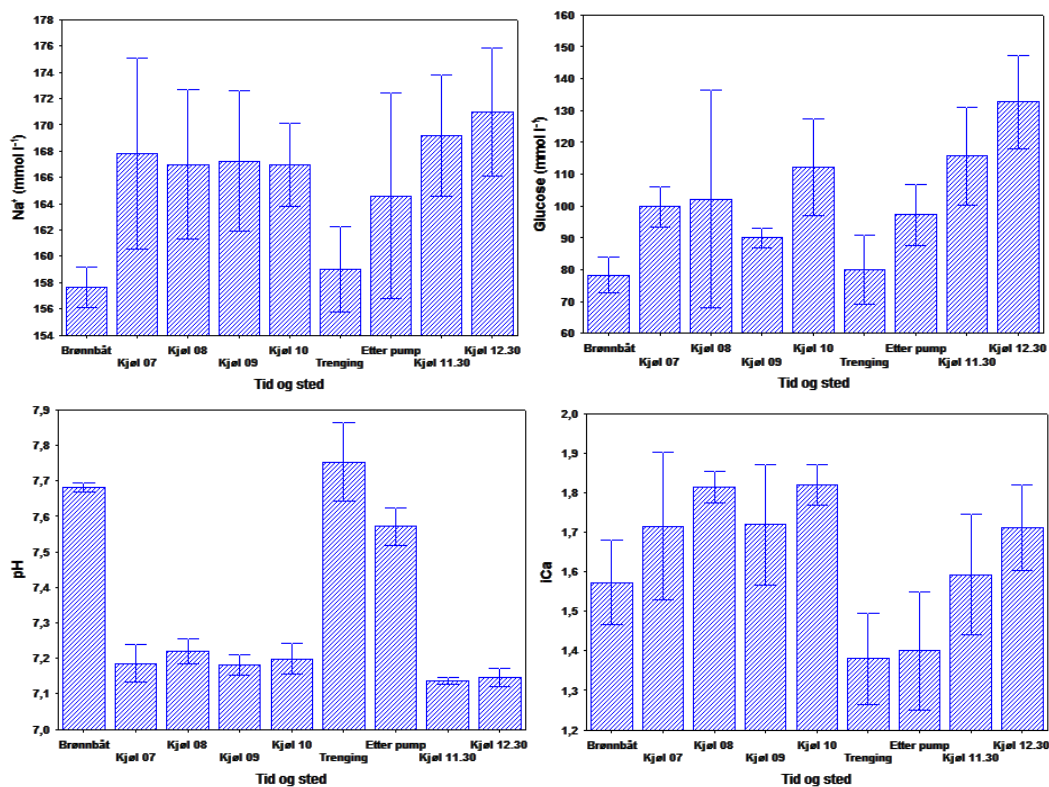
Avhengig av art ble det observert 1 log økning av kimtall gjennom dagen i levendekjølingstanke og opptil 2 log i utblødningstanken. «Spoilage» arter målt i tanken er kjent for å være pH og kuldetolerante, hvorav Vibrio er en naturlig del av sjøvannsflora. Imidlertid starter begge anlegg dagen med et høyt og etablert flora. På begge anlegg ble det gjennom en dagsproduksjon observert innføring av nye «spoilage» arter. På Ulvan kunne dette forklare ved innføring av dødfisk i slutten av et kast, mens på Hjelmeland fikk en liten oppblomstring av *Pseudomonas aeruginosa* av uforklarlige grunner.

Fysiologiske responser

Forsøk fra Ulvan- Våren 2011

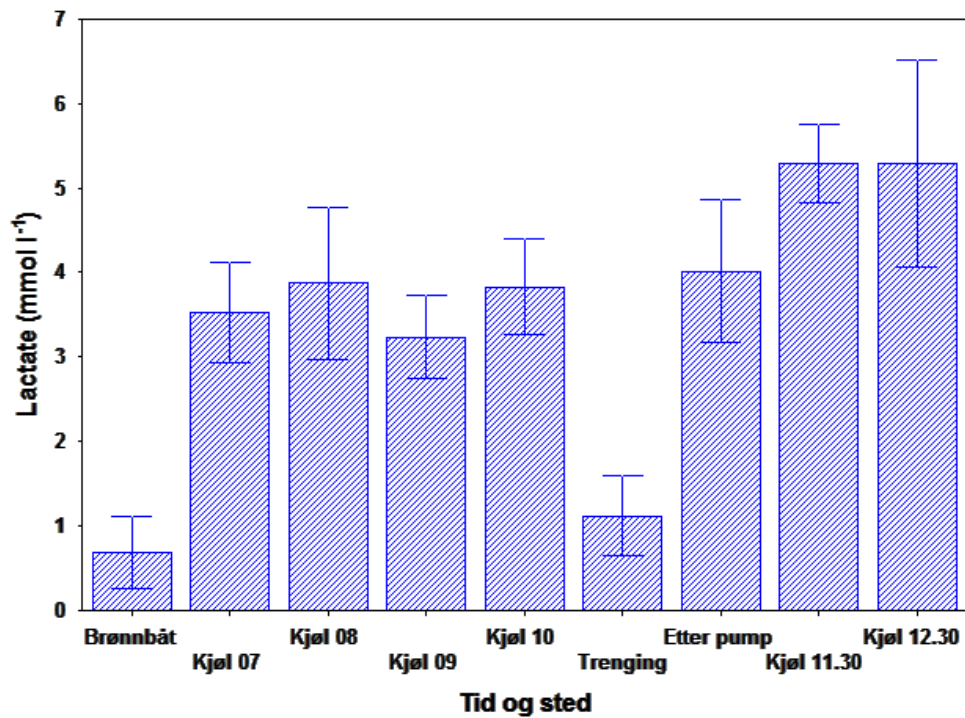
Målsetningen i forøket i Ulvan på som en innledende var å måle om fisken endret responsen ifht til endringer av vannkvaliteten i levendekjølingstanken gjennom 2 skift. Blodprøver ble derfor tatt i parallell til vannprøver gjennom hele produksjonssyklus og se på de endringer som måtte forekomme gjennom dagen. I denne anledning fikk en sammenlignet til en viss grad forskjellene mellom fisk slaktet fra brønnbåt versus ventemerd. Forsøket var gjennomført ved at en startet med å måle fisk i merd og brønnbåt før pumping, slik at første måling etter levendekjøling var fra nettopp første kammer og deretter utover i produksjonssyklus.

Som vist i Figur 13 både fisk fra både brønnbåt og ventemerd viste å være uthvilt og i fysiologisk homeostase. Imidlertid medfører slakteprosessen en endring, hvor fisken viser å utløse sekundære stressresponser med forhøyet glucoseverdier, samtidig om pH i blod faller som en følge av acidose utsatt for CO₂.



Figur 13: Natrium, kalsium, og glukoseverdier i fisk slaktet før og etter levendekjøling fra brønnbåt og ventemerd

Imidlertid synes slutt resultatet være stabilt uavhengig av en forverring av vannkvaliteten, hvor eventuelle utslag ikke skyldes akkumulering av TOC eller endringer av temperatur.



