

# Varmebehandling av laks i forbindelse med avlusing

RAPPORT TIL MATTILSYNET

Av Anders Mangor-Jensen, Lars Helge Stien, Jan Erik Fosseidengen og Ragnfrid Mangor-Jensen



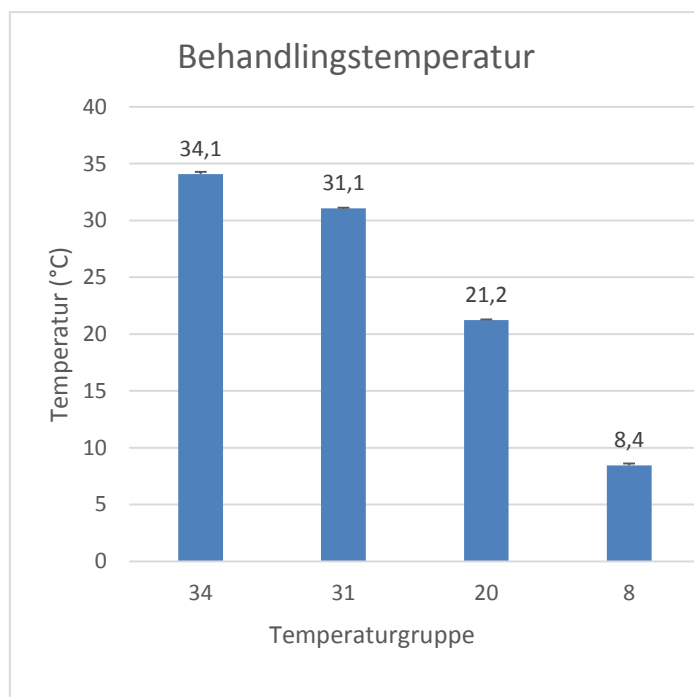
foto: Samantha Bui

## Varmebehandling av laks i forbindelse med avlusing

I det følgende beskrives et forsøk der laks ca 2-4 kg utsettes for oppvarmet vann i 30 sekunder for deretter å restitueres i normaltemperatur i 14 dager. Hensikten med forsøket er å undersøke effekten av selve varmebehandlingen på fiskens velferd. Velferdsaspekter i forbindelse med pumping og trenging kan leses i Epsmark mfl. (2012).

### Gjennomføring

40 laks ble flyttet fra sjølokaliteten til Forskningsstasjonen Austevoll i innendørs tanker på 2,5



Figur 1. Temperatur i behandlingsvannet. Middelerdi målt gjennom forsøket + S.D.

meter i diameter og 1,2 meters dybde. Fisken ble fordelt med 20 fisk i hver av to tanker (holdekar), hvor den gikk i ca 14 dager før forsøkene for akklimering til 8 °C vann. Sjøtemperaturen var på dette tidspunktet ca 8-9 °C i overflaten. I perioden frem til forsøksstart ble det klargjort ytterligere fire tanker (restitusjonskar) hver med overmontert kamera for overvåking. Kameraene var tilkopleet et videosystem som tillot opptak i flere kanaler samtidig. I tillegg ble det rigget et varmebehandlingskar (transportkar – 500 liter) der vannet ble varmet med varmekolber på 3 kW. Ved de ulike temperaturbehandlingene ble vannet holdt med +/- 0,5 °C innenfor fastsatt temperatur.

Det ble også montert kamera over varmebehandlingskaret. Hver temperaturgruppe bestod av 10 fisk. Etter at vannet hadde oppnådd riktig temperatur, ble fisken overført med en finmasket spesial håv fra holdekarene og dyppet i varmebadet i nøyaktig 30 sekunder. Fiske ble holdt i håven gjennom hele behandlingen, slik at dyppbehandlingen ble helt nøyaktig i tid. Tre ulike temperaturer, i tillegg til kontroll, ble benyttet i forsøket. Hver gruppe bestod av 10 fisk som ble behandlet enkeltvis. Etter hver behandling ble fisken raskt tilbakeført til egne restitusjonskar med normaltemperert vann. Under og etter varmebehandlingen ble fisken filmet for å dokumentere eventuelle avvik.

