

Forord

Denne oppgaven ble skrevet som et sluttprodukt av 2-årig master i fysiologi, Institutt for biologi, ved Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet (NTNU). Mastergraden ble påbegynt august 2009 og ble slutført oktober 2011.

Jeg vil takke min veileder Kjell J. Nilssen for i første omgang å ha tatt meg inn som masterstudent på sitt spennende prosjekt i Nepal, og rask handling for å få meg på sykehus når jeg ble syk under forsøksperioden i Khimtidalen, Kathmandu. For senere introduksjon til et arbeid med leppefisk i laksenæringen. Takk til Henriette Vaagland og Helena Bichão for sitt gode humør, interesse og hjelp. Takk til sangglade Raymond Haukvik for hyggelig samarbeid på prosjektet, og det sosiale miljøet på Sealab. Egil Torsnes (finmekanisk verksted, NTNU) for hjelp med produksjon av innretninger for forsøk. Per Wågø for bidrag til opptak og levering av leppefisk og krabbe. Jan-Erik Steen (*Octopus Marine*) for introduksjon til måleutstyr, og YSI Tyskland for teknisk hjelp. Ellers vil jeg takke alle faglige forbindelser som har vist interesse og kommet med synspunkter vedrørende min oppgave.

Til slutt vil jeg takke mine venner og foreldre for at jeg har klart å opprettholde motivasjon og arbeidslyst, spesielt gjennom vanskelige perioder.

Trondheim, 17. oktober 2011

John-Are Stokke Freland

Resymé

Dagens problem med lakselus på atlantisk laks (*Salmo salar*) er betydelig, og bakgrunn for store økonomiske tap. Fiskeridirektoratet anslår at 80 % av tap i matproduksjon av atlantisk laks er forårsaket av lakselus. Nasjonalpolitiske bestemmelser tydeliggjør satsningen på bekjempelse av lakselus i Norge. Biologisk avlusning med bruk av leppefisk er i sterk fokus for flere aktører i laskeoppdrettsnæringen, og det er et stort behov for økologisk og biologisk kunnskap om leppefisk.

Leppefiskfamilien (*Labridae*) er svært artsrik med mer enn 500 arter globalt, hvor få naturlige leppefiskarter er å finne i Norge. Tre av dem har vist sin nytteverdi som lusespisere. Bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*) er en av disse, og har størst forekomst langs norskekysten.

Tilgang på leppefisk for bruk i lakseoppdrett er i dag basert på villfangst og biltransport. Sykdom og dødelighet er imidlertid et stort problem relatert til de påvirkninger som fisken blir utsatt for ved disse prosessene.

Metabolisme og stressrespons hos bergnebb er tema for denne oppgaven, hvor det nærmere undersøkes betydningen av Aqui-S sedasjon for bergnebb i simulert transport. En næringsrettet tilnærming med spesielt fokus på transport av leppefisk er bakgrunn for målinger i småskala oppsett som tillater fri bevegelse hos bergnebb under forsøk.

Oksygenforbruk hos villfanget bergnebb viste stor spredning for individer i forhold til vekt og temperaturendring. Vinterakklimert fisk viste samlet redusert oksygenforbruk sammenlignet med sommerakklimerte. Stress ved plasma kortisol viste uendrede verdier for 10- og 30 minutter post lufteksponering som kontrollverdier og indikerer ukjente stresseffektorer for bergnebb i fangenskap. Stressrespons antydes redusert ved Aqui-S sedasjon ved 2,5-7,5 ppm, og gir ingen endring i løpet av 20 min. for oksygenforbruk ved introduksjon.



Innhold

FORORD	I
RESYMÉ	II
INNHold	III
1 INNLEDNING	1
1.1 Norsk lakseindustri	1
1.1.1 Nåværende utfordringer	1
1.1.2 Avlusningsmetoder	3
1.2 Leppefisk - Livsstrategier	3
1.2.1 Norske arter	3
1.3 Bruk av leppefisk i lakseoppdrett	6
1.4 Biologiske rytmer	7
1.5 Oksygenforbruk og metabolisme	8
1.5.1 Temperatur og metabolisme	9
1.6 Stressfysiologi	9
1.6.1 Transportstress	11
2 MATERIALE & METODER	13
2.1 Forsøksfisk	13
2.2 Forhold og tilsyn	13
2.3 Måling av oksygenforbruk	14
2.4 Forsøksoppsett og gjennomføring	16
2.4.1 Oksygenmålinger	16
2.5 Stressrespons	17
2.6 Sedasjon av bergnebb med Aquai-S	18
2.6.1 Bakgrunn	18
2.6.2 Forstudie	18

2.6.3	Simulert transport i Aqvi-S løsning	18
2.6.4	Bergnebbes oksygenforbruk i sedativ Aqvi-S løsning	19
2.7	Analyser av blodplasma	19
2.7.1	Kortisol	19
2.7.2	Klorid	20
2.8	Databehandling og analyser	21
2.8.1	Oksygenforbruk	21
2.8.2	Kortisol	21
2.8.3	Grafisk og statistisk behandling	21
3	RESULTATER	23
3.1	Oksygenforbruk hos bergnebb	23
3.1.1	Betydning av kroppsvekt	23
3.1.2	Oksygenforbruk for vektgrupper	24
3.1.3	Oksygenforbruk for temperatureksponerte vektgrupper	25
3.2	Stressrespons hos bergnebb etter lufteeksponering i h�v	26
3.3	Betydning av Aqvi-S sedasjon for stressnivå hos bergnebb...	27
3.3.1	1 time Aqvi-s eksponering ved målt kortisol og klorid	27
3.3.2	24 timer i ulike Aqvi-S doseringer, Kortisol og Kortisol	28
3.3.3	Oksygenforbruk pre-/post Aqvi-S tilsetting	29
4	DISKUSJON	31
4.1	Metabolisme og måleoppsett	31
4.1.1	Oksygenforbruk og kroppsstørrelse	32
4.1.2	Effekt av temperatur for oksygenforbruk	33
4.1.3	årstidsbetydning for oksygenforbruk	34
4.2	Stressrespons hos bergnebb etter lufteeksponering i h�v	35
4.2.1	Kortisol	36
4.2.2	Klorid	38
4.3	Betydning av Aqvi-S sedasjon på stressnivå hos bergnebb...	38
4.3.1	Kortisol	38
4.3.2	Klorid	39

4.3.3	Adferdsobservasjoner _____	40
4.3.4	Oksygen forbruk _____	40
4.4	Håndtering, stress og årstid _____	41
5	KONKLUSJONER _____	43
6	FREMTIDSPERSPEKTIVER _____	45
7	REFERANSER _____	47

1 Innledning

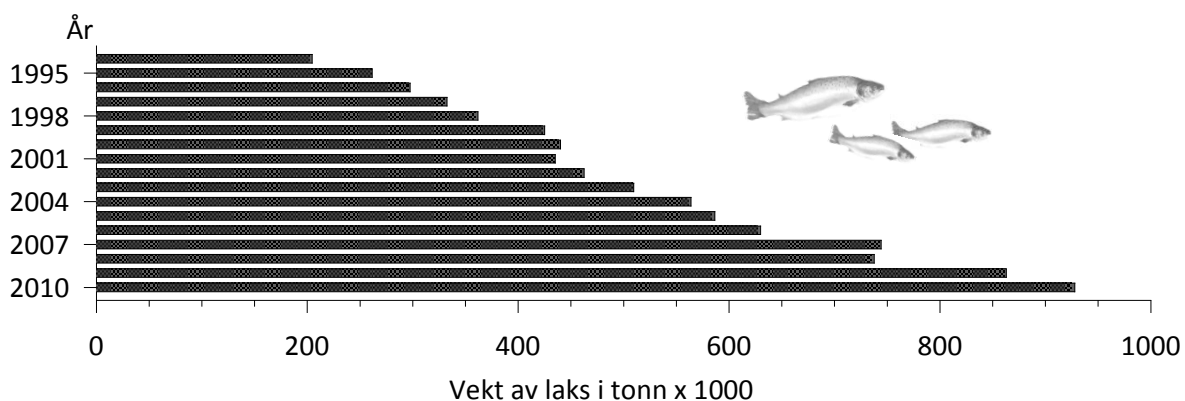
1.1 Norsk lakseindustri

Fiske og akvakultur har stor betydning for norsk næringsliv, og er å betrakte som en av bærebjelkene innen norsk økonomi (Statistisk Sentralbyrå, 2011). Produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*) utgjorde i 2010, 928 000 tonn (fig. 1.1). Eksportverdi utgjorde 23 milliarder NOK (Fiskeridirektoratet, 2011). For fastlands-Norge tilsvarte dette 1,1 prosent av BNP i 2010 (Statistisk Sentralbyrå, 2011).

Regjeringserklæringen, *Soria Moria II* belyser den fremtidige næringssatsingen:

«Det skal legges til rette for videre vekst i havbruksnæringen innenfor bærekraftige rammer. Strategien for bærekraftig havbruk skal legges til grunn. Arbeidet med å redusere lakselus og rømming vil bli høyt prioritert.»

(Regjeringen, 2009)



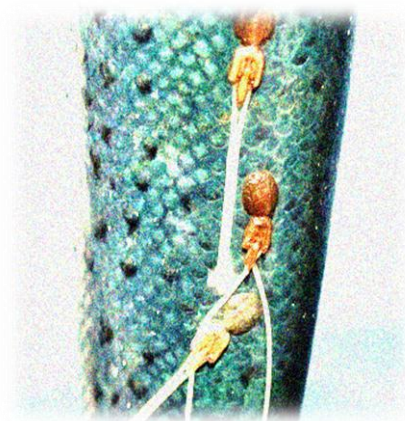
Figur 1.1: Laks produsert som matfisk i Norge. Rundvekt etter bløtting (rådata bearbeidet fra statistikkbank; Fiskeridirektoratet, 2011).

1.1.1 Nåværende utfordringer

Det er stor usikkerhet rundt omfanget av økonomisk bærekraft og videre vekst innen lakseoppdrettsnæringen (WWF, 2009). Havforskningsinstituttet nevner utfordringer mht. fiskehelse og velferd. Sykdommer forårsaket av bakterier, virus og parasitter gjør stor skade,

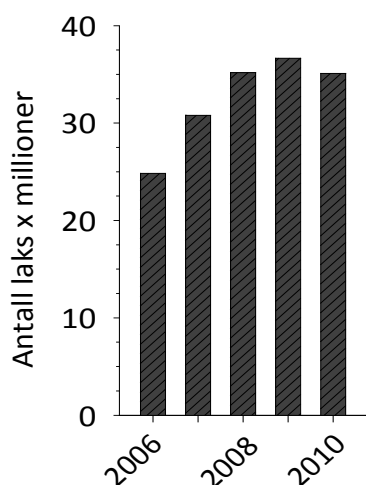
og er derfor viktig å bekjempe (Heuch *et al.*, 2005; Boxaspen, 2006; Berg-Hansen, 2011; Havforskningsinstituttet, 2011a).

Familien hoppekreps (*Copepoda*) er årsak til mange sykdomsutbrudd og problemer innen marin akvakultur verden over (Færøyene, Chile, Skottland, Irland, Nord-Amerika og Norge; Boxaspen, 2006). Innen norsk oppdrett er skade på laks forårsaket av *Lepeoheirus salmonis* ("lakselus"; "salmon louse"; fig. 1.2; Pike og Wadsworth, 2000; Johnsen, 2010; Oppedal *et al.*, 2011).



Figur 1.2: Lakselus på laks

Rapporter fra Lusedata viser et høyt antall lus i norske oppdrettsmerder både i 2009 og 2010. Det ser ut å fortsette i 2011 (Lusedata.no, 2011). Forekomsten av lakselus i Norge er avhengig av årstid. De laveste registreringene av bevegelige lus (per laks) har de siste tre årene vært i mai måned. I oktober/november har disse verdiene økt fra ca. 0,25 til 2.



Figur 1.3: Tap av laks
(Fiskeridirektoratet, 2011)

(Lusedata.no, 2011). En vurdering fra Fiskeridirektoratet tilsier at 80 % av svinn involvert i matproduksjonen av laks kommer fra infeksjoner forårsaket av lakselus (totalverdi, fig. 1.3; Fiskeridirektoratet, 2011). Det har altså stor økonomisk betydning å finne frem til en begrensning av luseforekomst i oppdrettsmerder.

Stor lakselusbestand i oppdrett kan også utgjøre et problem for villbestanden av laks. I og med at lakselusen i tidlige utviklingsstadier beveges med vannets naturlige strømninger til den finner en vert, kan lus fra norske oppdrettsmerder overføres til frittlevende vill laks (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a).

1.1.2 Avlusningsmetoder

Alternativ for avlusning kan kategoriseres i tre grupper; fôrtilsatte medikamenter, kjemiske bad og bruk av leppefisk (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a; WWF, 2011). Resultater fra medikamentell behandling (eks. *Emamektin benzoat*, SLICE[®]) har ulik suksess pga. resistens utvikling hos lakselus (Fiskeridirektoratet, 2011). Kjemiske bademidler brukt er eksempelvis salmosan (*azametifos*), alpha-/beta max og hydrogenperoksid (H₂O₂; som brukes i brønnbåt). Alle med varierende suksess. Det tredje alternativ er biologisk avlusning med leppefisk.

1.2 Leppefisk - Livsstrategier

Leppefiskfamilien (*Labridae*) er representert med mer enn 500 arter (inkludert *Scaridae* og *Odacidae*) i 82 slekter (Paolo og Randal, 2000). Noen leppefiskarter er rensefisk ("cleaner fish"), og fjerner bl.a. ektoparasitter fra andre generelt større fisk (Grutter, 1999). Dette gir fordel for både rensefisk (som utnytter verten som et matfat), og vert (blir kvitt parasitter), men det trenger ikke alltid være mutualistisk gevinst. (Grutter, 1999). Innen leppefiskfamilien er det store forskjeller med hensyn til kroppsfarge og kjønnsutvikling (fig. 1.4). I enkelte arters livssyklus forekommer det også kjønnskifte (Warner og Robertson, 1978). Mest vanlig er det at leppefisk holder til i tropiske strøk, på grunt vann langs kysten (Warner og Robertson, 1978). Alle arter er karnivore, med et mulig unntak i *Pseudodax moluccanus* (Green, 1996).



Figur 1.4: To leppefisk (*Labroides dimidatus*) spisende av større fisk.

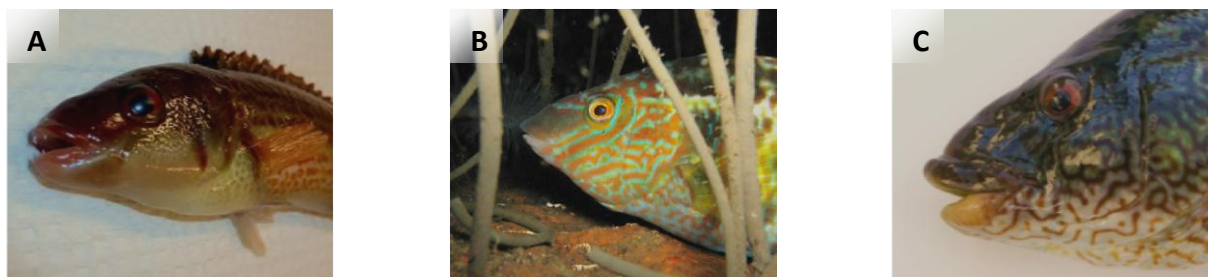
fisk"), og fjerner bl.a. ektoparasitter fra andre generelt større fisk (Grutter, 1999). Dette gir fordel for både rensefisk (som utnytter verten som et matfat), og vert (blir kvitt parasitter), men det trenger ikke alltid være mutualistisk gevinst. (Grutter, 1999). Innen leppefiskfamilien er det store forskjeller med hensyn til kroppsfarge og kjønnsutvikling (fig. 1.4). I enkelte arters livssyklus forekommer det også kjønnskifte (Warner og Robertson, 1978). Mest vanlig er det at leppefisk holder til i

tropiske strøk, på grunt vann langs kysten (Warner og Robertson, 1978). Alle arter er karnivore, med et mulig unntak i *Pseudodax moluccanus* (Green, 1996).