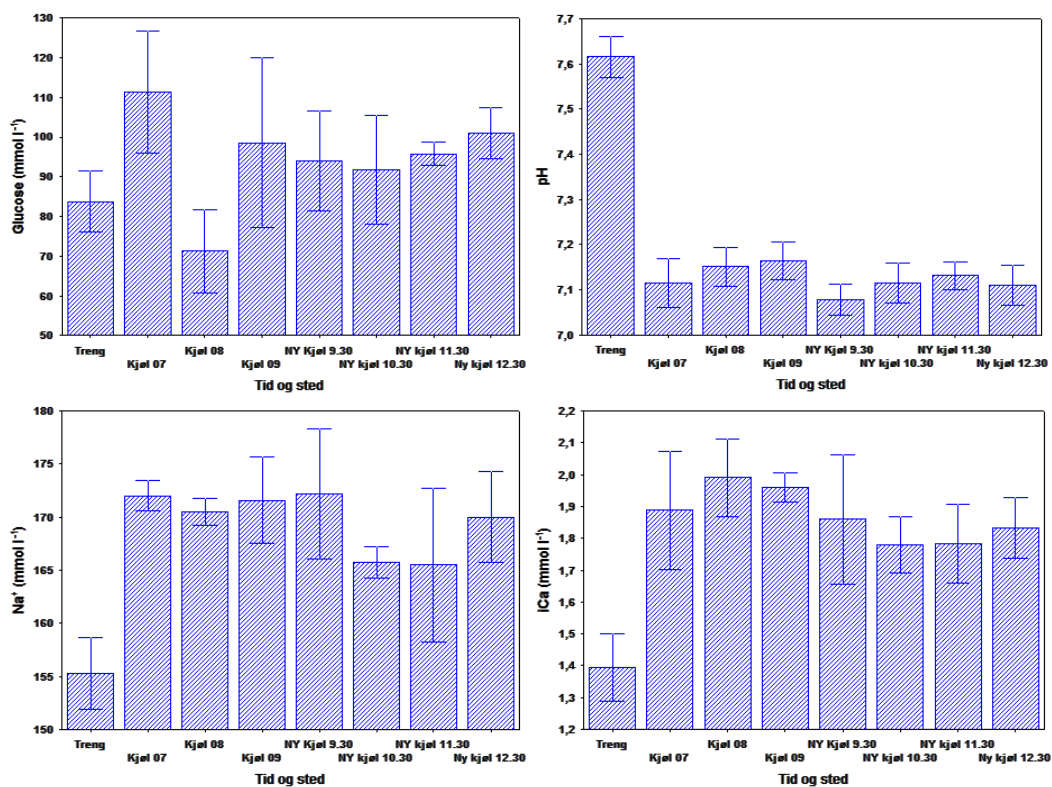
Figur 14: Laktat målinger fra fisk før og etter levendekjøling av fisk fra brønnbåt og merd

Imidlertid synes variasjonen å skyldes både visse forhold hos fisken og forhold lenger nede i systemet. Fisken fra brønnbåt og i ventemerde synes å ha likt utgangspunkt, men vist i Fig. 10 hadde fisken fra brønnbåten et høyere kalsium verdier enn fisk i ventemerde. Dette kan skyldes at fisken i brønnbåten i utgangspunktet har vært trenget og pumpet i nær fremtid og ikke fullstendig restituert. Utslaget kan imidlertid sees på laktatverdiene, hvor fisk fra ventemerde i større grad viser muskelaktivitet og dermed en større økning av laktat og glukose. I dette forsøket viser pumping å ha stor innvirkning på stressresponsen av fisk, samtidig som en ser en rask øking av fysiologiske responser hos fisken etter en time trening.

Forsøk fra Hjelmeland- Våren 2011

I likhet med Ulvan ville en også her prøve å finne endringer i responser gjennom dagen hos fisk som kan forklares ut fra ulike forhold ved slaktingen og vannkaret. I dette forsøket ville en også måle vannkvaliteten gjennom dagen, men i motsetning til Ulvan ønsket en å ha større kontroll på trengetiden. Et forsøk var derfor satt at røkterene skulle gi oss beskjed når en startet pumping på en ny-trengt gruppe.

Som vist i Figur 15 avviker ikke resultatene på Hjelmeland enn hva som var observert på Ulvan i samme tidsrom. Endringen av vannkvalitet kan på ingen måte måles, men ser en forklare en del av variasjonen ut fra start av trenge tidspunkt.

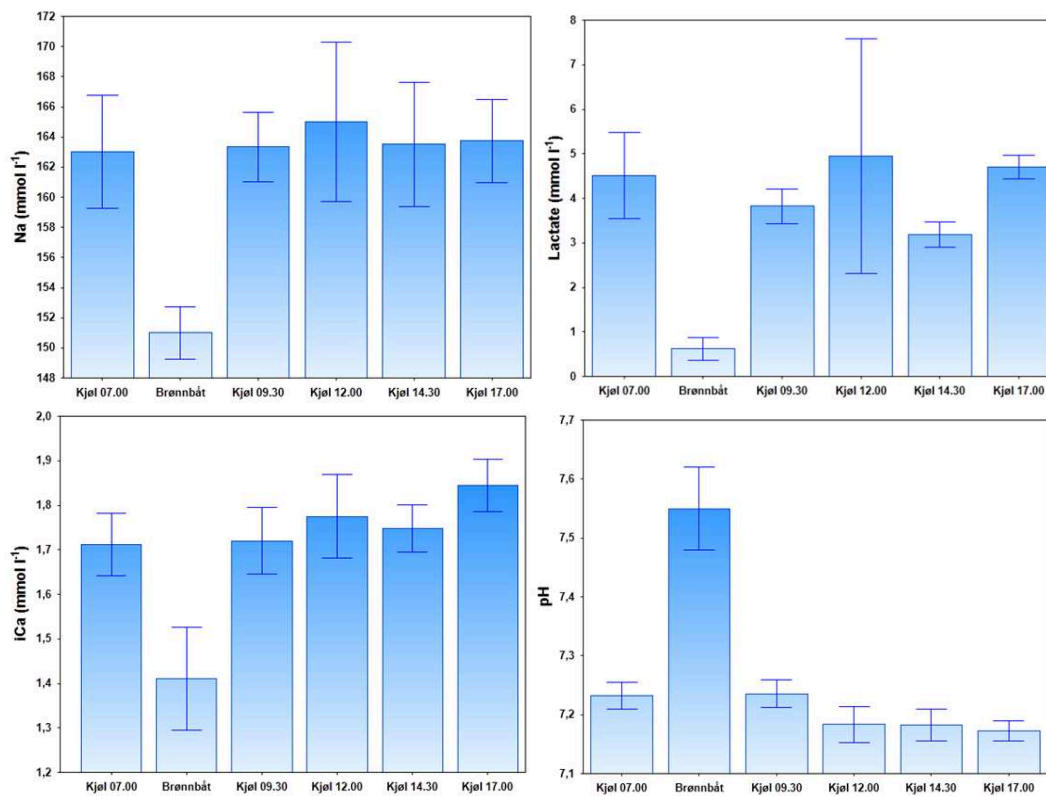


Figur 15: Blodprøver av fisk etter levendekjøling fra fisk trengt i merd. Angitt er klokkeslett og Ny representerer først gruppen av et nytt kast.

Forsøk Hjelmeland August 2011

Målet med dette forsøket var å repetere tidligere storskalaforsøket utført på vinteren for å vurdere hvordan fisken responderer mot levendekjøling med CO₂ i en periode med høye sjøtemperaturer (16 grader C). I likhet med tidligere forsøk ønsket en å følge vannkvaliteten gjennom dagen og måle om fisken responderte ulikt ifht til dette. Forsøkene startet med 1 times produksjon om morggen med ventemerd før en slaktet fra brønnbåt.