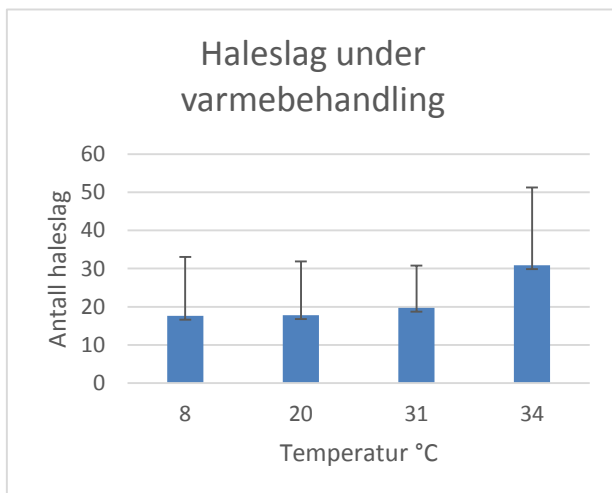
## Prøvetakning

Ett døgn etter varmebehandling ble det tatt ut fem fisk fra hver gruppe for undersøkelse av slimceller. Tidligere forøk med thermolicer har indikert at man etter en tid kan se en fortykkelse av fiskens slimlag og en økning i antall slimceller pr. areal. Fisken ble håvet enkeltvis med finmasket håv og plassert i bedøvelse (MS222, dødelig dose). Når fisken ikke lenger reagerte på stimuli (knip i sporden) ble den tatt opp og avlivet med et slag i hodet. Fra forsøksfisken ble det dissekert et hudområde på ca 2 x 2 cm fra ryggen nedenfor ryggfinnen. Denne plasseringen ble gjentatt for all fisken fordi det kan være variasjon i slimlaget på ulike deler av kroppen. Hudprøven ble plassert i en histologikassett og fiksert i bufret formalin og sendt for videre undersøkelse. Lengde og vekt til alle individene ble registrert for å undersøke eventuelle forskjeller som funksjon av størrelse.

Neste prøveuttak var etter 15 dager etter behandling. De resterende individene fra hvert restitusjonskar ble håvet ut og avlivet på samme måte som i første uttak. I tillegg til histologi prøver, ble i dette uttaket også tatt blodprøver for å undersøke elektrolytter. Prøvene ble tatt i halevenen, hvor det vanligvis er lett å få ut en stor mengde blod. Prøvene ble sentrifugert og plasma overført til et rent sentrifugerør og lagret på -20 °C. Analyser av elektrolytter vil ikke påvirkes av lagring i frossen tilstand. Analysene ble utført ved kjemilaboratoriet ved Forskningsstasjonen Matre.

## Resultater

Gjeldende vanntemperaturer er oppgitt i figur 1. Temperaturen ble logget under hele behandlingen og holdt seg svært stabil. Det var ikke nødvendig med temperaturjusteringer i løpet av hver 10-fisk behandling som totalt varte ca. 10 minutter. Etter hver gruppe ble vannet tilsatt kaldt sjøvann for å redusere temperaturen ned til neste nivå. Behandlingsvannet ble hele tiden holdt under omrøring av en nedsenket Eheim sirkulasjonspumpe for å hindre gradienter. Analyse av videoopptakene fra varmebehandlingen viser at fisken forholdt seg svært rolig under hele behandlingen (figur 2).



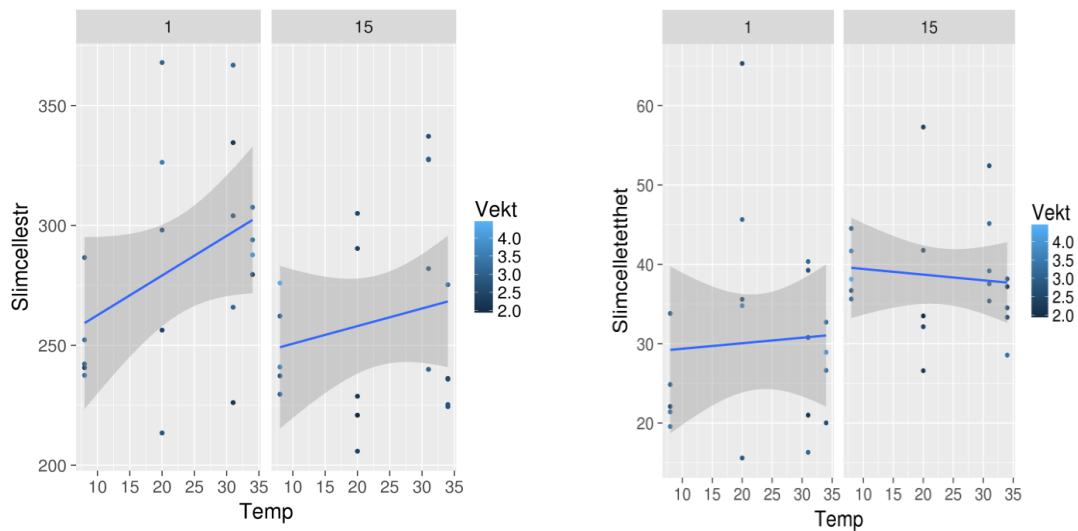
Figur 2 Gjennomsnittlig antall haleslag under behandling + S.D.