1.2.1 Norske arter

Langs norskekysten er kun seks av artene vanlige; bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*), grønngylt (*Crenilabrus melops*), berggylt (*Labrus bergylta*), brungylt (*Acantholabrus palloni*), gressgylt (*Centrolabrus exoletus*) og rødnebb (*Labrus bimaculatus*; kalt blåstål etter kjønnskifte til hann; Sayer *et al.*, 1996; Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Bergnebb er tallrik, mens det er mindre forekomst av grønngylt og berggylt. Rødnebb og gressgylt er mindre tallrike enn de andre artene (Havforskningsinstituttet, 2011b). Det er generelt vanlig at

artene er revirdannende og territorielle og legger demersale egg (Sayer, 1999), mens bergnebb skiller seg ut ved å produsere pelagiske egg (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Dietten er imidlertid lik, og består i all hovedsak av smådyr som blir plukket fra bunn (Sayer *et al.*, 1996; Havforskningsinstituttet, 2011b). Gyting skjer i løpet av vår og sommer, men foreløpig er lite spesifikk kunnskap tilgjengelig (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Bergnebb, grønnngylt og berggylt (fig. 1.5) er/har vært benyttet som lusespiser i lakseoppdrett (Bjordan, 1991; Sayer *et al.*, 1996; Heiberg Espeland *et al.*, 2010a; Havforskningsinstituttet, 2011b).



Figur 1.5: Leppefisk benyttet som lusespiser i oppdrettsmerder med laks. A; bergnebb, B; grønnngylt og C; berggylt.

Berggylt

Kroppsfarge hos berggylt varierer, med lys underside og ellers kraftig marmorering i brunt, gult eller rødgult (Havforskningsinstituttet, 2011b). I løpet av livssyklusen kan arten skifte kjønn. Samtlige individer blir født som hunner og kjønnsmodning skjer innen 5 – 6 år.

Nydanning av ovarier starter sent på høst og egg gytes mellom april og juni (Muncaster *et al.*, 2010). Enkelte berggylt gjennomgår også kjønsskifte etter denne perioden. Etter 10 – 14 år gjennomgår resterende, kjønnsmodne hunner et skifte i kjønn (Havforskningsinstituttet, 2011b). Berggylt er den største, nordlige leppefiskarten, og blir opp til 60 cm lang (Havforskningsinstituttet, 2011b). Vanlig habitat er fra fjæresone til få titalls meter dyp, med steinbunn og tareskog (Sayer *et al.*, 1996).

Grønnngylt

Ytre farge kan variere for årstid, kjønn og modningsgrad (Sayer *et al.*, 1996). Av utseende er grønn- og gressgylt to nokså like arter. Fisk blir mellom 23 og 30 cm lange, og kjønnsmodne etter 2 – 3 år. (Sayer *et al.*, 1996; Havforskningsinstituttet, 2011b). Utbredelsen for grønnngylt

overlapper bergnebbens, men grønngylten er ikke vanlig nord for Trondheimsfjorden.

Enkelte plasser langs norskekysten er den også mer tallrik enn bergnebb. Grønngylt lever fra fjæresonen ned til ca. 30 meters dybde og er vanlig ved steinbunn og høyvokste alger (Sayer *et al.*, 1996; Havforskningsinstituttet, 2011b).

Bergnebb

Fargen er generelt orange til rød med en svart flekk på kaudalfinnen over laterallinjen som spesielt artstrekk (Sayer *et al.*, 1996). Ingen kjønnsdimorfisme forekommer. Kroppslengde, 10 – 20 cm for reproduksjonsdyktige fisk, noe som gjør den til den minste leppefiskarten i norske farvann (Sayer *et al.*, 1996; Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Modning kan skje etter 3 år, mens total levealder for begge kjønn kan strekke seg til 14 – 20 år (Sayer *et al.*, 1996, Havforskningsinstituttet, 2011b). Av de pelagiske eggene som blir sluppet (sommeren) synker omtrent 90 % til bunns og voktes innen et etablert territorium av begge kjønn (Hilldén, 1981). Gjennom vintersesongen har bergnebb lav aktivitet, hvor den ofte er å finne i bergsprekker og mellom steiner (Havforskningsinstituttet, 2011a).



Figur 1.6: Forekomst av bergnebb på verdensbasis (skravert område; UICN, 2010). Lite tallrik nord for Trondheimsfjorden (Havforskningsinstituttet, 2011b).

Bergnebb er å finne i europa (fig. 1.6), hvor foretrukket habitat er generelt sett vegetasjonsbunn (Gjøsæter, 2002) og steinbunn langs kysten opp til Nordland (Thangstad, 1999). Steiner og tareskog blir aktivt brukt som skjul, og er svært viktig for bergnebb (Sayer *et al.*, 1996; Thangstad, 1999; UICN, 2010). Det ser ut til at bergnebb har et fast tilfluktssted gjennom hele året. Forekomst er registrert ned til 50 meter dyp, mens foretrukket dybde synes å være avhengig av alder, sesong og miljøforhold (Sayer *et al.*, 1996).

1.3 Bruk av leppefisk i lakseoppdrett

Enkelte arter leppefisk har vist stor nytteverdi som lusespiser på atlantisk laks etter introduksjon til sjømerder i 1988 (Bjordal, 1991; Sayer *et al.*, 1996; Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Tilgang på leppefisk er i dag basert på fangst av frittlevende individer med bruk av spesialkonstruerte teiner og ruser. Deretter mellomlagres fisken lokalt for senere transport med tankbil til oppdrettsanlegg (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a; Johnsen, 2010; det er derfor viktig å gjennomføre fangsting, transport og overføring til anlegg så skånsomt som mulig, slik at dødeligheten av leppefisk forblir lav). Stor dødelighet er påvist 2-3 uker etter slik transport (Laidler *et al.*, 1999). J. Solgaard (pers. med.) miljøkoordinator i Salmar % estimerte for årets sesong et behov for 10-15 millioner små leppefisk til bruk på smolt, og 3-6 millioner store leppefisk til bruk på stor laks. Disse tallene er basert på et blandingsforhold leppefisk:laks på 1-3:50.

Forholdene i merdene må være riktige, slik at leppefisken opprettholder appetitt for lakselus. Kilder innad i laksenæringen oppgir følgende forhold som svært viktige:

- Riktig forhold mellom leppefisk og laks (1:50-100)
- Nett med riktig maskestørrelse (12 mm²)
- Tilstrekkelig med skjul; utforming som imiterer de enkelte arters naturlige habitat
- Daglig tilsyn med fjerning av dødfisk og rengjøring av nøter

(Sayer *et al.*, 1996; Laidler *et al.*, 1999; Pike og Wadsworth, 2000; Johnsen, 2010; Myhre, 2010).

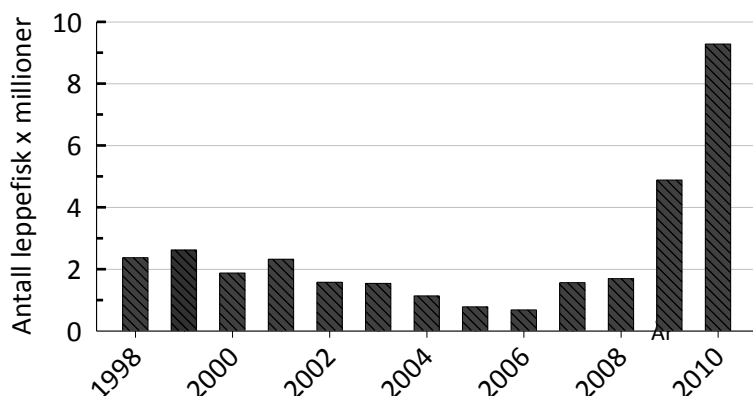
Avlusning av laks med bruk av leppefisk økte fram til 1997 (Bjordal, 1991). Fra den tid ble det hovedsakelig brukt kjemisk fremstilte avlusningsmidler. Det var vanlig å benytte *Emamektin benzoat* (SLICE®) tilsatt laksefôret. Etter 2006 økte leppefiskbruken igjen pga. lakselus' utvikling av resistens mot slike kjemiske avlusningsmidler (fig. 1.7; Fiskeridirektoratet, 2011).

I en rapport fra sentrale aktører innen leppefiskforskning uttales følgende:

«Vi har mangelfull kunnskap om biologien til de ulike arter av leppefisk og om hvordan ulike bestander av leppefisk blir påvirket av det omfattende fisket vi har etter leppefisk i dag.»

(Heiberg Espeland *et al.*, 2010b)

Oppdrett av leppefisk er blitt påbegynt av flere aktører. Det kommer som konsekvens av (for) stor beskatning av lokal leppefisk, samt lite tilgang på leppefisk (spesielt berggyllt) med riktig størrelse (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a).



Figur 1.7: Antall leppefisk i norske oppdrettsmerder i perioden 1998 – 2010 (ingen forekomst i Finnmark og Troms). (Utarbeidet av data; Fiskeridirektoratet 2011).

1.4 Biologiske rytmer

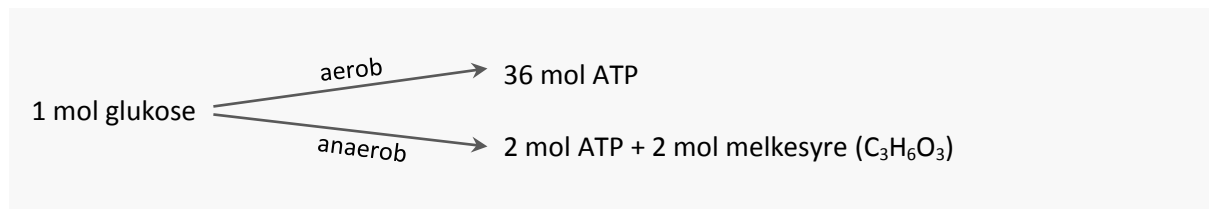
Gjennom året endrer livsmiljøet seg sesongvis. De fleste organismer i tempererte strøk kan sannsynligvis forutse slike endringer ved hjelp av døgnetts veksling mellom lys- og mørke (Falcon *et al.*, 2010). Andre mulige sesongindikatorer for fisk er endret; mattilgang, salinitet og temperatur (Costa og Sinervo, 2004; Falcon *et al.*, 2010).

Fiskens fysiologiske miljøtilpasning kan skje forut for sesongskifte ved at døgnetts mørkeperiode blir detektert og omgjort til et endokrint signal (*melatonin*), som frigjøres fra pinealkjertelen (Falcon *et al.*, 2010). Melatonin kan påvirke fiskens vekst, reproduksjon og sykdomsforsvar. En slik dynamisk homeostase, som tilpasser det indre kroppsmiljø til de ytre livsmiljø, synes å være avgjørende for artens overlevelse lokalt (Costa og Sinervo, 2004; Falcon *et al.*, 2010).

Leppefisk er rapportert å senke sitt aktivitetsnivå fra sommer til vinter (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Sayer og Davenport (1996) hevder at bergnebb trer inn i en dvaletilstand (*torpor*, *hypometabolisme*) etter eksponering for lav temperatur vinterstid (dvaletilstanden initieres ikke ved samme temperatursenkning sommerstid; Sayer og Davenport, 1996). Under dvalen er gjellebevegelse, hjerterate og aktivitet sterkt redusert (Sayer og Davenport, 1996; Heiberg Espeland *et al.*, 2010a).

1.5 Oksygenforbruk og metabolisme

Opprettholdelse av indre funksjoner og muskulært arbeid forutsetter krav til utvinning av energi fra næring. Størst utbytte får dyret fra aerob metabolisme (Schmidt-Nielsen, 1997; Hill *et al.*, 2008);



Energi fra aerob metabolisme blir brukt hovedsakelig til tre kroppslige funksjoner (fig. 1.8; Clarke og Fraser, 2004).



Figur 1.8: Deler av aerob metabolisme (forenklet etter Hill *et al.*, 2008).

Aerobt energiforbruk forutsetter inntak av oksygen fra vann over gjellene hos fisk (Taylor *et al.*, 2010). Reguleringen skjer fra fiskens respirasjonssenter lokalisert i hjernestammen, i samarbeid med andre rytmiske sentre (*respiratory rhythm generator*; RRG). Disse sentra mottar informasjon fra en rekke sensorer via nervesystemet (Perry og Gilmour, 2002; Taylor *et al.*, 2010). Hovedsakelig reguleres RRG frekvens på bakgrunn av kjemoreseptorer som er følsomme for partialtrykket til oksygen (P_{O₂}; Perry og Gilmour, 2002). Det er imidlertid også vist at tilsvarende CO₂ reseptorer kan ha betydning for fiskens respirasjonsregulering (Taylor *et al.*, 2010).

Oksygenforbruk hos fisk kan inndeles i standard- (SMR), rutine- (RMR) og aktiv metabolsk rate (AMR; Fry, 1971 i Schurmann og Steffensen, 1997). SMR er minimal hvilemetabolisme og må måles upåvirket av håndtering og akklimeringsprosesser (Schurmann og Steffensen, 1997). RMR omfatter i tillegg metabolske prosesser som *specific dynamic action* (SDA), vekst

og kjønnsutvikling. AMR er et mål for maksimal aktivitet og kan kun opprettholdes over begrenset tid (Fry, 1971 i Schurmann og Steffensen, 1997).

1.5.1 Temperatur og metabolisme

Ektoterme organismer har en fysiologi som er avhengig av miljøet rundt. Effekten er koblet til enzyatiske reaksjonshastigheter kontrollert av temperatur (Maricondi-Massari *et al.*, 1998). En temperaturøkning på 10 °C gir normalt to- til tredobling av oksygenopptaksrate (og uttrykkes termodynamisk ved Q_{10} ; formel 1.1; Schmidt-Nielsen, 1997; Maricondi-Massari *et al.*, 1998);

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

Formel 1.1: Q_{10} gitt for to reaksjonsrater $R_{1 \text{ og } 2}$ ved forskjellig temperatur $T_{1 \text{ og } 2}$ (Kelvin).

Oksygenforbruk hos fisk knyttes opp mot akklimering til endringer i omgivelsestemperatur. Rask endring i temperatur gir et termisk stress som øker metabolismen (Maricondi-Massari *et al.*, 1998). Kompenserende fysiologiske mekanismer motvirker effekten av en akutt temperaturendring (Schmidt-Nielsen, 1997). Det skjer en gradvis akklimering til ny temperatur med oksygenforbruks rate bestemt av fiskens evne til å kompensere. Ingen kompensasjon øker oksygenforbruk i akklimert fase, mens komplett kompensasjon for endring i temperatur gir uendret oksygenforbruksrate (Schmidt-Nielsen, 1997).