I likhet med vinterforsøkene viser forsøkene fra brønnbåt at fisken har god homoestase ved start av produksjonen. I likhet med tidligere studier fra brønnbåt på Ulvan, forholder verdiene seg relativt stabile gjennom dagen til tross for endring av vannkvalitet og temperatur ned mot 0.5 grader C, samt økende CO₂ innhold i vannet. Til tross for temperaturfallet på 15 grader celsius viser fisken tegn til osmoregulatorisk eller respiratorisk kollaps og har forholdsvis lave Na⁺ og laktatverdier i forhold til tidligere forsøk. En senkning av pH og økning av iCa kan imidlertid observeres gjennom dagen

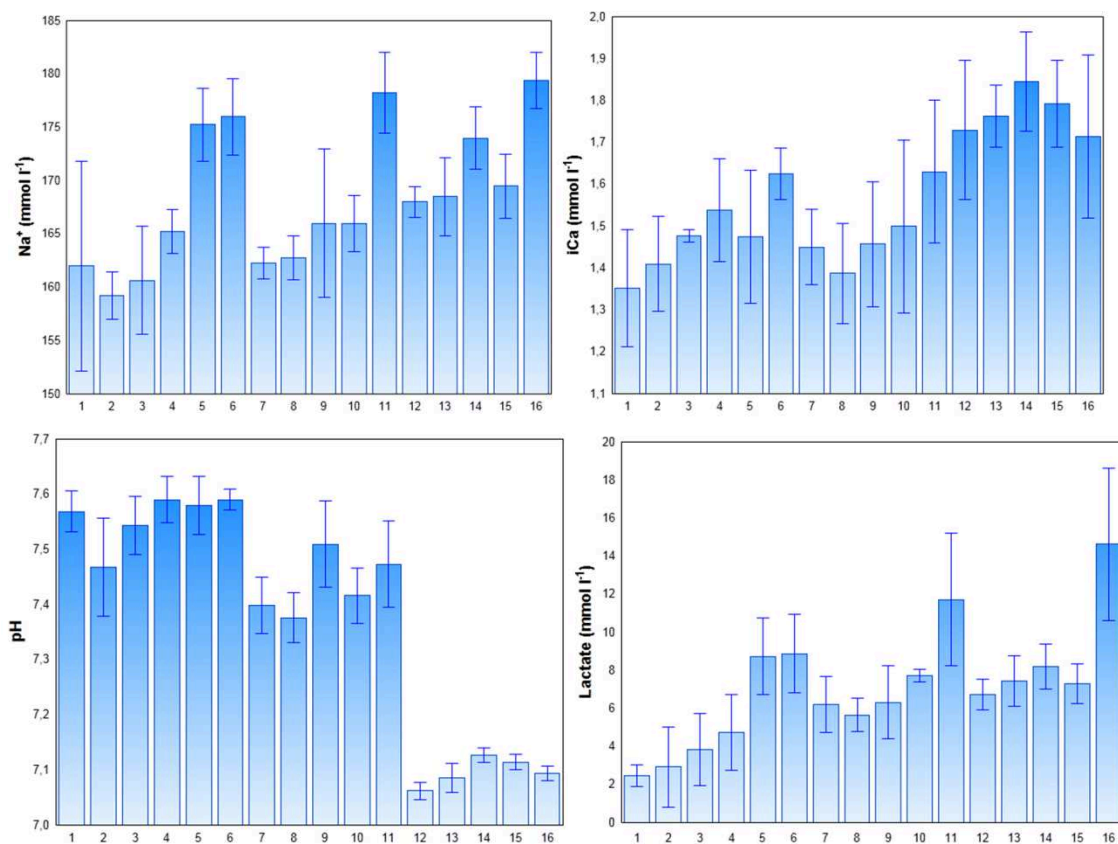


Figur 16: Blodverdier

Forsøk Ulvan- September 2011

I dette storskala forsøket valgte en å parallelt måle på fisk under ulike trenge tider og følge samme gruppe fisk fra pumpen og gjennom levendekjøling. Forholdene i sjø var temmelig lik Hjemland med 14 graders sjøtemperatur, men hadde i utgangspunktet høyere temperaturer i RSW tanken enn Hjemland på ca 2-4 grader C. Vist i Figur 17 prøvde en å følge ordinær produksjon ved å starte blodprøvetaking ved trenge start og følge denne de første 15 min (1-3), før neste etter ca 30 min (4) de to sistnevnte etter 1 (5) og 2 (6) timer. Den samme gruppen fisk ble målt etter pumpen (7-11) og etter levendekjøling (12-16).

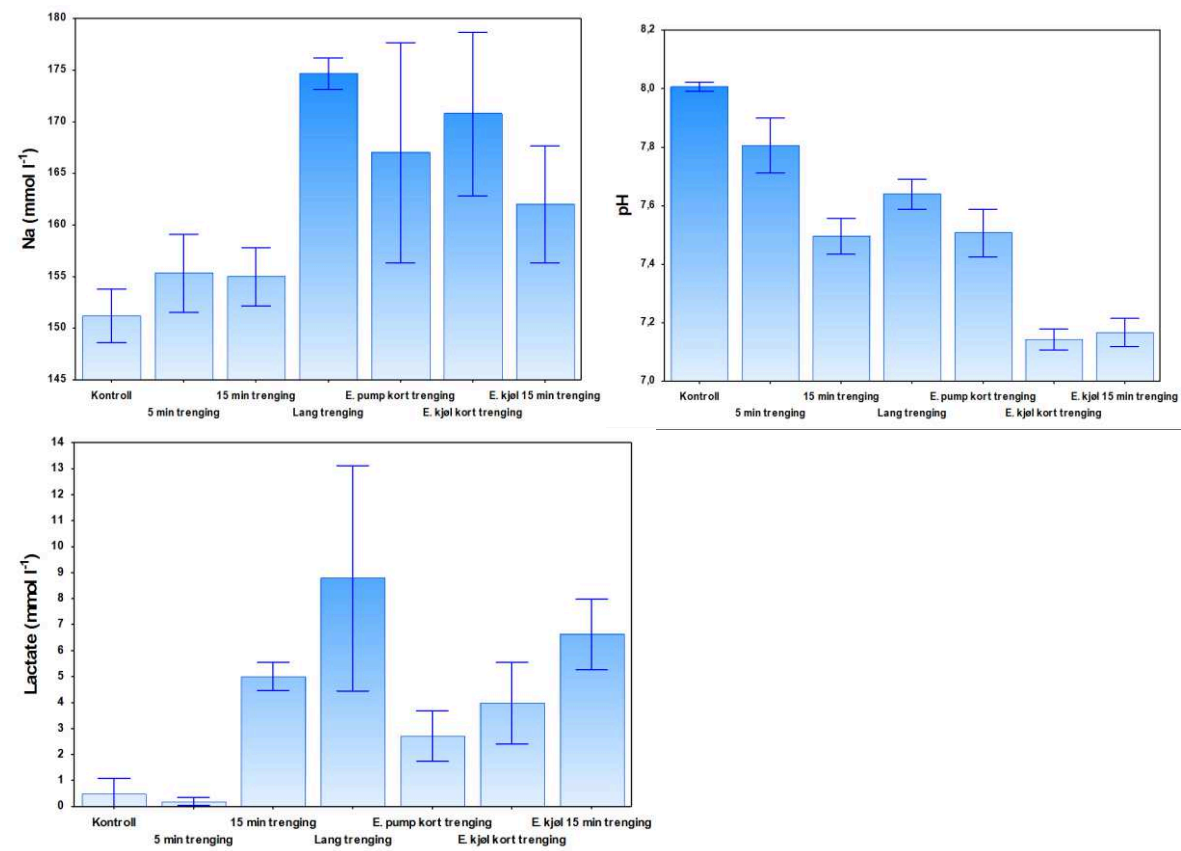
Resultatene viser at variasjoner i blodparametere ut fra levendekjøling helt klart reflekter forholdene rundt trening. Trengetiden og forholdene rundt dette var den parameteren som har helt klarts størst innvirkning på stressmålingene hos fisken. Imidlertid i liket med de andre studiene vil også pumpen og levendekjølings tanken ha en innvirkning, men den kan sies å være moderat ifht til trening. Sammenligner vi dette med lignende forhold fra Hjemland vil en temperaturøkning til 2-4 grader i tanken ikke ha positiv effekt mht til fiskens respons i tanken, da alle kontrollverdier fra fisken i Ulvan var generelt høyere enn på Hjemland.