Antall haleslag i løpet av de 30 sekundene fisken var nedsenket i behandlingsvannet viser svært liten aktivitet. Aktiviteten var høyest de første 15 sekundene av behandlingen, men inntrykket fra alle opptakene er at fisken

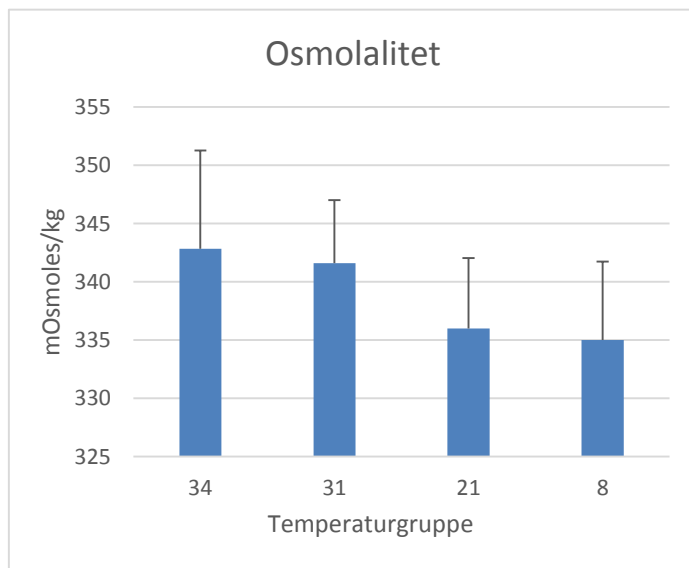
forholder seg svært rolig. Haleslagene var langsomme, og med lite utslag. I 34 °C gruppen var det likevel noe større aktivitet enn i de andre gruppene, selv om forskjellene ikke er signifikante. Etter at fisken ble satt i restitusjonskaret etter behandlingen viste den ingen tegn til unormal

atferd bortsett fra normalt lett stress som følge av håndtering. Dette var tilfellet i alle behandlingsgruppene.

Resultatene fra slimcelleundersøkelsen er vist i figur 3. Ved dag 1 etter behandling ser det ut til at slimcellestørrelsen har en samvariasjon med temperatur. Den er imidlertid liten, og ikke statistisk signifikant. Denne trenden finner man heller ikke ved målingene på dag 15 etter behandling. Det ble heller ikke påvist endringer i slimcelletetthet verken én eller 14 dager etter behandling. Histologien ble utført av CSO Quantidoc as (Bergen).



Figur 3. Slimcellestørrelse og slimcelletetthet ved tidspunktene 1 dag etter behandling og 15 dager etter behandling.