1.6 Stressfysiologi

En enkel definisjon på stress er en tilstand som truer kroppens *homeostase*, hvor en rekke komplekse, adaptive responser settes i gang for å gjenopprette dens likevekt (Chrousos, 1998; Barton, 2002).

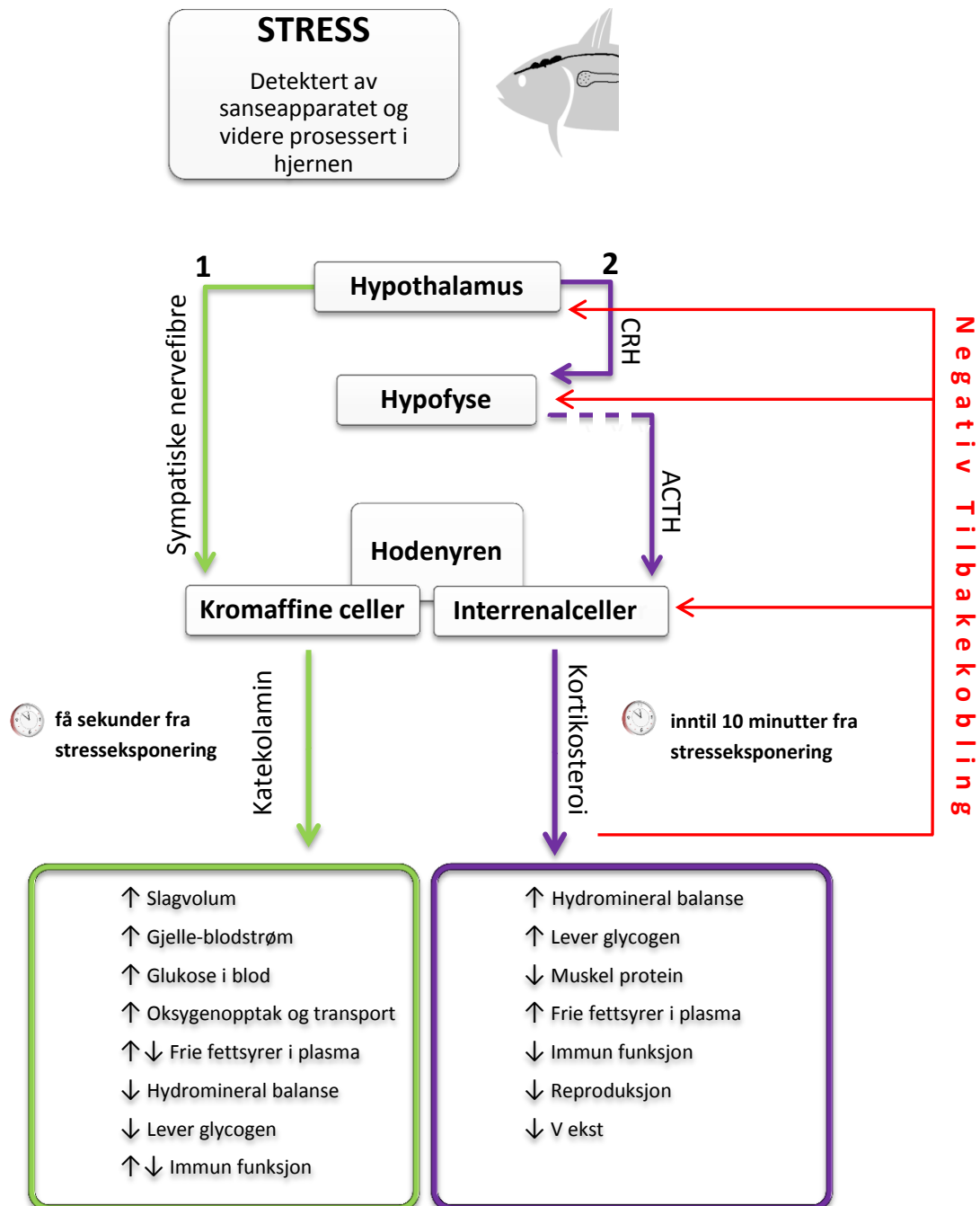
Fysiologisk sett styres stressrespons hos vertebrater av to akser (fig. 1.9);

1 Nevroendokrin akse: Et rask stimuli fra hypothalamus via sympatiske nervefibre. Til frigivelse av adrenalin og noradrenalin fra kromaffine celler (Pankhurst, 2011).

Katekolaminene stimulerer leverceller til rask frigivelse av glukose. Andre fysiologiske

katekolamin-effekter er økt hjerteslagkraft, vasodilatasjon av blodårer i gjellene og forandring i gjellenes ionepermeabilitet (Døving og Reimers, 1992; Bone og Moore, 2008; Galhardo, 2010; Pankhurst, 2011).

2 Endokrin akse: En mer langsom stressrespons skjer fra hypothalamus, via hypofyse til interrenalceller som skiller ut kortikosteroider (hovedsakelig cortisol; HPI-aksen; Bonga, 1997; Pankhurst, 2011).



Figur 1.9: Forenklet oversikt av den hormonelle stressrespons hos teleoste fisk. (Utarbeidet fra Pankhurst, 2011; Døving og Reimers, 1992; Bonga, 1997; Galhardo, 2010; Costa og Sinervo, 2004. Overdimensjonert illustrasjon av fiskehjerne og hodenyre fra Døving og Reimers, 1992).

1.6.1 Transportstress

Transport har i flere tilfeller medført dødelighet hos bergnebb. Alternativt kan transportstress medføre infeksjon fra bakterier og virus som forekommer naturlig i oppdrettsmerdene (Laidler *et al.*, 1999; Heiberg Espeland *et al.*, 2010a). Dette kan i sin tur medføre smitte-overføring til annen leppefisk og laks. Latenstiden for bakterie- og virusinfeksjoner kan vare 2 – 4 uker (Laidler *et al.*, 1999). På den måten kan transportstress gi sykdomsutslag i laksemerdene, som er vanskelig å årsaksfeste pga. tidsforsinkelse (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a).

1.7 Oppsummering og målsetninger

Lakseoppdrett er en økonomisk viktig næring med store utfordringer pga. lakselus. Dagens utfordringer med skade fra lakselus forsøkes løst biologisk med bruk av leppefisk. Oppdrettsnæringens enorme avlusningsbehov har medført at millioner av frittlevende leppefisk fanges og transporteres (over store avstander) til oppdrettsanlegg med laks. Dette medfører gjentatt stresseksponeringer som forringer leppefiskens velferd, helse og overlevelse. Det er et sterkt ønske fra oppdrettsnæringen om å innhente biologisk kunnskap om leppefisk slik at dens livsbetingelser under transport og i fangenskap kan tilrettelegges best mulig.

Denne masteroppgaven ble derfor utformet for å undersøke;

- Oksygenforbruk hos leppefisken bergnebb.
- Stressrespons hos leppefisken bergnebb.
- Betydning av Aqui-S sedasjon for plasma kortisol og klorid hos leppefisken bergnebb under simulert transport.
- Betydning av tilsatt Aqui-S for sedasjon og oksygenforbruk hos leppefisken bergnebb under simulert transport.

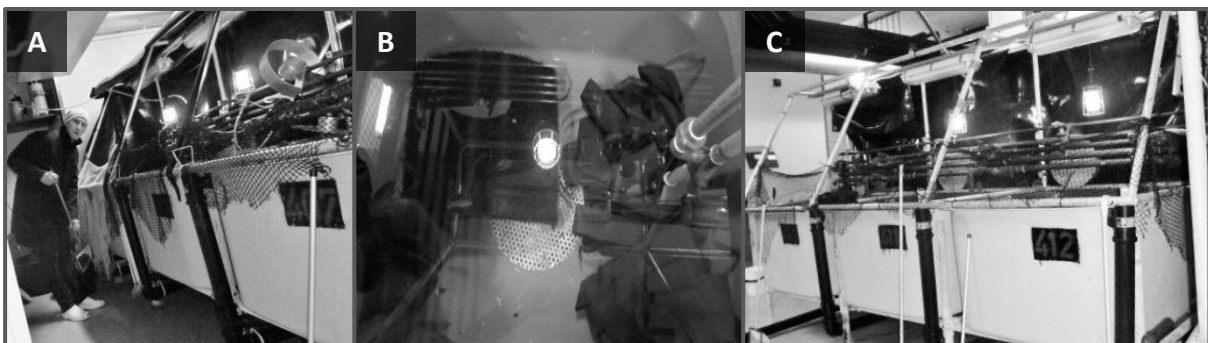
2 Materiale & Metoder

2.1 Forsøksfisk

Leppefisk til forsøk ble holdt ved Sealab forskningscenter, Trondheim, i tre perioder; november 2010 – mars 2011, juni 2011 og juli – september 2011. Bergnebb ble hentet fra to lokaliteter. Innhenting av fisk ble utført ved to lokaliteter: Den ene var langs kysten av Svellingen, Frøya (Sør-Trøndelag) sommer 2010 og juli 2011. Ved første periode sto leppefisker i not til avhenting tidlig vinter (november), mens i andre periode skjedde avhenting rett etter fangsting. Fisker ble transport omtrent 3 timer med bil i hardplasttank (650 L) med oksygenering. Det andre fangststedet var langs kysten av Strömstad (sør-vest Sverige) i juni 2010. Denne bergnebben ble fisket opp og tankbil-transportert til Sealab (Kristensens Transport AS) i regi av Marine Harvest AS.

2.2 Forhold og tilsyn

Bergnebb ble fordelt i fabrikk 600 L grønne fabrikkproduserte oppdrettskar. Kontinuerlig ble sjøvann tilført fra Trondheimsfjorden (800 meter ut og 70 meter dypt) og etterbehandlet med sand- og UV-filter. Temperatur og løst oksygen var i første oppholdsperiode (november til mars) registrert til $8,6 (\pm 2,5) ^\circ\text{C}$ og $8,9 (\pm 0,2) \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Tilsvarende i andre (juni) og tredje periode (juli - september) var variasjonene $10,3 (\pm 0,4) ^\circ\text{C}$ og $8,7 (\pm 0,5) \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Hvert av karene ble innredet med tare-imiterte strimler av svarte plastsekker og astrotorfmatter med synkesteiner (fig. 2.1). Fisk ble holdt under simulert naturlig (Trondheim) fotoperiode. Fisker ble fôret med kværnet krabbe og snegler i blanding med fôrpellets (1/3).



Figur 2.1: Leppefiskens karforhold. Ytre forhold (A og C) og ned i kar (B).

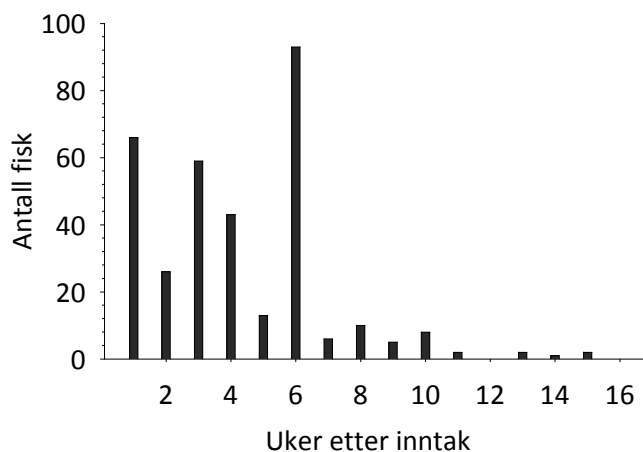
Daglig tilsyn med fisk bestod av:

- Håving av dødfisk og matrester
- Nedtapping (7 cm av vannstand) for fjerning av bunnavfall
- Desinfisering av håver
- Sjekk av vannsirkulasjon
- Fôring
- Loggføring av arbeid og fiskens tilstand

Ukentlige rutiner:

- Bytting av skjul (matter og svartsekker)
- Manuell sjekk av temperatur og oksygenmetning

Dødelighet etter innhenting ble registrert for alle perioder. For andre og tredje periode ble det kun registrert et par døde fisk. I første periode (“vinterfisk”) ble imidlertid betydelig dødelighet registrert (fig. 2.2).



Figur 2.2: Ukentlig dødelighet av bergnebb etter inntak 23.11.2010. Dødelighet i uke 6 skyldes feil i vanntilførsel (87 fisk døde over natt i ett av karene).

2.3 Måling av oksygenforbruk

Oppsettet besto av en polyetylen sekk (10 og 35 L) fylt helt med vann. Posen ble påmontert innretninger for ledningsgjennomføring og vannuttak (fig. 2.3). For å lukke posen ble topp vridd rundt, avbøyd, festet og holdt sammen med slangeklemring (15 og 30 mm). Som ramme til posen ble det brukt en rund plastdunk (355 x 535 mm) med utskåret observasjonsvindu. To gjennomsiktige plexiglassplater ble satt opp som støtte i

observasjonsvinduet. Innvendig var plastdunken trukket i svart plast. Et mørkt flispledd ble brukt som ytre bekledning (ikke i toppen) helt rundt for å redusere forstyrrelser.

For vannuttak ble det påmontert en 20 cm slange med *lüer-lock* system (treveis) og sprøyter. Løst oksygen i det lukkede systemet ble logget med optisk sensor; *YSI ProODO* instrument. Instrumentets deteksjonsgrense; $0,1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (måleområde $0\text{--}50 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) løst oksygen. Temperatur ble målt med samme instrument (deteksjonsgrense $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). *YSI ProODO* var tilkoblet datamaskin (*Fujitsu Siemens Computers, AMILO Pro V2030*) for sanntids logging av parametere via *USB 2.0*, med programvare; *YSI Pro Series Data manager [1.1.3]*. Probe/sensor var plassert tilnærmet midt i dunken under samtlige forsøk.

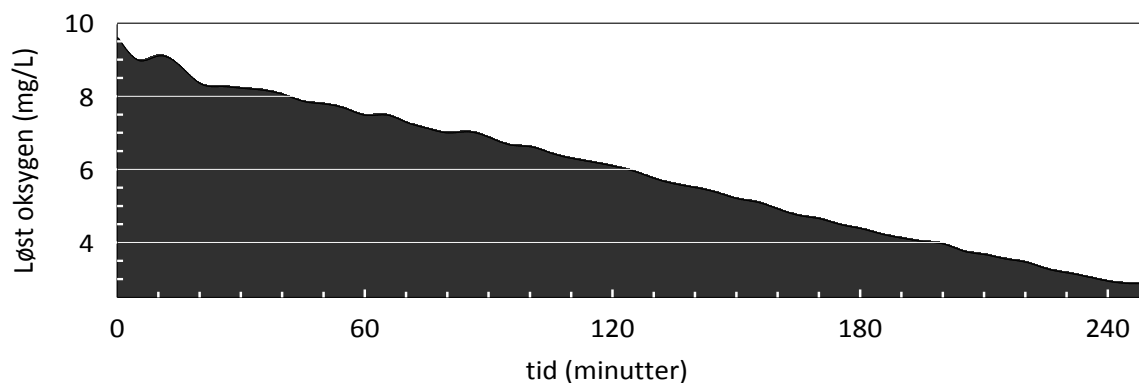


Figur 2.3: Oppsett for oksygenmålinger i forsøksenhet.

A; *ProODO* oksygenmåler, B; tett pose-gjennomføring av sensorledning, C; innretning for vannprøvetak, D; *lüer-lock* med sprøyter.

Utprøving av oppsett ble gjort i forkant av eksperiment for sikring av god funksjonalitet.