Figur 17: Blodverdier i laks under trening, pumping og levendekjøling. Pkt 1-3 er oppstart av trening (1-15 min) hvor samme gruppe fisk ble målt etter pumpe (7-9) og levendekjøling m/CO2 (12-14). Etter 15-30 min trening (4) vider pumping (10) og kjøling (15). Videre 1-2 t trening (5-6) med påfølgende pumping (11) og levendekjøling (16)

Forsøk fra Eggebønes Vinter 2012

Målsetning med dette forsøket var å måle forholdene rundt levendekjølingstanken mht til vannkvalitet og identifisere faktorer som medførte en tidlig rigor. Det ble notert at en trengte fisken nok så hard på Eggebønes til sammenligning med andre anlegg noe som kunne skyldes lav pumpekapasitet. I dette forsøket valgte en å konsentrere på fiskens responser under trenging fra et gitt 0-punkt ved trenging og følge de første 15 minutter av trenging gjennom pumpen og levendekjølings tanken. Resultatene i Figur 18 demonstrerer i klartekst hvordan trenging påvirker fisken, hvor den allerede etter 15 min har laktatnivåer tilsvarende 5 mmol/l og opp mot 9 mmol/L etter 1 time. Kontrollfisken derimot hadde et laktatnivå på ca 4 mmol/L etter både pumpen og levendekjøling. Resultatene her sammenfaller klart med forsøkene på både Hjelmeland og Ulvan, hvor kontroll gruppene uavhengig av sesong og lokalitet ligger på ca 4-5 mmol/L etter levendekjøling.



Figur 18: Blodparametere hos fisk trengt i 0, 15 og >30 min både i merd, etter pumpe og etter levendekjøling m/ CO₂.

Forsøk Ulvan Vinter 2013

Dette forsøkte var et samarbeid med NFR prosjektet Drypplaks, hvor målsetningen var å avklare betydning av stress og levendekjøling hadde på kvaliteten hos laksefisk. Fire grupper av fisk var fulgt som bestod av kontrollfisk (start av trenging) og trengt fisk (45 min) slaktet ved merden eller etter pumping og levendekjøling med CO₂. Temperaturen i levendekjølingstanken var 1 grader C og pH var mellom 6.8-6.9. Målte parametere var ved siden av blod, muskel pH, farge, vannbindingsevne, drypptap, protein nedbrytning ved DSC, tekstur analyser og proteaser enzymer (Cathepsin L & B). Dette ble målt over en periode på 13-19 dager post mortem.

Vist i tabell 1 følger resultatene tidligere forsøk hvor kontrollfisk som er pumpet og levendekjølt har et forhøyet ioneverdi, men moderat nivåer av laktat på 4 mmol/L. Imidlertid vil en 45 min med trenging medføre høyere verdier enn den parallelle kontrollfisk som går ut av levendekjølings tanken. Resultatene på kvalitet viser at stress både gjennom trengning og slakteprosessen generelt hadde en negativ innvirkning på tekstur ved bløtere tekstur og høyere enzym aktivitet. En kunne ikke i disse forsøkene noen skille noen særskilte forskjeller mellom fisk stresset ved merd eller gjennom pumpe og levendekjøling annet at den totale stressbelastning var en målt årsak. Ingen andre signifikante forskjeller var målt mht til slateforholdene (Lerfall et al. 2015).

Tabell 1: Fra Lerfall et al. (2015) Blodparametere målt hos før og etter 45 min trenging før og etter levendekjøling m/CO₂.

	Uncrowded only	Uncrowded and Chilled	Crowd only	Crowded and chilled	<i>P-value</i>
<i>Initial muscle pH</i>	7.35±0.09 ^a	6.84±0.12 ^c	6.99±0.26 ^b	6.72±0.14 ^c	<0.001
<i>Muscle pH day 4</i>	6.27±0.03	6.23±0.03	6.24±0.03 ^a	6.25±0.03	>0.240
<i>Temperature</i>	5.14 ± 0.24 ^a	1.93 ± 0.34 ^b	4.93 ± 0.37 ^a	1.49 ± 0.44 ^c	<0.001
<i>Blood parameters</i>					
<i>pH</i> ³⁾	7.77±0.04 ^a	7.10±0.30 ^c	7.64±0.09 ^b	7.13±0.05 ^c	<0.001
<i>Na⁺, mmol l⁻¹</i>	159.36±6.85 ^c	168.60±5.56 ^b	171.75±6.17 ^{ab}	177.60±4.35 ^a	<0.001
<i>K⁺, mmol l⁻¹</i>	3.80±1.31	4.48±0.83	3.76±0.35	4.80±0.69	>0.065
<i>iCa, mmol l⁻¹</i>	1.48±0.14 ^d	1.83±0.10 ^b	1.64±0.19 ^c	2.01±0.08 ^a	<0.001
<i>pCO₂, mmHg</i> ³⁾	<5 ^b	31.30±3.00 ^a	6.66±1.62 ^b	32.67±2.69 ^a	<0.001
<i>pO₂, mmHg</i> ³⁾	27.63±10.22	-	10.04±5.85	4.05±0.68	<0.001
<i>Glucose, mmol l⁻¹</i>	4.41±1.56 ^b	7.03±1.17 ^a	5.63±0.98 ^{ab}	6.09±1.28 ^a	<0.001
<i>Hematocrit, %</i>	12.51±1.57 ^d	18.61±1.23 ^b	14.95±2.04 ^c	20.94±1.82 ^a	<0.001
<i>Lactate, mmol l⁻¹</i>	0.37±0.16 ^c	5.06±0.94 ^b	3.95±2.34 ^b	7.23±1.15 ^a	<0.001

¹ Mean value of 24 individuals per group, in total 96 individuals

² Mean value of 3-11 individuals per group, in totals 21-43 individuals

³ Partial gas pressures pO₂, pCO₂ and blood pH were corrected due to the seawater temperature

Different lower case letters in the same row indicate significant differences between means (P<0.05) by one-way ANOVA.

Ulvan Forsøk utført januar 2014

I dette forsøket gikk vi spesifikt inn for å se på effektene av kjøletanken, og det ble utført et forsøk hvor fisken gikk gjennom vanlig prosedyre men uten tilsatt CO₂. Deretter ble den sammenliknet med fisk som gikk gjennom kjøletanken ved normal prosedyre, d.v.s. med tilsatt CO₂. Begge forsøkene ble utført tidlig på morgenen i to påfølgende dager, med fisk fra samme anlegg og av samme størrelse. Fisken ble trengt og pumpet opp i kjøletanken og holdt der i ca. 40 minutter. Det ble tatt kontrollprøver av fisk som kun ble pumpet, slik at man fikk et bilde av fiskens tilstand før den ble kjørt gjennom kjøletanken. Det ble tatt prøver fra 10 fisk ved hver behandling. Resultatene er presentert nedenfor.