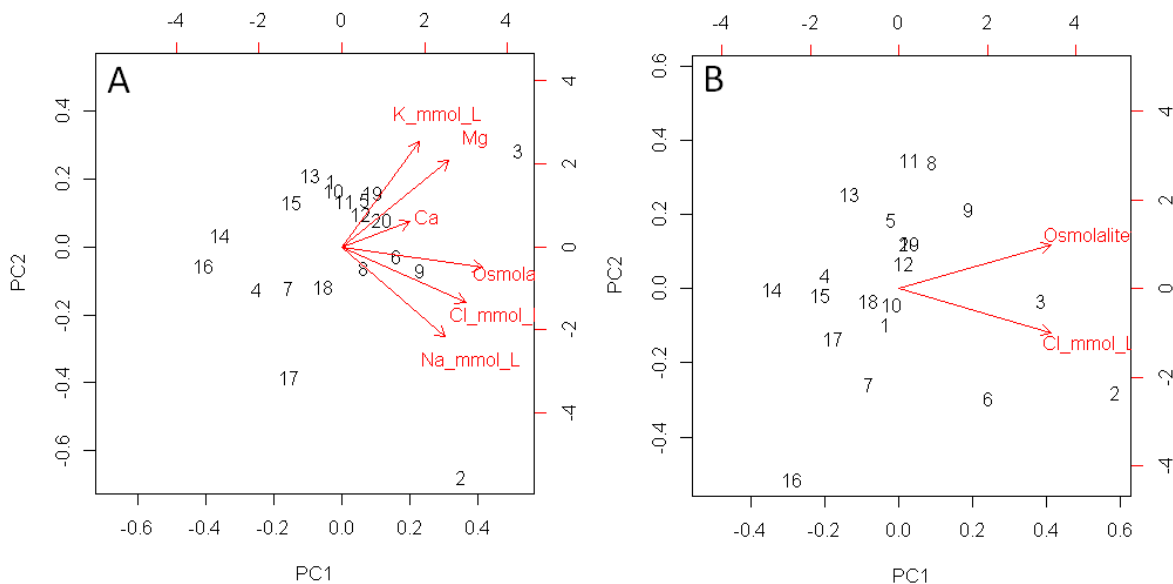


Figur 4. Gjennomsnittlig plasmaosmolalitet i blod til de enkelte temperaturgruppene. Vertikale stolper  $\pm$  S.D.

Elektrolyttmålingene viser at all fisken ligger innenfor normalverdiene. En viktig parameter her er plasmaosmolalitet som gir en god indikasjon på om fisken er i vann- og elektrolyttbalanse. Figur 4 viser plasmaosmolalitet for de ulike temperaturgruppene i forsøket dag 15 etter behandling. Alle verdiene (også enkeltfisk) vises innenfor normalområde for laks. Selv om blodprøvene ligger innenfor aksepterte normalverdier, finner vi likevel en sammenheng mellom temperatur og blod-parameterne. Ved å foreta en multivariat analyse (PCA) fremkommer det et mønster

der alle blodparameterne er positivt korrelert med prinsippal komponent 1 (PC1, figur 5A) som

forklarte 46 % av variasjonen. Behandlingstemperatur hadde imidlertid bare en nær signifikant sammenheng med PC1 (glm:  $p=0,092$ ).



Figur 5. PCR plot over elektrolytter og osmolalitet i plasma

Figur 5A viser imidlertid tydelig at osmolalitet som forventet var sterkt korrelert med kloridkonsentrasjon ( $r=0,85$ ). Osmolaliteten vil i stor grad bestemmes av mengder elektrolytter, og ved stress vil fisken kunne miste vann osmotisk, og dermed oppkonsentrere elektrolyttene. Vi slo derfor disse parameterne sammen i en ny prinsippkomponent (PC1, figur 5B) som forklarte hele 92 % av variasjonen mellom osmolalitet og kloridkonsentrasjon. Denne komponenten korrelerte signifikant med temperatur ( $r=0,46$ ; glm:  $p=0,039$ ), og korrelasjonen økte hvis en slo sammen 8 og 20 behandlingene som 'lav temperatur'-behandling og 31 og 34 behandlingene som høy temperatur behandling ( $r=0,53$ , anova:  $p=0,017$ ). Det var ikke signifikante forskjeller mellom 8 og 20 behandlingene (anova:  $p=0,75$ ), og heller ikke mellom 31 og 34 behandlingene (anova:  $p=0,72$ ). PCA-analysen (figur 1A) tyder på at det kan være en sammenheng mellom temperatur og de andre parameterne også. Det var stor variasjon i dataene, og det er mulig at også de andre blodparameterne ville fremkomme som signifikant med et større datamateriale. For å konkludere, så ser det ut som dataene viser en svak stressreaksjon for de to høye temperaturene (31 og 34 °C), men at dette ligger innenfor et område som ikke påvirker fisken fysiologisk vesentlig.

## Diskusjon

Forsøket ble gjennomført for å undersøke eventuelle effekter av temperaturer opptil 34 °C på laks, som er den maksimale temperaturen som kan benyttes ved varmebehandling av laks mot lus. Grunnen til at 34 °C er brukt i forsøkene er at denne temperaturen regnes som den maksimale som laks kan utsettes for over en svært kort periode. Elliot (1981, 1991 og 1995) beskriver de ulike tåletemperaturene i forhold til akklimatiseringstemperatur, og det er ingen tvil om at laks som utsettes for 34°C vil dø innen en svært kort periode (mindre enn 10 minutter). Behandlingstiden som laksen utsettes for i denne rapporten ligger imidlertid langt fra dette, og