Testen skjedde under kontinuerlig observasjon og stanset ved oksygenverdi $3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (fig. 2.4). Ingen tydelig adferdsendring på fisk ble registrert. Lav kritisk oksygen toleranse ($\text{PO}_{2 \text{ krit min}}$) ble ikke gjennomført av etiske årsaker.



Figur 2.4: Fall i løst oksygen ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) ved bergnebbes samlede forbruk i lukket måleoppsett 4 timer. Måling utført januar med 33 liter sjøvannvann. Vekt: $32,7 \text{ g. } (\pm 14,7)$. $n=18$.

2.4 Forsøksoppsett og gjennomføring

2.4.1 Oksygenmålinger

Måling av oksygenforbruk ble utført med enkelte- eller grupper av bergnebb. Forsøksfisk (på forhånd størrelsesvurdert) ble håvet over i klargjort forsøksenhet i løpet av 5 sek.

Poseåpning ble raskt forseglet og måling startet. Avhengig av oksygenforbruket (stabilitet) varte det enkelte forsøk fra 40 - 120 min. Et minimum av 15 min. stabilt O_2 -(kurve) fall ble registrert for senere oksygenanalyser.

Fisk uten stabilt oksygenforbruk pga. høy aktivitet i forsøksoppsett ble selektert ut (fig 2.5).



Figur 2.5: Oksygenforbruk hos to bergnebb. a) eksempel på fisk med stabilt lav aktivitet 10 min. etter overføring til forsøksoppsett. b) fisk med høy ustabil aktivitet (ekskludert).

Forsøk	Parameter registrering	Fiske-størrelse (gram)	Fisk i forsøk	Tilleggs eksponering	Volum	Sesong periode
A1	Oksygenforbruk (temperatur og adferd)	39,1 ($\pm 29,4$)	enkeltfisk	Ingen	10 liter sjøvann	jan/feb og juli
A2	Oksygenforbruk (temperatur og adferd)	18,0 ($\pm 8,0$) 29,3 ($\pm 10,8$) 39,5 ($\pm 8,5$)	vektgrupper sammen i måleoppsett (10 fisk)	Ingen	35 liter sjøvann	januar
A3	Oksygenforbruk (temperatur og adferd)	11,3 ($\pm 2,8$) 33,5 ($\pm 9,5$)	vektgrupper sammen i måleoppsett (10 fisk)	Akutt temperatur- endring	20 liter sjøvann	april og juli

Tabell 2.1: Oversikt over forsøk gjennomført for første del av oppgave med oksygenforbruksmålinger.

2.5 Stressrespons

Forsøk ble utført februar 2011. Grupper av 8 bergnebb (vekt $39,1 \pm 29,4$ g. og lengde $13,5 \pm 3,5$ cm) ble overflyttet i vann fra oppholdskar til tre 100 L kar utstyrt med luftere, skjul (svarte plaststrimler). Etter 17 timer uforstyrret akklimering med overnattsfaste ble gruppene enkeltvis utsatt for følgende:

Kar 1, Kontroll: Fisk ble raskt overført i sterk anestesi ($0,3 \text{ g L}^{-1}$ MS-222) for blodprøvetak.

Kar 2 og 3: Fisk ble håvet opp og holdt i luften i 30 sek. før tilbakeføring i kar. Henholdsvis 10 (kar 2) og 30 minutter (kar 3) senere ble fisk håvet over i sterk anestesi ($0,3 \text{ g L}^{-1}$ MS-222) for blodprøvetak.

Før blodprøvetak ble skjell skrapet bort fra et område bak analfinne. 1 mL-sprøyte med blå kanyler ($0,6 \times 25$ mm) forhåndstilsatt heparin (ca. 300 IE; LEO Pharma %) ble skrått ført inn mot nedre del av ryggstøyle (fig. 2.6) og blod sugd ut manuelt (prøveprosedyre var inntrent på forhånd). Blodet ble overført i ependorfrør lagret på isvann. Etter fullført prøvetak ble

rørene sentrifugert (*Heraeus Biofuge Pico*-sentrifuge) ved 5000 rpm i 5 min. Plasma ble pipettert over i nye ependorfrør og holdt frosset (-12-18 °C) inntil analyser fant sted. Fisk ble deretter veid (*Metler Toledo*; $d=0,01$ g.) og lengdemålet, mens et utvalg fisk ble dissekert for å verifisere modningstadium (Ingen tegn til kjønnsmodning ble observert).

2.6 Sedasjon av bergnebb med Aqui-S

2.6.1 Bakgrunn

Forsøket ble gjennomført etter å ha blitt kontaktet av representanter fra Marine Harvest % og ScanVacc % med forespørsel om utprøving av Aqui-S for langtids-sedasjon av bergnebb under simulert transport (Aqui-S™ vet. 540 gL⁻¹; sedativt virkestoff, *isoeugenol*).

2.6.2 Forstudie

Bergnebbs følsomhet for Aqui-S ble testet under observasjon av fiskens adferd i sjøvann etter tilsatt konsentrasjoner fra; 5-, 10- og 15 ppm (Resultatene viste at kun 25 % av Aqui-S konsentrasjon benyttet for atlantisk laks var tilstrekkelig; likevekt i 3-5 minutter).

2.6.3 Simulert transport i Aqui-S løsning

Fire kar (500 L) med sjøvann ble klargjort før forsøksstart. Karene var innvendig hvite og utstyrt med akvariumspumpe (*Aquarium Systems, NEWA, micro-jet MC 450*) i hver tank, samt med mulighet for separat oksygentilførsel gjennom diffusorstein i bunn. Bergnebb ($23,3 \pm 11,3$ g.; $n=16$) ble fordelt på forsøkskarene. Utblandet Aqui-S i 3 liter ferskvann på røring i en halv time ble straks tilsatt som angitt i tabell 2.2.



Figur 2.6: Viser indre karforhold, prosedyre for blodprøvetak og ytre kar for pilotstudie.

Aqui-S			
Kar	mL	ppm	Isoeugenol (mg L ⁻¹)
1	0	0	0
2	2,5	1,25	0,675
3	5,0	2,50	1,350
4	7,5	3,75	2,025

Tabell 2.2: Aqui-S tilsatt sjøvannskar (500 L). Konsentrasjoner (mL, ppm) per kar, samt av det anestetiske/sedative virkestoffet isoeugenol (mg L⁻¹).

Forsøk ble gjennomført i løpet av 24 timer (én times forsinket oppstart mellom hvert kar) med adferdsregistrering etter 1, 3, 6, 12 og 24 timers "transport". De første 6 timene ble oksygen (og temperatur) logget i kontrollkar av sikkerhetshensyn. Etter en time ble 6 fisk fra hvert kar forsiktig håvet over i sterk anestesi (0,3 g L⁻¹ MS-222) for blodprøvetak. Etter 24 timer ble forsøket avsluttet med blodprøvetak av resterende fisk (10). Plasma ble analysert for kortisol og klorid (detaljer senere).

2.6.4 Bergnebbes oksygenforbruk i sedativ Aqui-S løsning

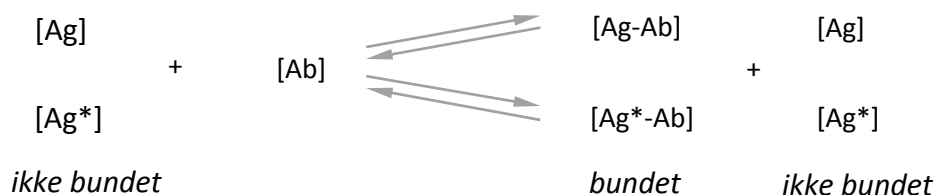
Forsøk med sedasjon og oksygenforbruk hos bergnebb under simulert transport ble utført i juni 2011. Testen ble utført med 10 fisk av forskjellig størrelse. Fisk ble håvet over i klargjort forsøksenhet fra oppholdskar. Pose ble forseglet og målinger startet. Etter 25 minutter med stabilt oksygenfall ble doseringer av Aqui-S (2,5-, 5,0- og 7,5 ppm) tilført forsøksenheten (med sprøyte) gjennom det posemonterte vannuttakssystemet. Visuell observasjon ble utført hvert 5. min. etter tilsetting av Aqui-S.

2.7 Analyser av blodplasma

2.7.1 Kortisol

Analysearbeidet ble utført ved NTNU, Trondheim, juli 2011. Kvantifisering av plasma kortisolinhold (nmol L⁻¹; nM) ble utført i duplikater ved bruk av kortisol RIA kit; COAT-A-COUNT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). Prinsippet bak RIA er kompetitiv reaksjon

mellom merket- (Ag^*) og umerket antigen (Ag) om antistoff i underskudd (COAT-A-COUNT Cortisol håndbok, 2010):



Plasmaprøver ble tinet på is-bad. Fire rør (12x75 mm polypropylenrør) ble merket i duplikater for “total” og *non-specific binding* (NSB). Deretter ble 12 antistoffrør (fra kit) merket tilsvarende for kalibratorer med kjente cortisolfortynninger, som etablerte standardkurven for analysen. Antistoffrør ble merket i duplikater for plasmaprøver før 25 μL av kalibrator A ble tilsatt NSB. Kalibratorer A-F ble så tilsatt i sine merkede rør, og plasmaprøver i resterende rør. Total-rørene ble ikke tilsatt noe. Bak skjerming ble alle rør tilsatt 1 mL tracer (^{125}I) før total ble tatt ut, og resterende rør ble vile-mikset og satt på 37 °C vannbad i 45 minutter med overlatt parafilm. Prøvene ble deretter dekantert på papir, før alle prøver (inkludert total) ble satt inn i telle-kassetter. En gammateller ble benyttet for kvantifisering av kortisol i prøvene.

Samtlige plasma kortisol prøver lå innenfor et intervall på 20 – 92 % binding, og var innenfor rekkevidde for standardkurve (basert på de kjente standarder). *Recovery* for kit’et forventet 91–100 % for kalibratorer.

2.7.2 Klorid

For mål på plasmaprøvers kloridkonsentrasjon ble det benyttet et instrument fra *Sherwood Scientific Ltd., Chloride Analyser, Model 926S*. Arbeidet ble utført på NTNU Trondheim, Realfagsbygget, fysiologi-laboratorie.

20 μL plasma ble tilsatt til en kjent mengde syre-buffer og standard løsning for automatisk titrering av klorid ioner. Ved passering av to sølvelektroder med kjent strøm ble det generert sølv ioner. Sølv ionene i kombinasjon med klorid danner produkt av sølvklorid. Titreringen løper helt til det detekteres frie sølvioner, som et resultat fravær av klorid for sølvkloriddannelse. Instrumentet fremviser dermed i $[\text{Cl}] \pm 2 \text{ mmol L}^{-1}$ (mM; Sherwood

Scientific Ltd., 1997). Apparatet ble kalibrert etter hver 20. prøve, og enkelte prøver ble kjørt flere ganger for å bekrefte nøyaktighet.

2.8 Databehandling og analyser

2.8.1 Oksygenforbruk

Registrering av mg L^{-1} løst oksygen ble logget hvert 30 sekund. Et utvalg etter 15 min. fra start av forsøk på 20-40 min. ble brukt som bakgrunn for lineær regresjon;

$$y = a + bx \quad (\text{Formel 2.1})$$

hvor a er en konstant som angir punktet hvor linja krysser y -akse når $x=0$, og b er stigningstallet ($\Delta \text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} / \Delta \text{min}$).

Stigningstall b fra regresjonslinjen ble videre brukt til å bestemme oksygenforbruk gjennom;

$$MO_2 = b L w^{-1} t^{-1} \quad (\text{Formel 2.2})$$

L er antall liter i pose, w er kroppsvekt av fisk (kg.) per tid (min). Med utgangspunkt i formel 2.2 gir dette;

$$MO_2 = \text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1} \quad (\text{Formel 2.3})$$

Nivå av oksygenforbruk $\text{mL O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ble konvertert til $\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ved multiplikasjon med; $1,429 (\text{mg mL}^{-1} \text{ O}_2) 1000 \text{ g.} / 60 \text{ min.}$

2.8.2 Kortisol

Kortisol ble konvertert fra $\mu\text{g dL}^{-1}$ til nM ved å multiplisere med faktor 27,59.

2.8.3 Grafisk og statistisk behandling

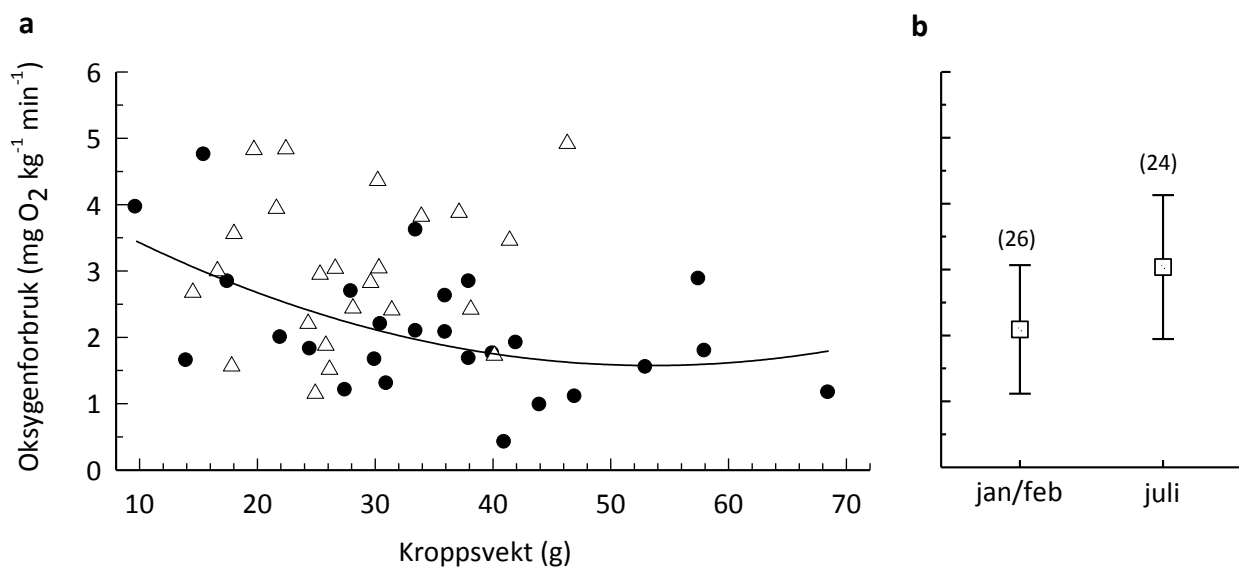
Datapresentasjon og statistisk håndtering ble utført med *Sigmaplot 11.0* (Systat Software, Inc.) med *Sigmaplot Statistics* (Sigmastat) for Microsoft Windows. To grupper ble testet mot hverandre ved bruk av *student t-test* (forsøk 1A) og *Mann-Whitney rank sum test* (stressforsøk; Aq-S sedasjon). Kvadratisk funksjon ble brukt (forsøk 1A og 3A) for ikke-lineær presentasjon av data. Presentert som $\bar{x} \pm \text{SD}$. Fiskevekt presentert ved $\bar{x} \pm$ reelt avvik til maks og min. Data akseptert som signifikant forskjellig ved $p > 0,05$.