Adferdsrespons:

I levendekjølingstanken u/ CO₂ viste fisken få tegn til stress eller flukt. Fisken responderte etter pumpingen ved å legge seg på bunn og forble rolig gjennom hele levendekjølings prosessen. Tettheten spilte litt rolle, ettersom siste kammer med mest fisk hadde litt mer «uro» enn de andre kamrene. Alle fisker observert hadde normale adferdsresponses og sprellet på samlebandet.

Etter at forsøket med levendekjøling u/CO₂ var gjennomført ble CO₂ gass tilført anlegget. Under dette tidsrommet kunne en observere at fisken reagerte med stress i alle kammer ved å trekke opp til overflaten og øke svømmeaktiviteten. Responsen mot en gradvis tilførsel av CO₂ hadde på ingen måte noen mildere effekt, hvor det tok lenger tid (ca 10 min) før fisken falt til ro.

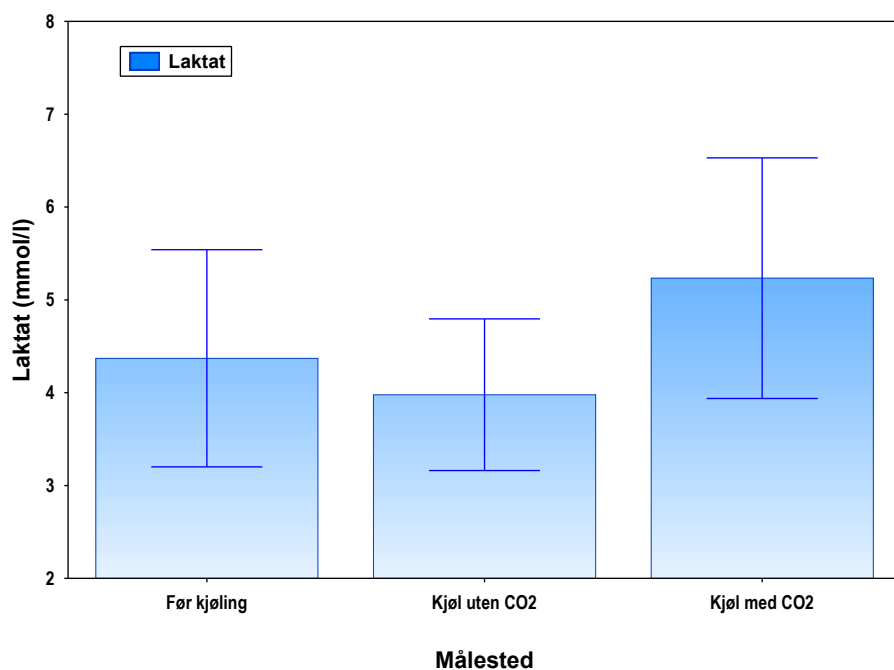
Neste dag ble CO₂ forsøk gjennomført med nytegnat fisk og frisk klart RSW m/ CO₂ i levendekjølingstanken. Adferdsresponsen til fisken avvirket ikke ifht til normal drift, hvor bedre vannkvalitet hadde ikke noe formidlende effekt. Analyser av fiskens bevissthetstilstand (Kestin et al. 2002) ut av levendekjølingstanken viste at 50% av fisken var bedøvet med fravær av alle responser. Tjueseks prosent var sedert og 24 % lå i grenseland mellom bevisst og sedert med fravær av fleste responser men øyerulling på begge øyner.

Når det gjelder bedøvelse og avliving med slag ble det en kamp for bløggerene å få fisken inn i slagmaskinene (Stansas) når CO₂ ikke var tilsatt levendekjølingstanken. Analyser av fisk etter slag viste at 54 fisk av 300 (18%) viste klare tegn til bevissthet etter slag, d.v.s. stor andel av feil-slag, hvor særlig småfisk og stor fisk var sterk representert. Det ble også rapportert om levende fisk før sløyning og det måtte settes opp ekstra personer for avliving.

Etter at CO₂ anlegget slått på, ble samme gruppe av fisk analysert. Analysene viser at for fisk tilført CO₂ viste kun 5 av 300 fisk (1.6 %) noen tegn til bevissthet ved øyerull. I motsetning til tidligere var det ingen tegn til liv i utblødningsstanken.

Den dårlige suksessraten på slag ble tatt opp med produsenten Seaside a/s. I ettertid viste det seg at teknikere ved Ulvan hadde modifisert slagmaskinen ved å montere på lange eksosrør for å dempe smellet. Dette medførte til at slagmaskinen mistet mye kraft ved trykkluft fra sylindren ble hemmet. Dermed vil den minste feil i posisjon medføre mangelfull bedøvelse/ avliving.

Fysiologi:

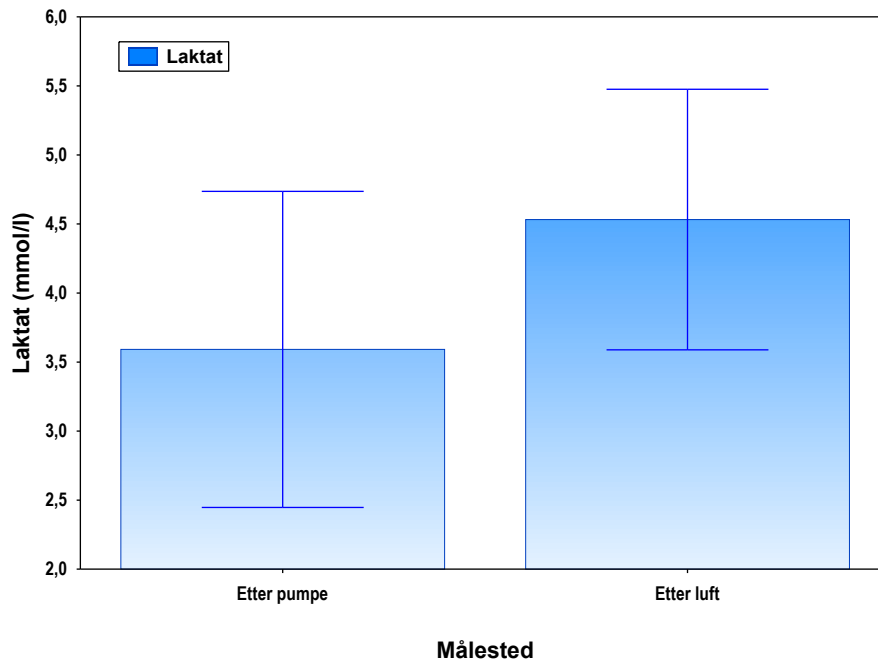


Figur 19: Laktatnivå i blod på laks i starten av produksjon om morgenen med nytrengt fisk tatt ut ved pumpen (før kjøling) og etter kjøling med og uten CO₂.

Av figur 19 ser man at laktat-innholdet i blodet før kjøling har et gjennomsnitt på 4.4 mmol/l. Etter 40 minutter i kjøletank (uten CO₂) har det gjennomsnittlige laktat-nivået sunket til 4.0 mmol/l. Dette er naturlig ettersom fisken var veldig rolig i denne fasen. I gruppen som neste dag ble sendt gjennom kjøletanken med tilsatt CO₂ steg nivået i blodet fra 4.4 til 5.5 mmol/l. Dette er en signifikant økning i forhold til nivået som ble målt i fisk som ikke fikk CO₂. Det ble også observert mer bevegelse i tanken når det var CO₂ tilsatt. Det kan derfor se ut som tilstedeværelse av CO₂ fører til mer aktivitet i fisken, fluktnesponser og lignende.