må betraktes som terapeutisk. I forhold til fiskevelferd vil derfor spørsmålet om forvoldning av smerte være mer aktuelt enn somatiske skader. Det er i dag to ulike termo-mekaniske avlusingsmetoder som er rådende, og begge baseres på at fisken føres gjennom en behandler der den utsettes for sjøvann med maksimalt 34 °C. I tillegg til varmtvann vil fisken også utsettes for en mekanisk påkjenning ved at den trenges, og pumpes gjennom systemet (Epsmark mfl. 2012). Denne undersøkelsen hadde imidlertid som mål å se på den isolerte effekten av temperatur, og må således ikke tolkes som en test av termo-mekaniske avlusere. Både under og etter behandlingen ble fisken filmet for å kunne dokumentere avvikende atferd. Fisken ble også holdt under daglig oppsyn i restitusjonsperioden som varte i 14 dager etter behandling. Effekten av temperert vann på avlusing var ikke en del av denne undersøkelsen, og ble heller ikke gjort. Det ble imidlertid funnet død lus både i behandlingskaret og i håven i løpet av forsøkgjennomføringen. Ingen av gruppene viste tegn på avvikende atferd, eller atferd som tyder på tress utover det man må forvente i forbindelse med håving. Gruppen som ble eksponert for den høyeste temperaturen viste en noe høyere haleaktivitet enn kontrollgruppen, men ikke noe som utløste flukt eller stress responser. Mangelen på slik respons indikerer at eksponering for 34°C sjøvann i 30 sekunder ikke utløser smertereaksjoner hos fisken, fordi dette etter all sannsynlighet ville medført endringer i atferd.

Det har tidligere blitt rapportert (iLaks 07.02.2017 av Elisabeth Nodland) at laks som har gjennomgått avlusing med thermolicer vil utvikle et mer robust slimlag. Vi fant ikke denne responsen i vårt materiale, men vi fant heller ikke tegn på det motsatte. En mulig forklaring kan være at utgangspunktet for fiskene i de to forsøkene har vært forskjellig, for eksempel tid på året, sykdomshistorikk etc. En tilleggende årsak kan også være at fisken i det ene tilfellet ble utsatt for en full thermolicer behandling, noe fisken i denne rapporten ikke ble.

Behandlingen som er beskrevet i denne rapporten må imidlertid ikke brukes som en oppskrift for avlusing med temperert vann. Flere uheldige episoder er rapportert, der fisken etter behandling i dypp-bad har utviklet sårskader. I slike tilfeller er det vanskelig med sikkerhet å si noe om årsakene, men det er mye som tyder på at gjentatt tørrhåving, gjerne med flere fisk pr. håv, har vært en medvirkende årsak.

### **Konklusjon**

Det gjennomførte forsøket viser at eksponering av laks i størrelsen 2,5-3 kg for sjøvann opptil 34 °C i maksimalt 30 sekunder ikke forårsaket akutte ytre skader eller utvikling av skader innenfor 14 dager. Under de beskrevne forholdene vil heller ikke fisken vise avvikende verdier i blodelektrolytter eller endringer i slimproduserende organer i huden 14 dager etter behandling. Det ble ikke påvist tegn til økt atferdsstress ved varmebehandling i forhold til kontrollgruppe verken under eller etter behandlingen. Det kan imidlertid ikke slås fast at temperatur ikke vil ha en negativ effekt når fisken utsettes for en tilleggsstressor som mekanisk behandling i thermolicer eller ved tørrhåving.

## Utfyllende litteratur

Elliott JM (1981). Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts. In:- Pickering A D (Ed) Stress and Fish. Academic Press, London. 209-246.