3 Resultater

3.1 Oksygenforbruk hos bergnebb

3.1.1 Betydning av kroppsvekt

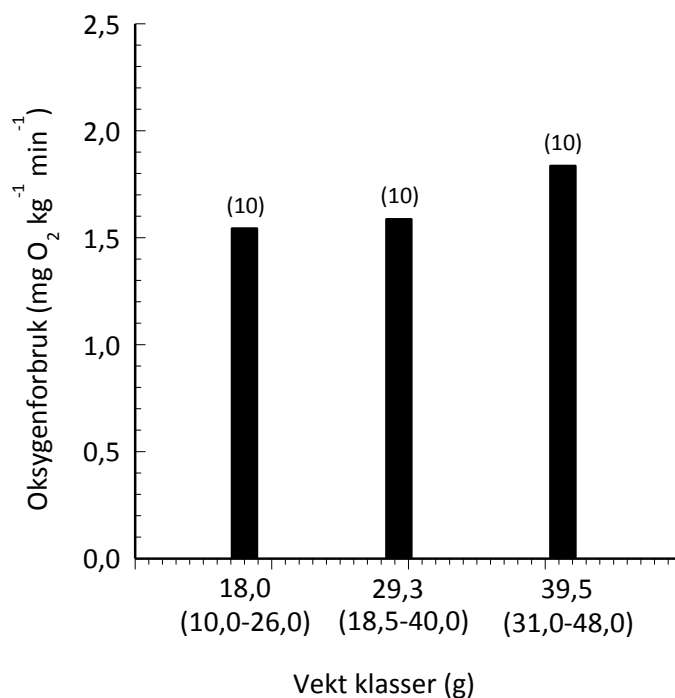
Oksygenforbruk hos bergnebb i lukket system (10 liter sjøvann) med vanntemperatur som i oppholdskar ble målt jan/feb og juli (fig. 3.1), og viser høy individuell spredning. Samlet for individer jan/feb ble det vist signifikant lavere oksygenforbruk enn hos individer i juli. Et representativt utvalg av kroppsvekt i jan/feb angir en utflating av oksygenforbruk ved økende kroppsvekt. En større individuell spredning ble vist i juli. En sammenligning av tid på døgnet forsøkene ble utført (09⁰⁰–19³⁰) hadde ingen betydning for høyt/lavt oksygenforbruk. Individer i jan/feb, 2,09 (±0,97) viste samlet signifikant lavere oksygenforbruk enn individer i juli 3,04 (±1,09). Kroppsvekt; 35,2 g. (±14,2) jan/feb og 27,8 g. (± 8,3) juli.



Figur 3.1: Oksygenforbruk for bergnebb. **a)** jan/feb (●; 8,7 °C) og juli (Δ; 10,1 °C). Data for jan/feb presentert med likningen $y = 4,38 + (-0,10x) + 0,00098x^2$. **b)** viser gjennomsnittsverdi (± SD) for individuelle målinger i a).

3.1.2 Oksygenforbruk for vektgrupper

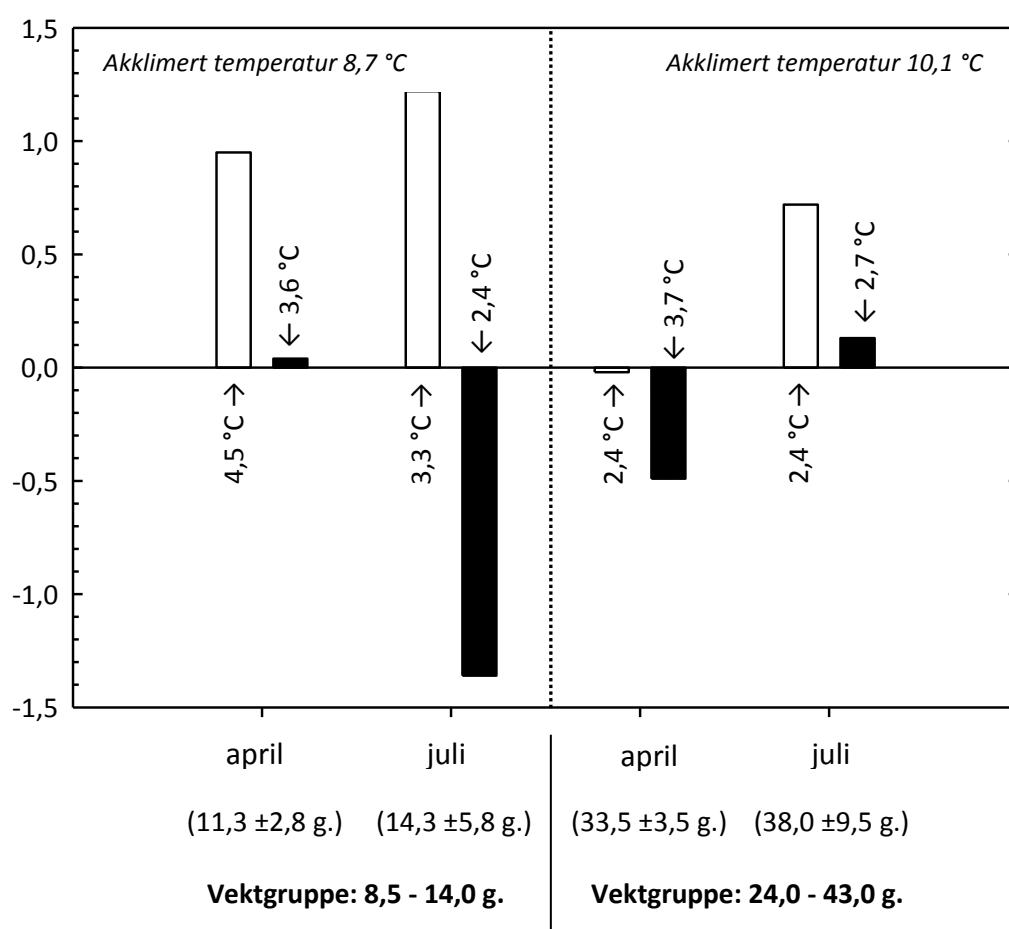
Oksygenforbruk målt for vektgrupper (n=10) av bergnebb (35 liter sjøvann) i januar er vist i figur 3.2. Gruppen med størst vekt 39,5 g. ($\pm 8,5$) viste et oksygenforbruk på $1,84 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ som var henholdsvis 16 - 19 % høyere enn tilsvarende for de to andre gruppene med mindre kroppsvekt; 29,3 g. ($\pm 10,8$), $1,59 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ og 18,0 g. ($\pm 8,0$) $1,54 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.



Figur 3.2: Oksygenforbruk for tre vektgrupper av bergnebb målt ved 8,7 °C i januar måned.

3.1.3 Oksygenforbruk for temperatureksponerte vektgrupper

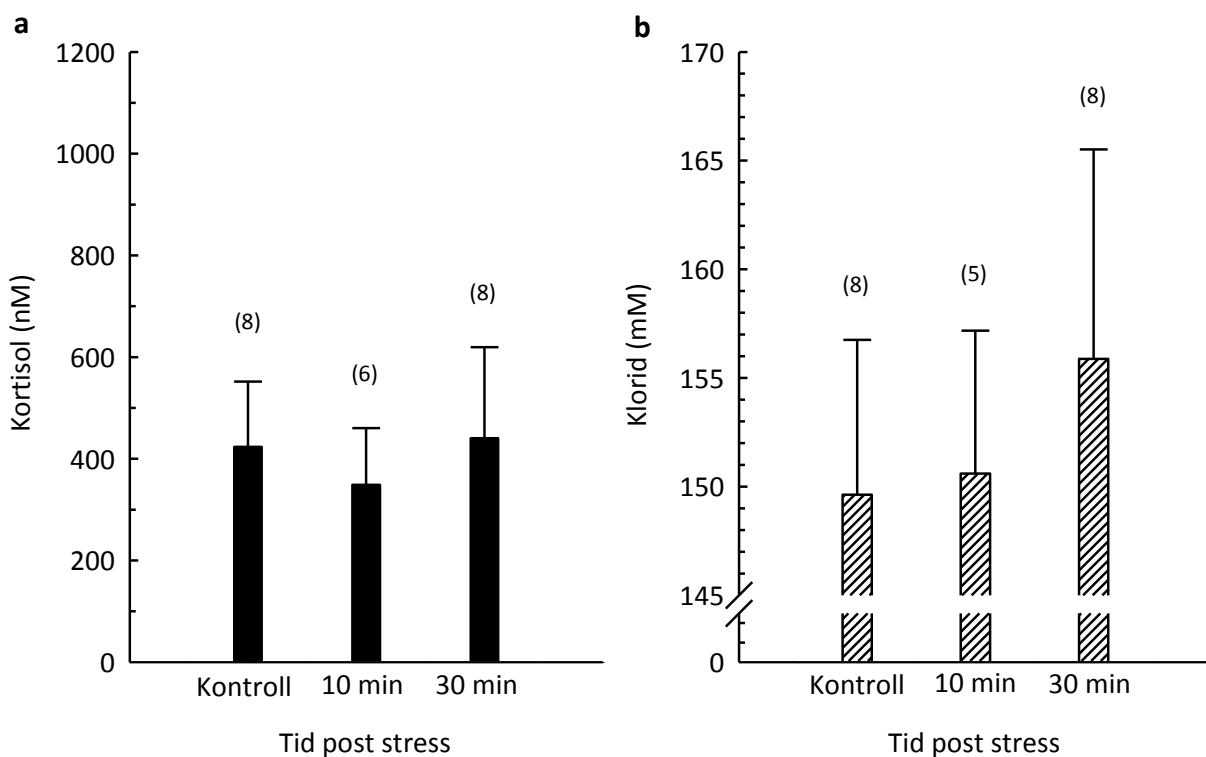
Oksygenforbruk for to vektgrupper (n=10) av bergnebb (10 liter sjøvann) målt i april og juli ved akutt økning (ca. 3,1 °C) og senkning (-3,2 °C) fra kontroll blir vist i figur 3.5. Det ble vist tydeligst utslag for temperaturskiftene hos liten vektgruppe i juli, hvor oksygenforbruket ble redusert med over 50 % ved redusert temperatur, og økte over 44 % ved økt temperatur, fra kontroll (2,7 mg O₂ kg⁻¹ min⁻¹). Mellom høy- og lav temperatureksponering var Q₁₀-verdier i april 1,78 for liten gruppe og 1,63 for stor. Tilsvarende i juli, 6,62 for liten gruppe og 1,54 for stor.



Figur 3.5: Oksygenforbruk for vektgrupper av små og store bergnebb målt i april og juli. Søylar viser differanse i oksygenforbruk ved akutt økning/senkning i temperatur til forskjell fra oksygenforbruk hos samme gruppe ved aklimert oppholdstemperatur. n=10 for alle forsøksgrupper.

3.2 Stressrespons hos bergnebb etter lufteksponering i håv

Nivåer av plasma-kortisol (nM ; fig. 3.6a) og -klorid (mM ; fig 3.6b) av bergnebb målt 10- og 30 minutter etter stresspåvirkning; 30 sekunders lufteksponering i håv. Det ble ikke vist noen signifikant forskjell mellom kontroll og eksponeringsgrupper. Det er noe høyere plasma klorid konsentrasjon etter 30 minutter post stress til forskjell fra de andre gruppene, som også er tilfelle for plasma kortisol, til tross for ingen signifikant forskjell.

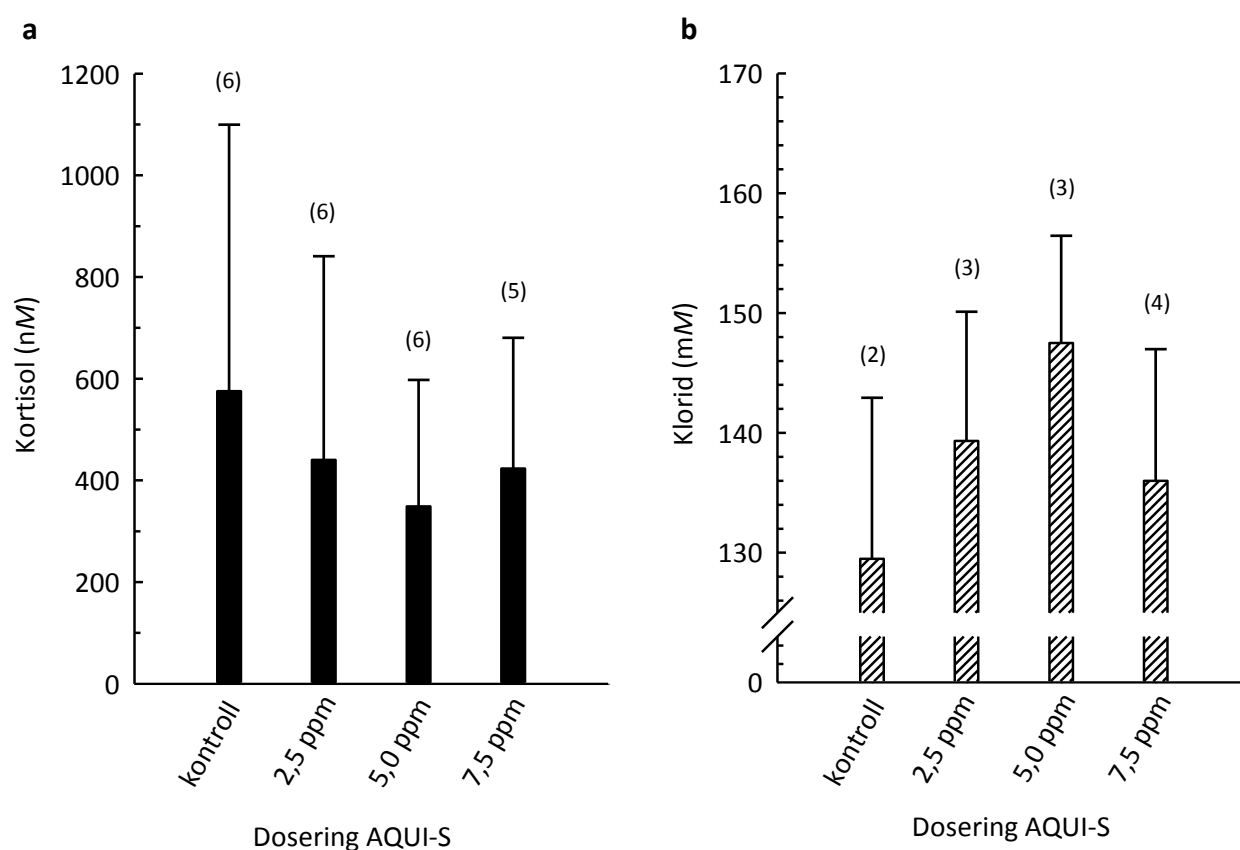


Figur 3.6: Post stress (10- og 30 minutter) blodplasma kortisol- (a) og klorid (b) konsentrasjon hos bergnebb utsatt for 30 sekunders lufteksponering i håv. Data presentert ved \bar{x} (+SD).

3.3 Betydning av Aqui-S sedasjon for stressnivå hos bergnebb under simulert transport

3.3.1 1 time Aqui-s eksponering ved målt kortisol og klorid

Nivåer av plasma-kortisol (nM; fig. 3.7a) og klorid (mM; fig. 3.7b) av bergnebb ble målt etter 1 time i ulike doseringer av Aqui-S (2,5-, 5,0- og 7,5 ppm). Det er en tendens til lavere kortisolverdi blant eksponeringsgrupper sammenliknet med kontroll, hvorav ingen eksponeringsgrupper var signifikant forskjellig fra kontroll. Kloridkonsentrasjon ser ut til å være noe høyere for eksponeringsgrupper enn kontroll, til tross for ingen signifikant forskjell.