Imidlertid er det en annen faktor som må tas med i prosessen. Etter kjøletanken blir fisken ført på et bånd ned til slag/bløgge-maskin. Her blir den liggende i luft 1 min før den blir ført inn i maskinen manuelt. Etter å ha observert både usedert og sedert fisk gå gjennom denne prosessen fant vi det nødvendig å karakterisere effekten av denne 1-2 minutters perioden. Blant den usederte fisken ble det observert mye sprelling, en aktivitet som selvsagt er assosiert med muskelbruk, og vi antok at det ville ha en effekt på laktatnivå hos fisken. Vi undersøkte derfor en ny gruppe fisk ved å ta ut fisk direkte etter pumping (før kjøletanken) og ta blodprøve umiddelbart. Deretter lot vi fisken være i 2 minutter (i luft) mens den sprellet, for å simulere tiden det tok fra kjøletank på båndet til

slag/bløgging og tok deretter en ny blodprøve. Dette ble utført på 5 fisk totalt. Resultatene er presentert i figuren nedenfor.



Figur 20: Laktatnivå i blod på laks før og etter å ha ligget 1 min i luft.

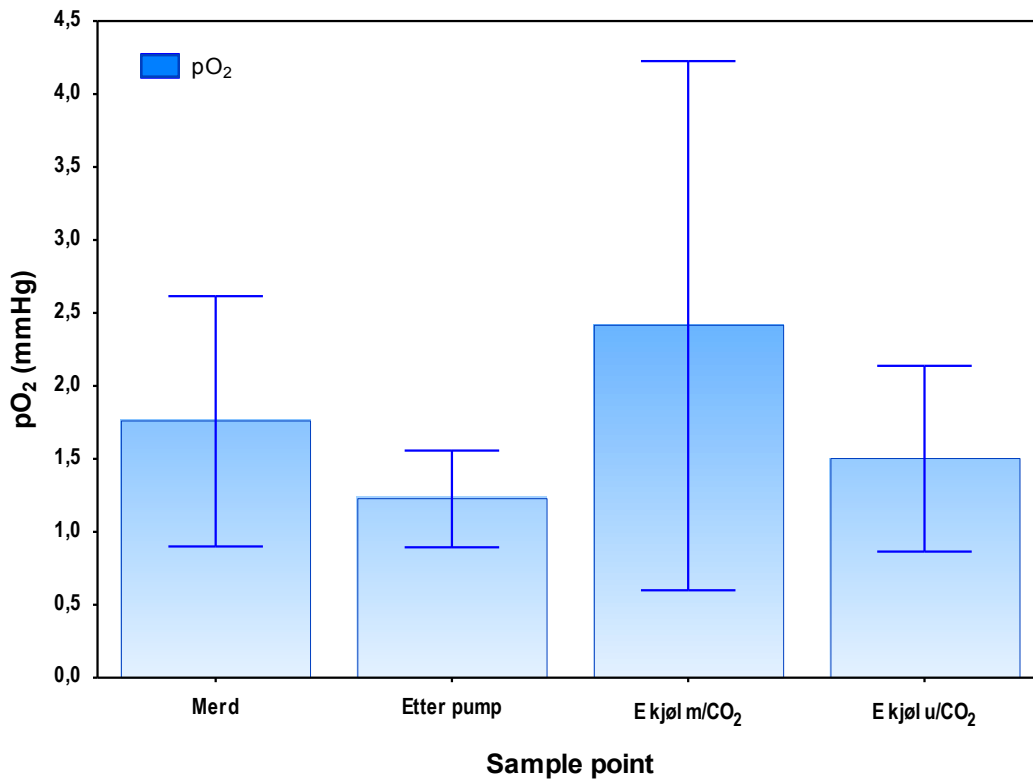
Som man kan se av figur 20 så stiger det gjennomsnittlige laktat-innholdet i blodet fra 3.6 til 4.5 mmol/l i løpet av de to minuttene den tilbringer i luft. Denne delen av slakteprosessen bør dermed være med i totalvurderingen av ytre påvirkning på fiskens fysiologi under slakt, ettersom sedert fisk ikke vil ha den samme økningen i tiden i luft, rett og slett fordi de ikke bruker muskler. Det er dermed rimelig å anta at dersom man ser på fysiologi alene, så vil de økte laktat-nivåene man ser ved eksponering av fisken for CO₂ i kjøletanken, bli utjevnet ved at usedert fisk vil få en økning i laktatnivå som følge av høyere bevissthet i den korte perioden etter kjøling/før slag. Sluttsummen blir med andre ord ganske lik.

Tabell 2: Ione og glukose innhold i blod på laks før og etter levendkjøling med og uten CO₂.

Behandling	Na	K+	iCa	Glu	pH
Etter pumpe	159,2 (3,9)	3,7 (0,6)	1,5 (0,1)	102,2 (17,6)	7,4 (0,1) *
Etter kjøll (u/ CO ₂)	162,5 (3,1)	2,7 (0,5) *	1,5 (0,1)	107,8 (16,8)	7,6 (0,1) *
Etter kjøll (m/ CO ₂)	160,0 (5,9)	3,5 (0,3)	1,6 (0,1)	124,4 (23,1)	7,1 (0,1) *

I samsvar med tidligere forsøk viser resultater på ioneinnholdet og oksygen innholdet i blodet det lite som vitner om osmoregular- og respiratorisk forstyrrelse som følge av gass og temperatur. Naturlig er imidlertid en pH senkning som følge av økt CO₂ nivåer i blod. Interessant er resultatene på

levendekjøling u/ CO₂, hvor fisken viser tegn til restituering med en senkning av kalium og blod pH opp mot det normale.



Figur 7: Oksygen nivå i blod på laks før og etter levendekjøling med og uten CO₂.

Diskusjon

Prosjektet har gjennom en periode på tre år undersøkt fysiologiske aspekter ved slakteprosesser som til daglig utføres ved Marine Harvest sine slakterier på Hjelmeland, Ulvan og Eggesbøneset. Fokus har vært rettet mot å kartlegge de grunnleggende fysiologiske responsene fisken viser etter ankomst til slakteriet (ventemerde, brønnbåt) og frem til død, samt identifisere effekter av enkeltledd i produksjonen hvor man kan forbedre total velferd under slakt av laks. Spesifikt har man sett på:

1. Fysiologiske effekter av trenging/pumping fra ventemerde og brønnbåt
2. Respons på nedkjøling (sederingsstank)
3. Adferd og fysiologi relatert til CO₂-sederings
4. Vannkvalitet og bakteriologi i levendekjølingstank
5. Kvalitet og drypptap i forhold til stress

Gjennom kontrollerte små-skala laboratorieforsøk og fysiologiske undersøkelser i stor-skala, har prosjektet belyst viktige aspekter rundt avlivning av laks som bør tas hensyn til i forhold til videre praksis for å sikre at god dyrevelferd ivaretas.