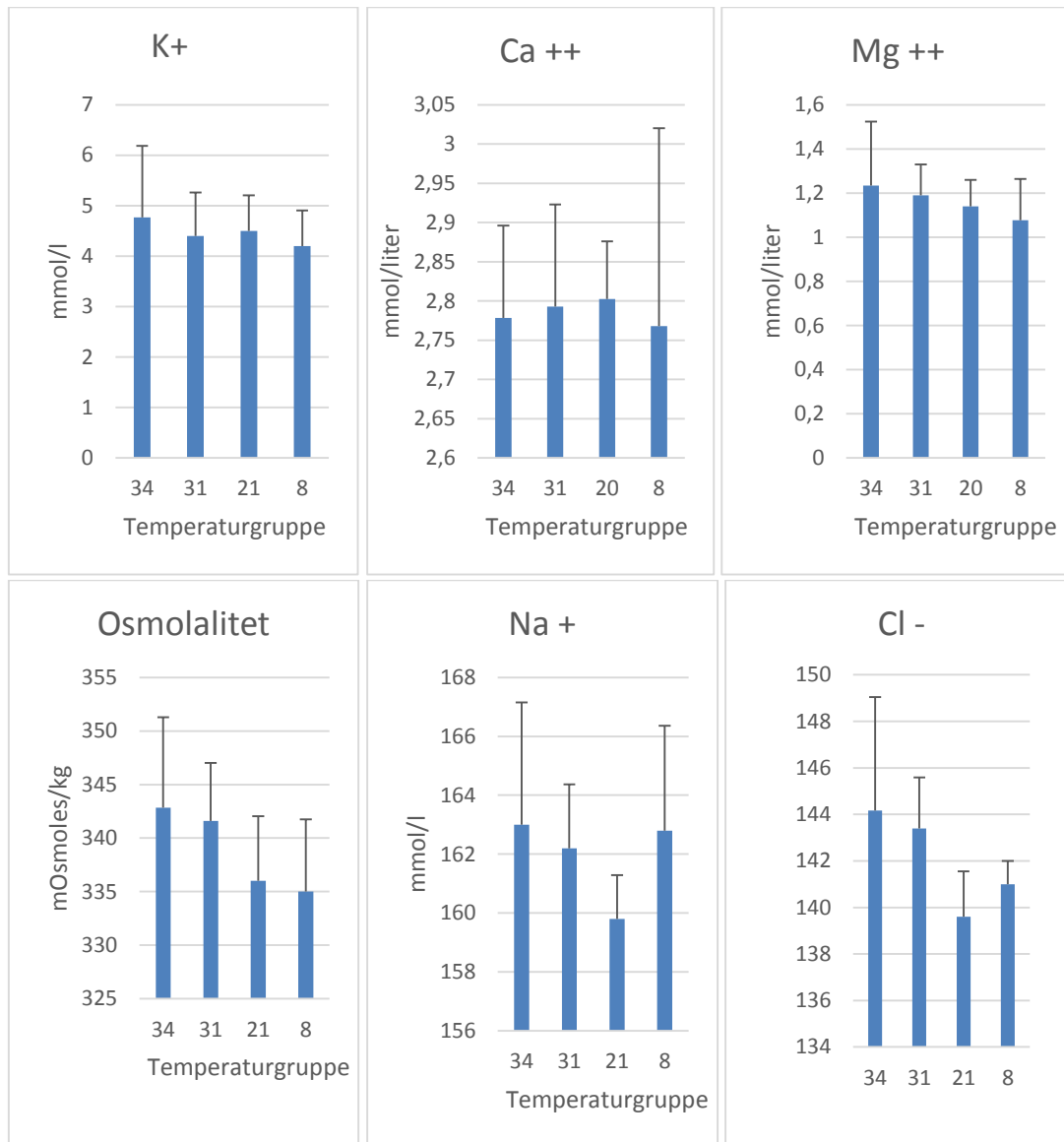
Elliott JM (1991). Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon. Freshwater Biology 25, 61-70.

Elliott A (1995). A comparison of thermal polygons for British freshwater teleosts. Freshwater Forum, Vol 5, No 3

Espmark ÅM, Humborstad OB & Midling KØ (2012). Pumping av torsk og laks, faktorer som påvirker velferd og kvalitet. Nofima-rapport 6/2012.

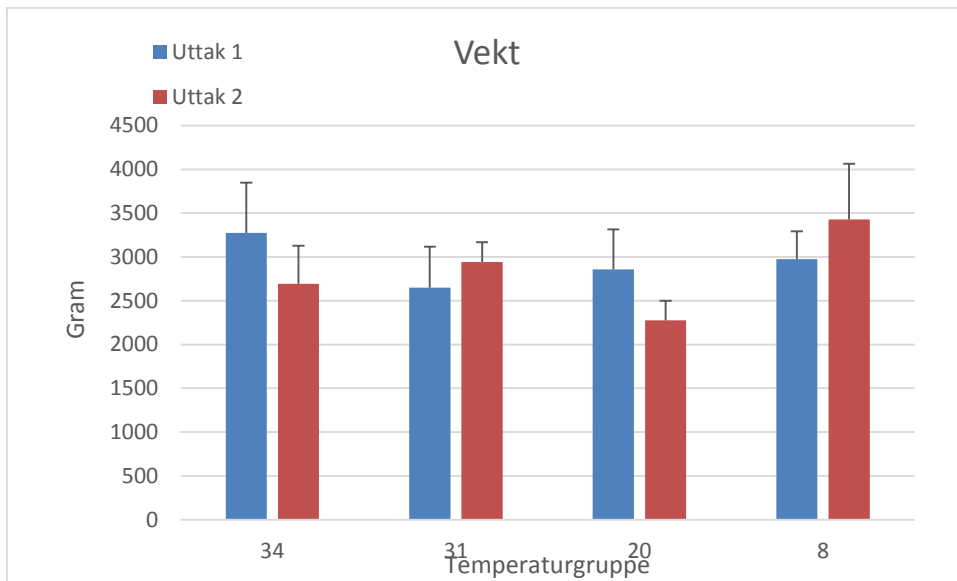
Solomon DJ & Lightfoot GW (2008). The thermal biology of brown trout and Atlantic salmon: a literature review. Science Report Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol, BS32 4UD ISBN: 978-1-84432-932-8 (48 pp)