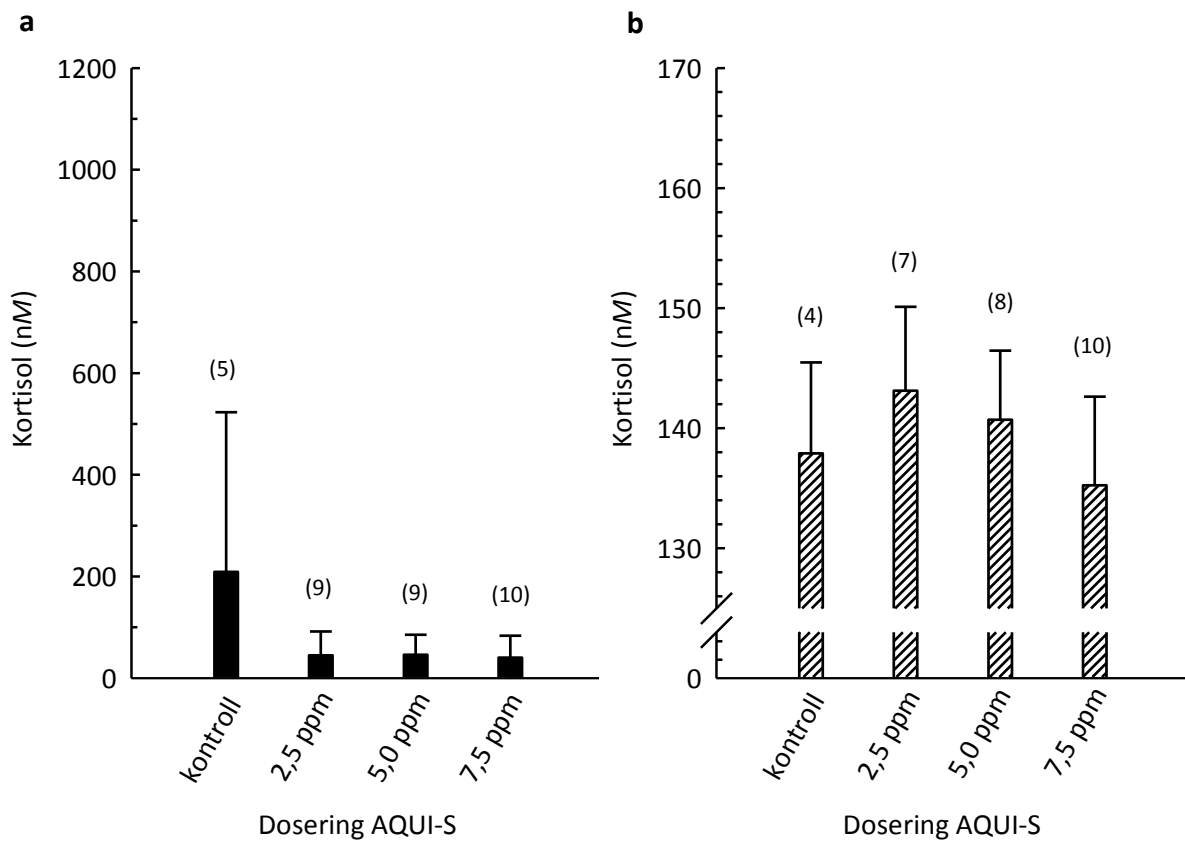


Figur 3.7: Blodplasma kortisol- (a) og klorid (b) konsentrasjon (nM og mM) hos bergnebb, 1 time post Aqui-S eksponering ved 2,5-, 5,0- og 7,5 ppm. Data presentert ved \bar{x} (+SD).

3.3.2 24 timer i ulike Aqui-S doseringer, Kortisol og Kortisol

Nivåer av plasma-kortisol (nM; fig. 3.8a) og -klorid (mM; fig. 3.8b) av bergnebb er angitt 24 timer etter start eksponering av ulike doseringer Aqui-S (2,5-, 5,0- og 7,5 ppm).

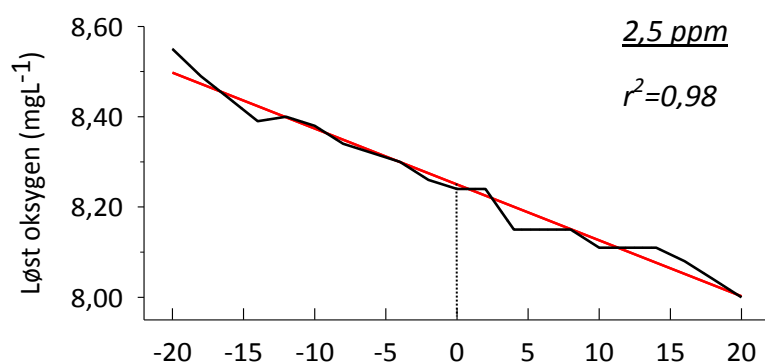
Kontrollgruppe viser tydelig høyere nivå av plasma kortisol enn eksponeringsgrupper, hvorav stor spredning i kontroll 337,4 nM ($\pm 336,3$) og ingen signifikant forskjell.



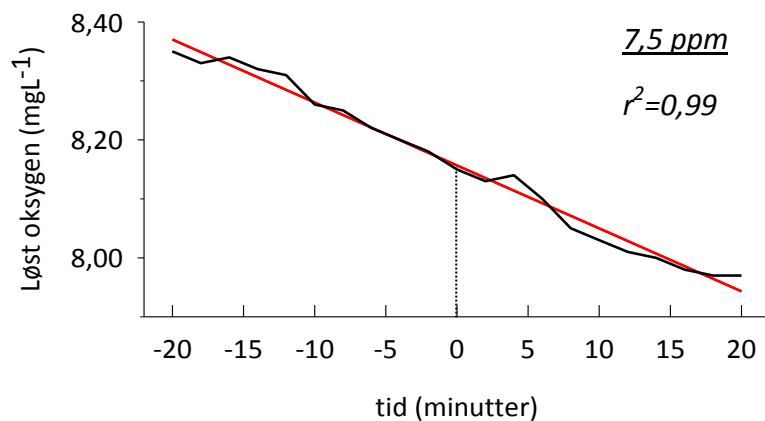
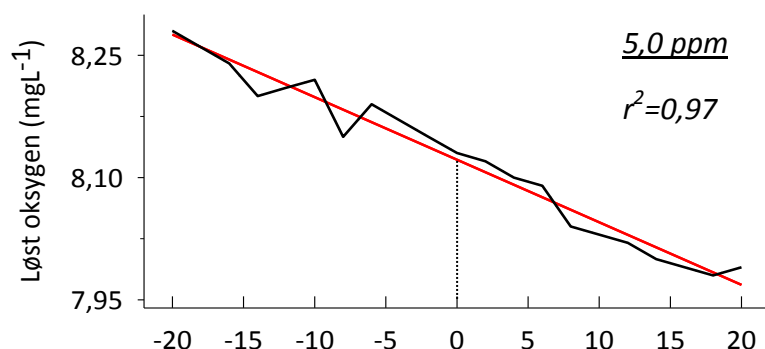
Figur 3.6: Blodplasma kortisol- (a) og klorid (b) konsentrasjon (nM og mM) hos bergnebb, 24 timer post Aqui-S eksponering ved 2,5-, 5,0- og 7,5 ppm. Data presentert ved \bar{x} (\pm SD).

3.3.3 Oksygenforbruk pre-/post Aqui-S tilsetning

Oksygenforbruk ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) for 3 grupper av bergnebb ($n=10$) pre- og post eksponert for ulike doseringer Aqui-S tilsatt (fig. 3.9). Regresjonslinjene (rød; $y = \alpha + bx$) viste ingen forskjell pre-/post tilsetning Aqui-S. Kroppsvekt; 21,5 g. ($\pm 6,5$), 22,3 ($\pm 8,3$) og 21,0 ($\pm 5,5$) for grupper etter økende dosering. Observasjoner viste tydelig roligere adferd etter tilsatt Aqui-S, hvor fisk var inaktiv på bunn av forsøksdunk. Ved 7,5 ppm ble det observert tydelig forstyrrelse i likevekt hos 5-10 fisk.



Figur 3.9: Fall i løst mengde oksygen ved grupper av bergnebb opphold i forsøksenhet. Fra tid 0 (stiplet linje) er tilført Aqui-S; 2,5- (75 μl), 5,0- (150 μl) og 7,5 ppm (225 μl). Lineær regresjonslinje (rød) vist for hele oksygenkurven, med 99 % konfidensintervall og regresjonskoeffisient (r^2). $n=10$ for hver gruppe.



Stigningstall (α), pre/post Aqui-S tilsetning		
ppm	pre	post
2,5	-0,014	-0,011
5,0	-0,007	-0,008
7,5	-0,010	-0,010

Tabell 3.2: Stigningstall (α) fra regresjonslinje (fig. 3.9)

4 Diskusjon

Lus gjør skade på laks i oppdrett og medfører store økonomiske tap for næringen. Bruk av leppefisk til biologisk avlusning i norsk produksjon av atlantisk laks har av den grunn tiltatt betydelig, og det estimeres fra sentrale brukerhold et behov for ca. 20 millioner leppefisk i 2011. Slikt årlig behov har sammenheng med stor dødelighet av leppefisk i forbindelse med transport/utsett-, samt vinterdødelighet i merdene (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a).

Utviklingen illustrerer at det er nødvendig å bygge opp økologisk og biologisk kunnskap om villfanget leppefisk benyttet til avlusning i norsk oppdrett for å unngå høy dødelighet og ytterligere press på eksisterende leppefiskpopulasjoner. Som et første ledd i dette arbeidet er det viktig å få avklart leppefiskens fysiologiske status under transport.

4.1 Metabolisme og måleoppsett

Metabolisme kan måles indirekte gjennom mål av oksygenforbruk (Farrell *et al.*, 2009; Lund og Tufts, 2003). Bakgrunnen for dette er et stabilt kaloriforbruk (frigjøring) for hver volumenhet av oksygen benyttet under aerobt stoffskifte (Schmidt-Nielsen, 1997).

Metabolisme hos teleoste fisk er mulig å separere i tre deler; standard-, rutine- og aktiv metabolsk rate (SMR, RMR og AMR; Schurmann og Steffensen, 1997). For å måle slike definerte metabolismeverdier stilles det krav til måleoppsett som utelukker andre innvirkninger på oksygenforbruk. Det anslås av Steffensen *et al.* (1994) at fisk kan trenge opptil fem timer etter overflytting til respirasjonskammer for å nærme seg SMR-nivå.

Denne studiens intensjon var ikke å finne fram til bergnebbens SMR, men å måle dens oksygenforbruk under simulert transport. Dette innebærer oksygenmåling fra overføring til "bil"/måleoppsett og i løpet av en "gjennomsnittlig transport periode" (1-12 timer i "tank"/måleoppsett). Måling ble derav utført under stabilt oksygenforbruk (forsøksstid begrenset oppad til 120 minutter), 15 minutter etter overføring til forsøksoppsett.

Ved testing av valgt forsøksmetode (fig. 2.4), ble det vist at bergnebb tolererte gradvis redusert oksygennivå til under 4 mg L⁻¹ i løpet av en 4-timers periode, uten synlige

stressresponser (adferd, endret oksygenforbruk). For en nordvest-atlantisk leppefisk, *Tautogolabrus adspersus* med habitatvalg som bergnebb (vegetasjon- og steinbunn langs kysten) er det vist toleranse for oksygennivå ned til 1 mg L^{-1} (Corkum og Gamperl, 2009). Stabile oksygenmålinger oppnådd i lukket oppsett i løpet av de første 2 eksponeringstimene skulle således være transportrelevant uten å være i konflikt med forsøksetikk.

4.1.1 Oksygenforbruk og kroppsstørrelse

Oksygenforbruk hos teleoste fisk synes eksponentielt avtagende med økende kroppsvekt (Killen *et al.*, 2007; Thorarensen og Farrell, 2011).

Oksygenforbruk hos enkeltfisk i stabil temperatur sommerstid (forsøk A1) viste variasjon i oksygenforbruk fra 1,5 til $5,0 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ uavhengig av kroppsstørrelse (9,7 – 68,5 g.). Noe mindre variasjon i oksygenforbruk, og en tilsynelatende størrelsesrelasjon er antydnet fra tilsvarende målinger utført vinterstid. Det er mulig at stabilt, men forskjellig aktivitetsnivå hos de enkelte individ kan forklare noe av spredningen i målt oksygenforbruk.

Hos grupper av bergnebb (forsøk A2) viste den med høyest vekt 16 og 19 % høyere oksygenforbruk enn de to andre vektgruppene. Oksygenforbruk og størrelsesrelasjon viser her en trend som ikke samsvarer for andre teleoste fisk målt under akklimert forhold i hvile (Killen *et al.*, 2007; Thorarensen og Farrell, 2011). Resultatet har mulig forklaringer i respiratorisk respons ved overføring til forsøksoppsett, som er avhengig av kroppsvekt (alder/modning) hos bergnebb (Brydges *et al.*, 2009). En annen forklaring kan være at oksygenforbruket blir stabilt høyere ved innbyrdes aktivitet i “transporttank”/forsøksoppsett for større fisk enn små. Eventuelt, stabilt lavere hos mindre fisk når de er sammen i forsøksoppsett. Sistnevnte antydes ut i fra sammenligning av forsøk med enkeltfisk (forsøk A1), som viste samlet høyere oksygenforbruk.

Hilldén (1981) har observert territoriell hierarkisk adferd hos bergnebb, spesielt under og etter dens gyteperiode i juni-september. Maciak og Konarzewski’s studie (2010) beskriver intraspesifikk spredning i oksygenforbruk for *Cobitis taenia* (europeisk ferskvannsfisk). Forskjeller i lokale territorier og genetisk variasjon er fremhevet som én mulig forklaring av forfatterne. Bakgrunnen for oksygenforbruk individuelt avvikende ved samme eksponering

kan ha sammenheng med bergnebbens levesett, som viser sterk tilknytning til sitt territorie og lite utvandring (Hilddén, 1981; Sayer, 1999; Gjøsæter, 2002).

Innbyrdes aktivitetsforskjeller mellom vektgruppene ble ikke påvist under forsøk. Den trend som vises for gruppenes oksygenforbruk kan ha sammenheng med økt stoffskifte som følge av kjønnsmodning hos de største fiskene (Hilddén, 1981).

4.1.2 Effekt av temperatur for oksygenforbruk

Termisk akklimering hos fisk gir endringer i oksygenforbruk i forhold til temperaturskifte fra utgangspunktet (Q_{10}). Cellers behov for oksygen øker hjertets minuttvolum, og derav oksygenforbruk (*Fick's prisnipp*), eksempelvis ved økning i temperatur (Farrell *et al.*, 2009). Temperaturøkning bidrar til lavere løselighet av oksygen i vann, samtidig som hemoglobinet oksygenaffinitet svekkes (Schmidt-Nielsen, 1997).

I sitt naturlige miljø, samt i transportsammenheng (innlasting og utslipp) er det realistisk å oppleve raske temperaturendringer for bergnebb (Sayer og Reader, 1996). Forsøk i denne studien var ikke tilsiktet å finne bergnebbens oksygenforbruk etter akklimering til endret temperatur. Målinger ble derimot utført i forbindelse med temperaturskifter for å påvise eventuell metabolsk belastning.