I likhet med tidligere studier 19 viser alle forsøk at trengfasen er en flaskehals når det gjelder stress. I forsøkene som ble utført i prosjektet ble det demonstrert at laktat akkumulerte over tid, fra å være lav når fisken er uthvilt ved starten av trenging til den er høy når fisken er nesten utmattet 2 timer senere. I de tilfellene hvor trengperioden var kort (mindre kast) øker laktatverdiene vesentlig mindre enn i de tilfellene hvor trengperioden gikk over lang tid (store kast). Videre vil pumpingen ha en effekt, hvor man generelt ser en videre, om enn moderat, økning i laktat-verdier. Siste fasen før fisken går inn i slagmaskinen er perioden i levendekjølingstank med tilsatt CO₂. I denne fasen, som vanligvis varer i ca 30-40 minutter, observeres det en vesentlig mindre akkumulering av laktat. Ser man alle forsøkene under ett, viser resultatene at all utvilt fisk ender opp med et laktatnivå mellom 2-5 mmol/L etter pumping og levendekjøling, hvorav levendekjølings delen står for den minste delen av målt muskelaktivitet. I praksis betyr dette at fisken som er gjenværende i merden etter en lang trenging, vil ha like høyt laktatnivå (før pumping og kjøling) som den som er pumpet og levendekjølt med /CO₂, uavhengig av årstid. Ser en resultater fra brønnbåt med skyveskott viser resultatene at fisken responderer meget jevnt utover dagen på samme nivå som er målt fra fisk i startet av et nytt kast i en vente merde. Det kan tenkes at forskjellen mellom ventemerde og skyveskott ikke bare ligger i fremdrift prinsippet, men også i de gitte lysforhold, hvor mørke vil ha en beroligende/paralyserende effekt. En bør derfor vurdere nye teknologi for innfangning og driving av laks inn mot pumpe-systemer.

Ser en på tidligere studier finnes det lite materiale som omfatter målte fysiologiske responser hos fisk gjennom slakteprosessen. På kvalitet finnes det en rekke studier som viser mye av de samme trendene som i disse forsøkene. En studie på ny-trengt fisk fra Ulvan (Roth et al. 2009) som sammenlignet slag og el-bedøving ved merdkanten, etter pumping og levendekjøling viste at

pumping og 12 sekunders el-bedøving var de 2 enkeltfaktorene med størst innvirkning på nesten alle målte parametere som pH, rigor og kvalitet målt farge, tekstur og gaping, uavhengig om fisken gikk gjennom en levendekjøling eller ikke. Selv om tidligere forsøk identifiserer forskjeller i kvalitet på laks avlivet direkte med salg eller via levendekjøling med CO₂ (Merkin et al. 2014), kan studier i forbindelse med dette forsøket sies å vurdere forskjeller under normale prosedyrer og ikke alltid de mest ekstreme (utstresset vs utmattet). I disse studiene (Lerfall et al. 2015) viser at de relative forskjeller i kvalitet mellom laks i starten av et lite kast og i slutten, er ikke målbar. Imidlertid sammenligner en dette med utstresset fisk avlivet ved merdkanten kan forskjeller kun måles etter 2 ukers lagring. Imidlertid må det anføres at forsøkene har ved et par tilfeller målt at fisken i slutten av et stort kast er tilnærmet utmattet. Det kan derfor tenkes at disse forholdene vil kunne skape en relativ stor prosentvis andel som kan representere et kvalitets «problem». Sett i sammenligning med andre studier viser dette at enkelte slakteri kan trenge fisken i over 3 t (Roth et al. 2014).

En annen faktor som kan ha en betydning på kvaliteten er mikrobiologisk krysskontaminering. Som vist i Figur 11 og 12 viser både utblødning- og levendekjølingstanken en mikroflora av «spoilage» bakterier som akkumulerte i tråd med tiden med nivåer opp i $\times 10^4$ til 10^8 av rekke arter som Vibrio sp, Lactobacillus sp og Pseudomonas sp. En ser også at det innføres nye «spoilage» arter som etablerer en kultur. Pga mengden av organiske materialer i prøvene kan mengden av mikroorganismer og artsmangfoldet sies å være underrepresentert. Potensielt sett kan dette være et problem for næringen. Selv om fillet i utgangspunktet er beskyttet vil en økt antall kimtall av «spoilage» bakterier allerede i start kunne medføre en tidlig utvikling av dårlig lukt i f.eks gjellehulen. Forsøk med QiM både i start av og i slutt produksjonen viste ingen forskjeller, men som gitt i resultatene hadde tankene etablert en spoilage-flora allerede ved start av produksjonen. Dette er et tema en bør i større grad undersøke videre for å avgjøre hvorvidt bruk av tanker med vann og biologisk materiale representere en risiko mht holdbarhet på gitte temperaturer.

Temperatur

Når det gjelder kjøling viser alle forsøk og resultater både fra tunell respirometer og storskalaforsøkene at dette ligger innenfor laksens toleranseområde. Foss et al. (2012) rapporterte at dersom temperaturfallet blir for stort, vil fisken få osmoregulatorisk og respiratorisk kollaps med døden til følge. Ingen av forsøkene viste dette, hverken gjennom en gradvis senkning eller ved en brå overgang. Ser en på forsøkene med tunnelrespirometeret som er gjennomført på temperaturer ned mot 1 °C, viser laksen ingen responderer med stress både atferdsmessig eller gjennom å ha et økt O₂ opptak. Imidlertid ser en at laksen får nesten halvert sitt O₂ forbruk, samtidig som nedkjølingen gjør at enkelte fisker får problemer med å holde svømmehastigheten på 1 kroppslengde pr sekund. I slaktesammenheng vil dette helt klart være positivt gjennom å forhindre hypoksi under høye tettheter og håndtering, samtidig som fisken hemmes i å ta ut sitt fulle energi potensial ved en evt fluktrrespons. Foruten dette vil en innføre en tidlig kjølekjede innen matproduksjonen som kan ansees som positivt.

Ser en på de kommersielle forsøk med levendekjøling gjennom ulike årstider viser imidlertid ingen fisk tegn til osmoregulatorisk og respiratorisk svikt hverken på sommerstid fra +16 ned til + 0.5 °C eller vinterstid fra +8 til -0.3 °C (Tabell 2). Sistnevnte forsøk fra Ulvan 2014, vinterstid viser at fisken faktisk restituerte etter pumping gjennom de 30-40 min den var i -0.3 °C (tabell 2). Ser en på sommer

situasjonen både på Hjelmeland og Ulvan (Figur 16-17), hvor det var ulike temperaturer i levendekjølingstanken kan høyere temperaturer i tanken ikke sies å være en fordel, da beste resultater var oppnådd på Hjelmeland med temperaturer ned mot 0.5 °C. Disse resultatene er betydelig lavere og større temperatursprang enn det anbefalt av Foss et al. (2010). Årsakene til dette kan være fiskestørrelse, hvor Foss et al. 2012 nyttet smålaks (+500g). Likeledes vil overflate temperaturen ved slakteriet ikke alltid være representativt, hvor fisken er akklimatisert til dypere vann på merd anlegget. Det store spørsmålet er hvordan fisken egentlig reagerer på kaldt vann?

Imidlertid må det påpekes at temperaturer under 0 °C nok er på grensen hva fisken kan tåle, spesielt på sommerhalvåret og at det derfor er viktig med god temperatur styring.

CO₂

Bruken av CO₂ synes imidlertid å gi grunnlag for diskusjon. I likhet med tidligere studier (Robb et al. 2000; Erikson 2013) vil CO₂ gi grunnlag for stressrespons hos fisk. Fisken reagerer ved kontakt med økt svømmeaktivitet som i korte perioder kan være fluktnesponser. Imidlertid er denne responsen kortvarig før fisken får akkumulert tilstrekkelig med CO₂ i blodet og vil falle til ro. Resultatene fra blodanalyser viser at fisken på ingen måter klarer å ta ut sitt energipotensial ved kontakt. Avhengig av CO₂ konsentrasjon (pH 5.8-6.0) og tid i tanken vil fiskens bedøvelse tilstand variere alt fra letter sedert til en bevisstløs tilstand. Ser en grundigere på dette gjennom tunell respirometer viser resultatene klart at fisken responderer mot selve konsentrasjonen av CO₂ gassen på nivåer lenge før dette kan ha noen fysiologisk innvirkning på fisken. Dermed synes det at fisken responderer mot pCO₂ fremfor pH. Dette avviker mht tidligere studier med CO₂ som viser at pH er sentralt, hvor laks er fint tolererer pH under 7. Forklaringen kan ligge i sjøvannets bufferingsevne for CO₂, hvor sjøvann innehar høyere konsentrasjoner av CO₂ ved pH lik 6.5 enn hva som er overhode mulig i ferskvann. Både forsøk i tunell respirometer og forsøk ved Ulvan vinteren 2014 viser ved å tilsette CO₂ og la nivået akkumulere med tid medfører en forlenget stress og fluktnespons før nivået er såpass høyt at fisken blir immobilisert.