## Appendix

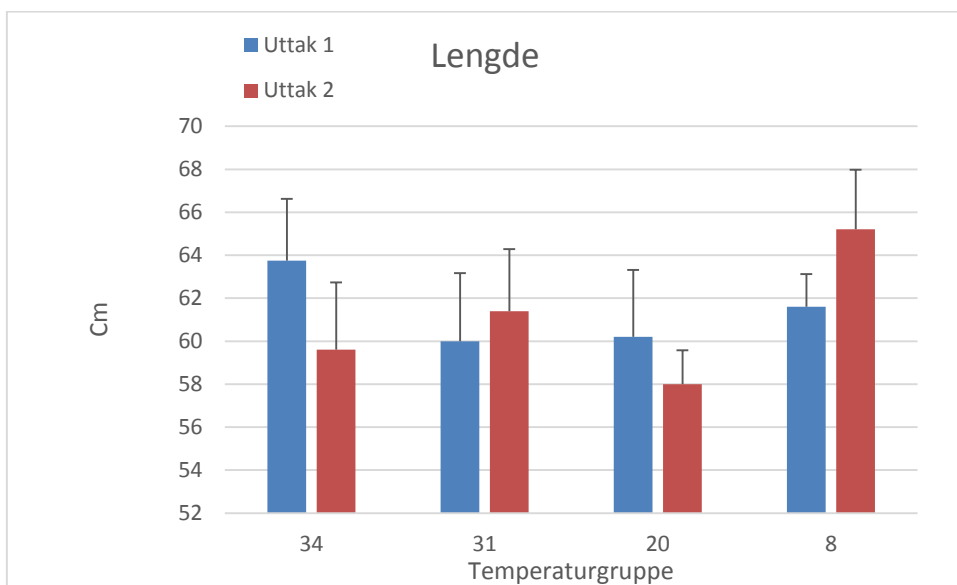


Figur 6. Plasmasverdier for de viktigste elektrolyttene. Verdier i mmol/l +/- S.D.