Temperaturøkning viste for bergnebb å gi generelt høyere oksygenforbruk til sammenlikning med kontroll hos vektgrupper (3 av 4), med snitt i Q_{10} på 2,64. Et negativt lineært forhold ($Q_{10}=2,71$) i oksygenforbruk hos bergnebb ved akklimert tilstand (10 til 6 °C) ble registrert av Sayer og Davenport (1996). Ut i fra dette antydes ikke betydelig høyere oksygenforbruk ved akutt temperaturøkning på ca. 3,1 °C til sammenlikning med akklimatisert langsom temperaturøkning.

Eksposering for lavere vanntemperatur (ned ca. 3,2 °C) ga respons i oksygenforbruk forskjellig for liten og stor fisk, ved april og juli.

Den store spredningen i oksygenforbruk som respons på temperaturskifte ser ut til å komme av andre faktorer enn temperaturskifte i seg selv, hvor kun en gruppe (liten fisk, juli) viste tydelig økning/senkning i oksygenforbruk ved økt/senket temperatur.

Sayer og Davenport (1996) har vist til at bergnebb inntar en hypometabolsk tilstand etter en tre-dagers temperatursenkning fra 10 til 4 °C. Resultatet av studien viste endring i oksygenforbruk fra 60,0 til 11,4 mg O₂ kg⁻¹ t⁻¹ med (6,0 – 0,19 mg O₂ kg⁻¹ min⁻¹) med ekstrem Q₁₀-verdi på 542 fra 6 til 4 °C. Ingen bevegelse eller reaksjon på eksternt stimuli ble observert ved 4 °C, og det antydes av forfatterne at bergnebb inngår i dyp dvaletilstand (hypometabolisme) ved lengere tids eksponering for lave temperaturer (4 °C) vinterstid.

Gressgylt har også vist seg å være inaktiv ved lave temperaturer, men synes ikke å gå i dvale som bergnebb (Sayer og Reader, 1996). Corkum og Camperl's (2009) studie viser også hypometabolisme hos *Tautogolabrus adspersus* (nord-vest-atlantisk leppefisk). Av andre marine fisk blir det beskrevet av Campbell et. al. (2008) at antarktisk torsk (*Notothenia coriiceps*) reduserer metabolsk rate ved eksponering til -1,5 °C. Imidlertid er ingen annen marin fisk kjent å nedregulere metabolismen på linje med bergnebb (Sayer og Davenport, 1996; Sayer og Reader, 1996; Corkum og Gamperl, 2009).

På grunn av korttids eksponering for lav temperatur i etterkant av håving, ble det ikke registrert oksygenforbruk med samme resultat som i Sayer og Davenport's studie (1996), som tilsvarte akklimert oksygenforbruk i hvile. Det var midlertid samsvar med denne studien og adferdsobservasjoner i forsøk med vektgrupper (forsøk A3), hvor fisk hadde tydelig redusert likevekt og var svært inaktive vinterstid ved lave temperaturer. Dette ble ikke observert ved samme eksponering sommerstid.

Forskjell i oksygenforbruk ved oppholdskartemperatur vinter og sommer (akklimert forhold; Δ 1,5 °C) er ikke vurdert å være betydelig utslagsgivende for forsøk. Vurderingen er basert på studier utført av Sayer og Davenport (1996), hvor bergnebb i 3 dagers akklimering i 10 og 8 grader viste utslag i 0,095 mg O₂ kg⁻¹ min⁻¹ °C⁻¹.

4.1.3 Årstidsbetydning for oksygenforbruk

Det er sannsynlig at daglige og årlige (kropps-) sykluser i hovedsak kontrolleres av mørke-avhengig melatoninsekresjon hos teleoste fisk (Falcon et al., 2010). Slik endokrin pineal sekresjon oversetter daglengde og årstid til biokjemiske lesbare instruksjoner.

Oksygenforbruk viste seg å være samlet høyere for enkeltfisk i juli til sammenligning med jan/feb (forsøk A1; hvorav spredningen individuelt var stor for begge årstider). Ingen årstidsbetydning var å spore for temperatur eksponerte vektgrupper (forsøk A3), annet enn høyere oksygenforbruk i kontrollforsøk i juli, sammenliknet med april.

Fysiologiske sesongvariasjoner bestemmes som konsekvens av miljøendringer og forutstående indre prosesser (eks. reproduksjon; Falcon *et al.*, 2010). Som nevnt tidligere har Sayer og Davenport (1996) vist i sin studie forskjell i oksygenforbruk for bergnebb ved vinter/sommer eksponert for temperaturendringer. Et lavere oksygenforbruk vinterstid er naturlig å forvente ut i fra fysiologisk tilpasning til lavere temperaturer enn sommerstid (Schmidt-Nielsen, 1997). Hos andre marine arter er metabolsk rate ved forskjellige sesonger lite kjent.

Forsøksobservasjoner av bergnebb ved akutt temperaturreduksjon om vinteren, viste lavere aktivitet sammenlignet med fisk gjennomgående lik eksponering sommerstid. Dette samsvarer med det som er observert for bergnebb vinterstid i naturlig miljø, med inaktiv adferd (Sayer og Davenport, 1996; Havforskningsinstituttet, 2011b).

Det er vanskelig å vite hva som er optimal temperatur for bergnebb ved forskjellige årstider. Inntaksvann ble hentet fra Trondheimsfjorden og gir trolig en lik temperatur i forhold til bergnebbs naturlige miljø vinterstid (Frøya). Akklimeringsperioden ville allikevel kompensert oksygenforbruk for temperatur i oppholdskar forut for forsøk (Schmidt-Nielsen, 1997).

4.2 Stressrespons hos bergnebb etter lufteksponering i håv

Forflytning av fisk involverer håndtering og transport som kan forårsake stressbelastninger med etterfølgende tap av sykdomsmotstand og død. Dette gjelder særlig for villfanget fisk (Havforskningsinstituttet, 2011a). I dette studiet ble det dokumentert at stresstoleranse kan variere sesongvis. Allerede etter inntaket av bergnebb var det stor påfølgende dødelighet hos vintergruppen. Klargjøring av stressutvikling for tilretteleggelse av skånsom transport av leppefisk er et prioritert ønske fra den norske oppdrettsnæringen. Som beskrevet i Chrousos (1998) har Selye H. utviklet teorien som beskriver stressor og påfølgende fysiologiske responser, inndelt i 3 nivåer; primær, sekundær og tertiær.

4.2.1 Kortisol

Akutt endokrin stressrespons ved lufteksponering er å forvente (Brydges *et al.*, 2009), og vist å elevere nivåer av kortisol for flere teleoste fisk; *Rachycentron canadum* (Trushenski *et al.*, 2010), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), brunørret (*Salmo trutta*; Barton, 2000) og rød zebra (*Metriaclima estherae*; Ims, 2011). Det er godt etablert at stigende nivå av kortisol i blodplasma er en god indikator på primær stressrespons (Bonga, 1997; Iwama, 1998; Pankhurst, 2011).

I dette studiet viste bergnebb nivåer av plasma kortisol etter luft (håv-) eksponering i 30 sek., henholdsvis etter 10 og 30 minutter 349 nM (13 ng ml⁻¹) og 440 nM (16 ng ml⁻¹). I Barton og Iwama's studie (1991) ble pre-stress-verdier vist for over 150 fiskearter hvor kortisolnivå varierte mye fra <1 til over 200 ng mL⁻¹. Det foreligger mangelfull dokumentasjon på stressfysiologi hos leppefisk (søkeord; *Labridae*, *wrasse*, *stress*, *cortisol*; *Web og science*, *Biological abstract*, *google scholar og google*) som gjør det lite relevant å sammenligne kortisolnivåer i denne studien med andre. Det ble vist kontroll plasma kortisolnivå nærliggende eksponeringsgrupper (423 nM; 14 ng ml⁻¹), som indikerer at bergnebb enten har vært betydelig stresset i oppholdskar før blodprøvetak, eller har hatt liten stressrespons på lufteksponeringen.

De lavest registrerte kortisolnivåene var fra 24 timers Aquil-S eksponering hvor de tre eksponeringsgruppene viste 43,6 nM (±43,2). Ut i fra dette er det god grunn til å indikere betydelig stress i eksponeringsgrupper, men også i kontrollgruppe.

Innad i kontroll og eksponeringsgruppene ble det vist store avvik i plasma kortisol. Dette kan ha to forklaringer; enten har bergnebb forskjellig stressrespons for samme stressor, eller så kommer avviket av måletekniske årsaker. Det er vist merkbar økning i plasma kortisol i løpet av 5-10 minutter etter stresseksponering hos *Scorpius aequipinnis* (Pankhurst *et al.*, 1992) og atlantisk laks (Einarsdottir og Nilssen, 1996). Det ble derfor undersøkt om blodprøvetaksperioden fra 2,5 til 7,5 minutter ga høyere verdier av plasma kortisol ved de siste prøvene til forskjell fra de første. Det ble vist å ikke ha betydning. Andre gjennomgåtte prosedyrer og analyser viste heller ingen klare feilkilder. Store individuelle forskjeller i fysiologisk stressrespons er ikke vanlig hos teleoste fisk (Bonga, 1997), men har forekommet blant annet hos Cobia (*Rachycentron canadum*), som viste kontrollverdier av plasma kortisol

på 16 (± 15 ng mL⁻¹; Trushenski *et al.*, 2010). At bergnebb viser individuelle avvik i plasma kortisol kan mulig ha sammenheng med forskjellig nivå av stressrespons (Chrousos; 1998), med bakgrunn i karopphold (Brattelid, 1999) og/eller artens hierarkiske adferd (Hilldén, 1981).

Idet fisken ble håvet raskt over i bedøvelse må det innebære at den vill-fangede bergnebben enten var stresset av sitt karopphold i fangenskap eller at den anvendte bedøvelse (MS-222) ikke blokkerte fiskens HPI-akse. Dosering (0,3 gL⁻¹) ble på forhånd testet ut av kollega Stein Raymond Haukvik i sin studie med innsovning og oppvåkning etter forskjellige MS-222 doseringer hos bergnebb. Det er også vist hos andre teleoste fisk at MS-222 ikke stimulerer HPI-aksen, og er derfor karakterisert som et suksessfullt bedøvelsesmiddel (Hseu *et al.*, 1998; Ims, 2011).

Det er dermed sannsynlig at bergnebb før blodprøvetak har vært stresset av karforhold eller innbyrdes aktivitet (hierarki; Hilldén, 1981).

Det er kjent at dyr og fisk innehar flere ikke-stress relaterte økninger i plasmakortisol (Trushenski *et al.*, 2010), og at konsentrasjoner i blodet varierer for sesong (Landys *et al.*, 2006) og livssyklus (Bonga, 1997). Et eksempel er atlantisk laks' høye kortisolnivå forbundet til endring i osmoregulering under smoltifisering (Mommensen *et al.*, 1999; Björnsson *et al.*, 2011). Med lite kjennskap til leppefiskens endringer i biologi (Heiberg Espeland *et al.*, 2010a) vet vi også lite om endokrine sykluser relatert til kjønnsmodning og årstidsvariasjoner. Man skal derfor ikke avskrive at ulike fysiologiske prosesser hos bergnebb påvirker kortisolnivået (gjelder også innvirkning på metabolsk rate).

I forsøk med dyr utenfor sitt naturlige miljø skal effekt av opphold i kunstig miljø ikke undervurderes (Brattelid, 1999). Sensitiviteten for ulike stressorer kan også variere mellom forskjellige arter (Jentoft *et al.*, 2005). Lufteksponering kan involvere mange stressorer, fra personer blir observert ved tilnærming til kar, til selve innfangningen med håv (multistressorer). Lufteksponering kan forekomme i transport av fisk ved håving, og er derfor valgt som stressor i denne studien.

4.2.2 Klorid

Endring i hydromineral balanse er et eksempel på en sekundær stressrespons (Barton og Iwama, 1991; Bone og Moore, 2008). Kortisol innvirker på kloridcellers Na^+/K^+ -ATPase-aktivitet som skiller ut klorid og styrer osmoreguleringen hos marine teleoster (Bonga, 1997; Pankhurst, 2007).

Resultater etter 30 minutter post stress var omtrent 9 % høyere enn kontrollverdi, til tross for ingen statistisk forskjell. Sayer og Reader (1996) viste plasma klorid konsentrasjon hos bergnebb ved ca. 147 mM, som til sammenligning med kontroll- og 10 minutter post stress verdier ikke avviker mye. Det er tidligere vist plasma klorid stigning i forhold til håndtering og opphold i fangenskap hos marin fisk (Iversen *et al.*, 1998). Dette kan skyldes økt kortisolnivå som har hindret utskillelse av plasma klorid gjennom sin virkning på Na^+/K^+ -ATPasen.

4.3 Betydning av Aqui-S sedasjon på stressnivå hos bergnebb, under simulert transport

Transport involverer mange stressorer som blir detektert av fiskens sanseapparat (Bonga, 1997; Iversen og Eliassen, 2009). Aqui-S kan bidra til å “sløve ned” fisk ved sedasjon. Derav kan stressrespons reduseres når fisk blir utsatt for håndtering (Iversen og Eliassen, 2009). Fisk kan lettere bli fysisk skadet hvis den blir fullstendig anestetisert, og er derfor lite gunstig i transport (Iversen og Eliassen, 2009). En sedativ Aqui-S dosering som fysiologisk reduserer oppfattelse av stressorer innen transporthåndtering er av stor nytteverdi for akvakulturnæringen.

4.3.1 Kortisol

Iversen og Eliassen (2009) og Iversen *et al.* (2003) har vist en stressreducerende effekt ved bruk av Aqui-S for atlantisk laksesmolt. Plasma kortisol økte til lavere maksimalverdi under simulert transport med Aqui-S, forskjellig fra ikke-sedatert fisk (Iversen og Eliassen, 2009).

For eksponeringsforsøk med 2,5-, 5,0- og 7,5 ppm Aqui-S etter 1- og 24 timer, viste resultater at bergnebb nedsetter sensitiviteten for stress. Det er å antyde til tross for ingen signifikant forskjell mellom eksponering og kontrollgrupper.

Kontrollnivåer av plasma kortisol viste gjennomsnittsverdier nesten tre ganger høyere etter 1 time forskjellig fra 24 timer. Det høye kontrollnivået på plasma kortisol etter 1 time til forskjell fra 24 timer viser da mulig betydning av stress ved overføring til forsøksoppsett.

Ingen klare forskjeller i plasma kortisol ble vist mellom eksponeringsgruppene (2,5-, 5,0 og 7,5 ppm) etter 1 og 24 timer.

Hvor Aqui-S stanser signalet på HPI-aksen ved sedatering av bergnebb er interessant å se på for å si noe om hvordan eksponeringen gir utslag i etterkant (Olsen *et al.*, 1995). For atlantisk laks er Aqui-S vist å være et velfungerende sedasjonsmiddel, med tanke på effekt under transport og videre ettervirkninger (Iversen *et al.*, 2003). Med bakgrunn i Iversen *et al.* (2003) sine kortisollmålinger er det god grunn til å tro at Aqui-S blokkerer sanseinformasjon til hypothalamus, og på den måten stanser HPI-aksen i startfasen. En blokkering i videre løp på HPI-aksen kan gi akkumulering av ACTH under sedasjon, som under oppvåkning gir svært høye plasma kortisol verdier (fig. 1.9; Olsen *et al.*, 1995).

4.3.2 Klorid

Virkning av stress på hydromineral balanse er nevnt tidligere, hvor plasma klorid nivå kan heves etter plasma kortisol frigjøring hos marine fisk.