Store spørsmålet er hvorvidt fisken føler PCO₂ som kvelning hvor den gjennomgår hypoksi? Tidligere studier viser at in vivo infusjon av CO₂ som bikarbonat ikke medfører responser hos fisken og dermed er adferd og responser regulert av O₂ nivået og ikke CO₂ direkte. Imidlertid viser forsøkene i respirometer (Figur 3) at fiskens O₂ opptak faller i tråd med økende CO₂ nivået i blod som karboksylsyre. Dette tyder på at acidose hemmer hemoglobins evne til å bære O₂. Sammenligninger en dette med studier mellom CO og CO₂ (Bjørlykke et al. 2012; Farwell 2009) viser dette klart at CO som binder seg til Hb medfører hypoksi. Dette observeres ved anaerob forbrenning, og høye laktatnivåer med snitt rundt 13 mmol/L. I motsetning til dette ligger CO₂ bedøvet fisk på et laktatnivå på mellom 3-6 mmol/L negativt korrelert med CO₂ nivået. Disse studiene er i samsvar med både resultater fra storskalaforsøkene på Ulvan (Figur 19) og respirometer (Figur 5), hvor CO₂ gir en mindre økning i laktat ifht til kontrollgrupper.

Forklaringen vil ligge i hypercapnia, hvor CO₂ i likhet med landdyr vil akkumulering i hjernen og annet vev føre til cellular svikt og med tilstrekkelig CO₂ vil en kunne oppnå en bevisstløs tilstand og død (Robb et al. 2000). Dette observeres i alle forsøk ved frigjøring av intracellulære ioner som K⁺ og Ca²⁺ som følger en pH senkning. Fordelen med hypercapnia er at den er irreversibel i det øyeblikk respirasjonen forhindres og vil være meget effektiv for bedøvelse før avliving. Dette kan gjelde andre og mer hardføre arter mht hypoksi og død. På bakgrunn av disse forsøkene viser resultater klart at fisken responderer med stress mot CO₂ på nivåer hvor fisken ikke vil kunne sederes eller bedøves. Dette viser helt klart at CO₂ må brukes i en slik grad at CO₂ nivåer forstyrrer sentralnervet systemet hurtig.

Når det gjelder vannkvalitet, finnes det pr. nå lite beskrivelse i hvilken grad TOC nivåer påvirker fisk på kort og lang sikt. Uten tvil vil et TOC nivå >15 mg/L for et ferskvannsdrag gi laveste karakter når det gjelder vannkvalitet. Imidlertid er dette et vanskelig emne. Høye TOC verdier i naturen gjennom avrenning er ofte sammensatt med frigjøring av uorganisk materiale og lite oksygen. Gjennom alle forsøks-seriene som startet om morgenen og avsluttet på slutten av et skift er det ingen indikasjon på at fisken reagerer med større fysiologisk utslag ettersom TOC verdiene gjennom dagen øker. Heller ikke respiratoriske problemer har vært observert. Årsaken til dette er uklar, men en mulig forklaring er at det har mindre å si eller at mulige negative effekter blir eliminert gjennom sederings effekten.

I likhet med tidligere studier (EFSA 2009) er stressbelastning og velferden for fisk under slakt summen av alle faktorer som gjelder fra trengeing frem til død. I denne er det prosessen finnes det en rekke flaskehalsar som har en direkte betydning på fiskevelferden og i hvilken smerte grad dette gjelder. Dette kan gjelde trengetid, vannkvalitet i sjø/kjøletanken, temperatur, orientering inn i elbedøvere og innstillingene ifht størrelse for slagmaskiner. Isolert sett kan det enkelte ledd risikovurderes mht til styrker og svakheter, men sammensatt vil interaksjonen ofte være av betydning.

Når det gjelder bruken av CO₂ til sedering og bedøvelse vil en isolert sett lett kunne konkludere dette som stressende pga fiskens respons. Imidlertid finnes det en samspillseffekt med andre metoder som må tas i betraktning til dets bruk. Sett opp mot andre metoder som strømbedøvelse og slag kan disse ansees som tilnærmet momentane og langt bedre bedøvelsesmetoder, hvis de fungerer optimalt. Imidlertid eksisterer det alltid en bomslags prosent, orienteringsfeil i elbedøver, oppvåkning under utblødning og ikke minst kvalitetsproblemer med dårlig kjølekjede og tidvis skader. Bruken av CO₂ vil i denne sammenheng kunne ansees som en avveining og sikring mot avvik i disse systemene. Dette kan gjelde tiden fisken kan være i fri luft før manuell innføring i slagmaskiner og videre effektivitet ved avliving.

Som oppsummering konkluderes følgende:

- Nedkjøling til 1 °C synes i seg selv ikke å ha noen sederende effekt på fisken bortsett fra at den blir noe mindre aktiv. Det ser heller ikke ut til at kjøling fra 8 °C til 1 °C er stressende for fisken. Det er heller ingen endringer i blodparametrene.

- Temperaturen i kjøletanken (ned mot -0.3 °C) representerer ikke et fysiologisk stress for laks av slaktestørrelse jfr. våre forsøk og tidligere publisert material. Imidlertid indikerer resultater at en kan levendekjøle ned mot -0.3 °C vinterstid og $+0.5\text{ °C}$ under normale sommertemperaturer.
- Nedkjøling burde derfor være en god måte å sørge for kvaliteten til fileten etter slakting.
- Vannkvalitet i kjøletanken er generelt innenfor akseptable nivåer. Oksygen er rikelig tilgjengelig. Fritt CO_2 er stabilt og kontrolleres v.h.a. pH-målinger. Total ammoniakk mengde (TAN) representerer ikke en fysiologisk påkjenning jfr. publisert litteratur. Totalt organisk karbon (TOC) er den vannparameteren som det kan stilles spørsmål ved, og som bør vurderes forbedret ved økt rensing eller utskifting av vann.
- Laktat er den enkeltfaktoren som gir oss raskest informasjon om fiskens fysiologiske tilstand. En økning i laktat tilsier økt aktivitetsnivå i fisken.
- Vi har funnet en klar sammenheng mellom økning i laktat og varighet av trengetid. Trenging og pumping er de to enkeltfaktorene som har størst påvirkning på fiskens fysiologiske tilstand under slakteprosessen.
- En CO_2 opphopning i fisken reduserer hemoglobinetts affinitet for oksygen og dermed lavere okygenopptak. Imidlertid viser ingen av blodprøvene tegn til intracellulær hypoksi.
- Adferdsobservasjoner viser økt aktivitetsnivå ved tilsatt CO_2 i kjøletank i forhold til kjøling uten CO_2 .
- CO_2 bør ikke innføres gradvis, da laks i sjøvann reagerer med stress mot CO_2 nivåer som ikke er tilstrekkelig for å bedøve/sedere
- Hos fisk som har gått gjennom kjøletank uten CO_2 observeres en meget høy feilslagsprosent og oppvåkning av fisk under bløgging.