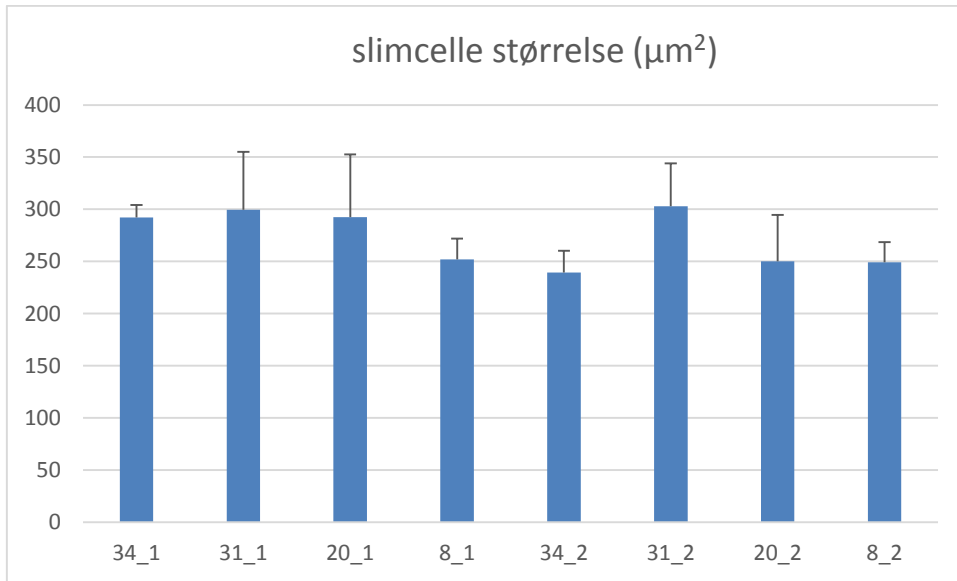




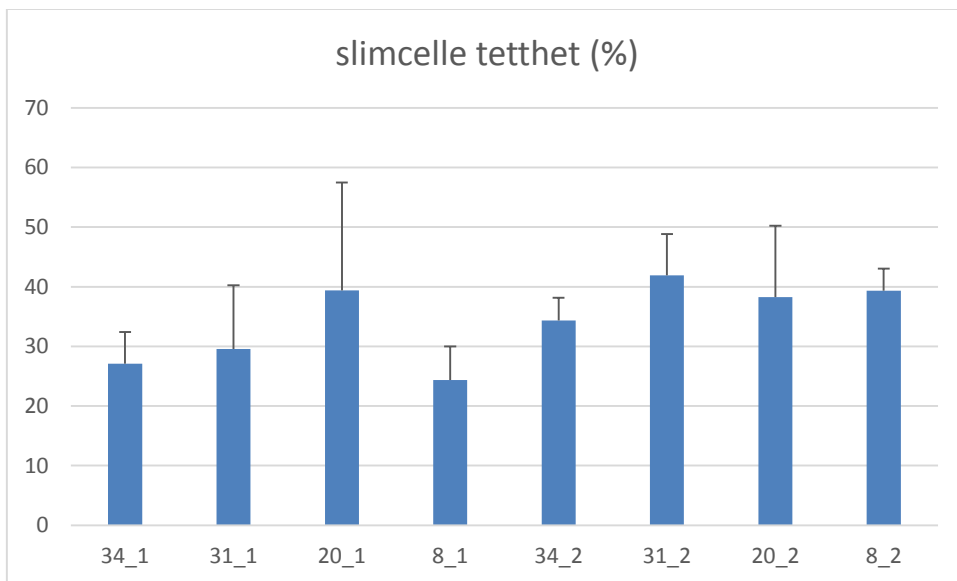
Figur 7. Vekt på forsøksfisk ved ulike uttak og grupper



Figur 8. Lengde på forsøksfisk



Figur 9. Slimcellestørrelse i  $\mu\text{m}^2 \pm S.D$



Figur 10. Tetthet av slimceller som % av overflate  $\pm S.D$ .

Tabell 1. Plasmaverdier i blodprøver fra fisk på dag 15 etter behandling.

Prøvenr = temperatur\_fisk#. Det ble tatt blodprøver kun etter 15 dager.

Prøvenr	Osmolalitet	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/L	Mg mg/L
34_1	341	160	5,5	143	107,9	27,2
34_2	337	160	5,5	142	106,2	29,1
34_3	355	170	3,3	152	111,4	24,2
34_4	351	166	6,6	148	112,6	41,7
34_5	333	160	2,9	139	110,4	24,8
34_6	340	162	4,8	141	119,7	30,2
31_1	344	163	5,1	147	105,3	30,6
31_2	334	160	3,3	142	114	24,5
31_3	345	163	4,3	142	113,1	27,8
31_4	347	165	3,9	144	118,8	33,6
31_5	338	160	5,4	142	108,5	28,1
21_1	343	160	5,1	141	113,6	27
21_2	340	162	5,1	142	115,8	28,1
21_3	337	159	4,8	139	113,7	28,4
21_4	328	158	3,6	137	109	23,5
21_5	332	160	3,9	139	109,5	31,6
8_1	325	158	3,9	140	96,5	22,2
8_2	332	168	3,7	140	104,5	21,3
8_3	336	163	3,6	141	118,3	25,9
8_4	341	162	5,3	142	115,1	30,2
8_5	341	163	4,5	142	120,3	31,3

Tabell 2. Slimcelletetthet og slimcellestørrelse på dag 1 og dag 15 etter behandling.  
Fisk no = temperatur\_dag.

Fisk no	Slimcellestørrelse ( $\mu\text{m}^2$ )	Slimcelletetthet (% forholdet)
34_1	287,72	28,92
34_1	293,98	32,71
34_1	279,53	20,02
34_1	307,57	26,63
34_1		
31_1	366,84	40,35
31_1	334,52	30,79
31_1	265,89	16,31
31_1	304,04	39,25
31_1	226,11	21,00
20_1	367,92	45,65
20_1	213,45	15,59
20_1	256,34	35,59
20_1	326,32	34,79
20_1	298,08	65,31
8_1	286,60	24,85
8_1	237,49	19,57
8_1	252,27	21,41
8_1	240,65	22,09
8_1	242,21	33,81
34-2	236,18	37,19
34-2	235,87	33,33
34-2	225,31	38,17
34-2	275,29	28,56
34-2	224,43	34,53
31_2	239,98	39,18
31_2	327,69	45,14
31_2	281,98	35,38
31_2	327,39	37,55
31_2	337,16	52,42
20_2	205,84	32,14
20_2	290,39	57,30
20_2	305,01	41,77
20_2	228,76	26,60
20_2	220,86	33,50
8_2	229,61	35,63
8_2	240,96	41,69
8_2	275,97	38,13
8_2	237,25	36,70
8_2	262,18	44,52