Resultatene etter 24 timer viste noe høyere verdier for lav- (2,5 ppm) til forskjell fra høy konsentrasjon av Aqui-S (7,5 ppm). Det er ingen signifikant forskjell mellom kontroll og eksponeringsgrupper for plasma klorid, som heller ikke ble vist mellom eksponeringsgruppene. Verdiene korrelerer imidlertid ikke med plasma kortisol konsentrasjonen.

Kontrollnivå av plasma klorid viste ingen signifikant forskjell mellom kontrollgrupper eller eksponering- mot kontrollgrupper etter 1- og 24 timers eksponering for Aqui-S.

Det er et utydelig samsvar mellom plasma kortisol og klorid nivå etter 1 time. En trend kan tolkes ut i fra at plasma klorid nivå var høyere for eksponeringsgrupper til forskjell fra kontroll etter 1 time. Dette er motsatt forhold enn hva som er nevnt innledningsvis. Lav n-verdi (2-4) gjør imidlertid tolkningsgrunnlaget tynt, og resultater kan i større grad bære preg

av tilfeldigheter. Det er heller ikke stort avvik fra Sayer og Reader's (1996) for bergnebb som viste ca. 147 nM.

4.3.3 Adferdsobservasjoner

Adferdsobservasjoner viste at doseringen 2,5-7,5 ppm hadde innvirkning på opprettholdelse av likevekt og respons på ytre stimuli i eksponeringsgrupper til forskjell fra kontroll. Den sedative effekten av Aqui-S gjorde at fisk la seg på bunn, og forsøkte å finne skjul ved det lille som var av objekter i karet.

Det ble observert at bergnebb raskere ble inaktiv ved høy-, sammenlignet med lavere dosering av Aqui-S. Blodparametriske verdier (kortisol og klorid) viste imidlertid ikke effekt av dette.

4.3.4 Oksygenforbruk

Opptak av sedasjonsmiddel (Aqui-S) avhenger av livssyklusbetingede faktorer som involverer alder, størrelse og modning, og påvirker derfor metabolismen (Iversen *et al.*, 2003).

Det var ingen endring i oksygenforbruk i løpet av 20 minutter etter-, til forskjell fra 20 minutter før tilsetning av Aqui-S ($r^2 > 0,97$). Doseringer var de samme som brukt i pilotforsøket (2,5-, 5,0- og 7,5 ppm).

Introduksjon til doseringer; 2,5 - 7,5 ppm av Aqui-S gir derfor grunnlag til å hevde at spontan endring i oksygenforbruk ikke forekommer. Adferdsobservasjoner støtter dette, i og med at aktivitet ikke ble endret pre- og post tilsatt Aqui-S.

Direkte mål av oksygenforbruk ved ikke-detekterbar tilsetning av sedative midler er ikke kjent fra andre studier. Det bør gjennomføres nye studier med måling av bergnebbens oksygenforbruk etter flere timers eksponering mot Aqui-S løsninger (eks. transport slutt).

4.4 Håndtering, stress og årstid

Det var stor forskjell i bergnebbens dødelighet etter transport, henholdsvis om vinter og sommer (fig. 2.2). Bergnebben synes klart mer robust på sommerstid, og takler miljøendringer og håndtering bedre på denne årstiden (Sayer og Davenport, 1996; Sayer og Reader, 1996). Til sammenligning med berggyllt og gressgyllt har bergnebb vist seg å være mye mer robust ved eksponering mot lav temperatur og salinitet, både sommer og vinter (Sayer og Reader, 1996).

5 Konklusjoner

Oksygenforbruk hos leppefiskens bergnebb:

Forsøk med bergnebb viste redusert oksygenforbruk vinterstid sammenliknet med sommerstid. Akutt temperaturøkning medførte høyere oksygenforbruk, mens eksponering mot senket temperatur viste et mer utydelig oksygenforbruk. Individuelt oksygenforbruk viste stor spredning sommerstid, sannsynligvis pga. adferdsmessig stimulert aktivitet.

Stressrespons hos leppefiskens bergnebb:

Eksponeringsgrupper av bergnebb 10- og 30 minutter etter 30 sekunders (håv-) lufteksponering viste høye plasma kortisolnivåer, med noe økning i plasma klorid etter 30 minutter. Kontrollgrupper av plasma kortisol hadde nærliggende nivåer om eksponeringsgrupper, og antyder at bergnebb har vært stresset av karforhold før forsøkstart.

Betydning av Aqui-S sedasjon for plasma kortisol og klorid hos leppefiskens bergnebb, under simulert transport:

Lav dosering av Aqui-S (2,5-7,5 ppm) bidrar til reduksjon av bergnebbens blodplasma kortisol og indikerer sedativ effekt under transport. Sedasjonen synes ikke å hemme fiskens hypo-osmoregulatoriske kapasitet.

Betydning av tilsatt Aqui-S sedativ konsentrasjon for oksygenforbruk hos leppefiskens bergnebb:

Aqui-S doseringer fra 2,5-7,5 ppm viste ingen endring i oksygenforbruk hos bergnebb 20 minutter før og etter tilsetning. Dette til tross for tydelig redusert adferd.

6 Fremtidsperspektiver

Denne studien hadde en næringsrettet profil relatert til transport av leppefisk for lakseoppdrett. Resultatene påpeker behov for bedre kunnskap innen to fagområder: (a) en økologisk tilnærming som belyser den frittlevende bergnebbens livssyklus (foretrukket habitat, dybde og temperatur ved ulike årstider). I tillegg til (b) en fysiologisk tilnærming med dokumentasjon av årtidsrelatert aktivitet og stoffskifte (uavhengig av transport).

Bedre kjennskap til bergnebbens stressfysiologi vil ha stor betydning for oppdrettsnæringen. En bør kartlegge leppefiskens stressrespons ovenfor de ulike påvirkninger som inngår i transport og helårlig opphold i lakseoppdrettsmerdene.

Aqui-S sedasjon ved 2,5–7,5 ppm konsentrasjon indikerer positiv stressreducerende effekt i et småskala oppsett. Videre vil det være interessant å se hvordan de ulike doseringene virker under og etter storskala (full-) transport.

Denne studien viste ingen effekt på oksygenforbruk etter kortvarig sedasjon med Aqui-S. Det vil i fremtidige studier være av interesse å undersøke de sedative Aqui-S konsentrasjoners påvirkning av bergnebbens oksygenforbruk etter lengre transporttid.

7 Referanser

- BARTON, B. A. 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture*, 62, 12-18.
- BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 517-525.
- BARTON, B. A. & 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.
- BERG-HANSEN, L. 2011. Redegjørelse av fiskeri- og kystministeren om status og utsikter for norsk havbruksnæring [Online]. Stortinget. Tilgjengelig: <http://www.stortinget.no/no/Saker-og-publikasjoner/Publikasjoner/Referater/Stortinget/2010-2011/110217/1/> [Hentet: 17.02.2011].
- BJORDAL, Å. 1991. Wrasse as cleaner-fish for farmed salmon. *Progress in Underwater Science*, 17-29.
- BJÖRNSSON, B. T., STEFANSSON, S. O. & MCCORMICK, S. D. 2011. Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 170, 290-298.
- BONE, Q. & MOORE, R. H. 2008. Biology of fishes (3. ed.). New York. Taylor & Francis Group.
- BONGA, S. E. W. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- BOXASPEN, K. 2006. A review of the biology and genetics of sea lice. *Ices Journal of Marine Science*, 63, 1304-1316.
- BRYDGES, N. M., BOULCOTT, P., ELLIS, T. & BRAITHWAITE, V. A. 2009. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 295-301.
- CAMPBELL, H. A., FRASER, K. P. P., BISHOP, C. M., PECK, L. S. & EGGINTON, S. 2008. Hibernation in an Antarctic Fish: On Ice for Winter. *Plos One*, 3, Artikkel No.: e1743.
- CHROUSOS, G. P. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response - The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Stress of Life*, 851, 311-335.
- CLARKE, A. & FRASER, K. P. P. 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*, 18, 243-251.
- CORKUM, C. P. & GAMPERL, A. K. 2009. Does the Ability to Metabolically Downregulate Alter the Hypoxia Tolerance of Fishes?: A Comparative Study Using Cunner (*T. adspersus*) and Greenland Cod (*G. ogac*). *Journal of Experimental Zoology*, 311A, 231-239.
- COSTA, D. P. & SINERVO, B. 2004. Field physiology: Physiological insights from animals in nature. *Annual Review of Physiology*, 66, 209-238.
- DØVING, K. B. & REIMERS, E. 1992. Fiskens Fysiologi, Stavanger, John Frieig Forlag %.

- EINARSDOTTIR, I. E. & NILSSEN, K. J. 1996. Stress responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) elicited by water level reduction in rearing tanks. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15, 395-400.
- FALCON, J., MIGAUD, H., MUNOZ-CUETO, J. A. & CARRILLO, M. 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 469-482.
- FARRELL, A. P., ELIASON, E. J., SANDBLOM, E. & CLARK, T. D. 2009. Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 87, 835-851.
- FISKERIDIREKTORATET. 2011. Statistikk, Aquakultur, hele næringen [Online]. Tilgjengelig: <http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur/totalt-hele-naeringen> [Hentet: 20.02.2011].
- GALHARDO, M. L. S. 2010. Teleost welfare: behavior, cognitive and physiological aspects in *Oreochromis mossambicus*. Phd, Universidade do Porto.
- GJØSÆTER, J. 2002. Distribution and density of goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*; *Labridae*) in the Risør and Arendal areas along the Norwegian Skagerrak coast. *Sarsia*, 87, 75-82.
- GREEN, A. L. 1996. Spatial, temporal and ontogenetic patterns of habitat use by coral reef fishes (Family *Labridae*). *Marine Ecology Progress Series*, 133, 1-11.
- GRUTTER, A. S. 1999. Cleaner fish really do clean. *Nature*, 398, 672-673.
- HAVFORSKNINGSINSTITUTTET. 2011a. Lakseoppdrett [Online]. Havforskningsinstituttet. Tilgjengelig: http://www.imr.no/temasider/akvakultur/lakseoppdrett/laks_i_oppdrett/nb-no [Hentet: 03.08.2011].
- HAVFORSKNINGSINSTITUTTET. 2011b. Leppefisk [Online]. Havforskningsinstituttet. Tilgjengelig: <http://www.imr.no/temasider/fisk/leppefisk/> [Hentet: 08.05.2011].
- HEIBERG ESPELAND, S., NEDREAAS, K., MORTENSEN, S., SKIFTESVIK, A. B., AGNALT, A.-L., HARKESTAD, L. S., KARLSBAKK, E., KNUTSEN, H., THANGSTAD, T., LJØRSTAD, K., BJORDAL, Å. & GJØSÆTER, J. 2010a. Kunnskapsstatus leppefisk - utfordringer i et økende fiskeri. I: *HAVFORSKNINGSINSTITUTTET (ed.) Fisken og Havet*. Havforskningsinstituttet.
- HEIBERG ESPELAND, S., NEDREAAS, K., MORTENSEN, S., SKIFTESVIK, A. B., AGNALT, A.-L., HARKESTAD, L. S., KARLSBAKK, E., KNUTSEN, H., THANGSTAD, T., LJØRSTAD, K., BJORDAL, Å. & GJØSÆTER, J. 2010b. Kunnskapsstatus leppefisk - utfordringer i et økende fiskeri. I: *HAVFORSKNINGSINSTITUTTET (ed.) Fisken og Havet*. Havforskningsinstituttet. Side 4.
- HEUCH, P. A., BJORN, P. A., FINSTAD, B., HOLST, J. C., ASPLIN, L. & NILSEN, F. 2005. A review of the Norwegian 'National Action Plan Against Salmon Lice on Salmonids': The effect on wild salmonids (vol 246. *Aquaculture*, 250, 535-535).
- HILL, R. W., WYSE, G. A. & ANDERSON, M. 2008. Animal physiology, Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- HILLDÉN, N. O. 1981. Territoriality and Reproductive Behavior in the Goldsinny *Ctenolabrus-Rupestris*. *Behavioural Processes*, 6, 207-222.

- HSEU, J.-R., YEH, S.-L., CHU, Y.-T. & TING, Y.-Y. 1998. Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica*, 9, 11-18.
- IMS, S. 2011. The Efficacy and Stress-Reducing Capacity of MS-222, Benzoak and Aqui-S for the Ornamental Cichlid Fish, *Metriaclima estherae*. Master Masteroppgave, Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU).
- IVERSEN, M. & ELIASSEN, R. A. 2009. The Effect of AQUIS-® 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, 216-225.
- IVERSEN, M., FINSTAD, B., MCKINLEY, R. S. & ELIASSEN, R. A. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221, 549-566.
- IVERSEN, M., FINSTAD, B. & NILSSEN, K. J. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168, 387-394.
- IWAMA, G. K. 1998. Stress in fish. *Stress of Life*, 851, 304-310.
- JENTOFT, S., AASTVEIT, A. H., TORJESSEN, P. A. & ANDERSEN, O. 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 141, 353-358.
- JOHNSEN, S. 2010. Fangst, transport og bruk av leppefisk - Regelverk. Praktisk rettet kurs i fangst, transport og bruk av leppefisk. Bårdshaug Herregård 11.05.2010: Mattilsynet.
- KILLEN, S. S., COSTA, I., BROWN, J. A. & GAMPERL, A. K. 2007. Little left in the tank: metabolic scaling in marine teleosts and its implications for aerobic scope. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 274, 431-438.
- KILLEN, S. S., ATKINSON, D. & GLAZIER, D. S. 2010. The intraspecific scaling of metabolic rate with bodymass in fishes depends on lifesyle and temperature. *Ecology Letters*, 13, 184-193.
- LAIDLER, L. A., TREASURER, J. W., GRANT, A. N. & COX, D. I. 1999. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in wrasse (*Labridae*) used as cleaner fish of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal of Fish Diseases*, 22, 209-213.
- LANDYS, M. M., RAMENOFKY, M. & WINGFIELD, J. C. 2006. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and Comparative Endocrinology*, 148, 132-149.
- LUND, S. G. & TUFTS, B. L. 2003. The physiological effects of heat stress and the role of heat shock proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29, 1-12.
- LUSEDATA.NO. 2011. Informasjon om lus på laks i Norge [Online]. Tilgjengelig: <http://www.lusedata.no/default.aspx> [Hentet: 25.03.2011].
- MACIAK, S. & KONARZEWSKI, M. 2010. Repeatability of standard metabolic rate (SMR) in a small fish, the spined loach (*Cobitis taenia*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 157, 136-141.

- MARICONDI-MASSARI, M., KALININ, A. L., GLASS, M. L. & RANTIN, F. T. 1998. The effects of temperature on oxygen uptake, gill ventilation and ecg waveforms in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Thermal Biology*, 23, 283-290.
- MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M. & MOON, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- MUNCASTER, S., ANDERSSON, E., KJESBU, O. S., TARANGER, G. L., SKIFTESVIK, A. B. & NORBERG, B. 2010. The reproductive cycle of female Ballan wrasse *Labrus bergylta* in high latitude, temperate waters. *Journal of Fish Biology*, 77, 494-511.
- MYHRE, V. 2010. Leppefisk. Praktisk rettet kurs i fangst, transport og bruk av leppefisk. Bårdshaug Herregård 11.05.2010: Marine Harvest.
- OLSEN, Y. A., EINARSDOTTIR, I. E. & NILSSEN, K. J. 1995. Metomidate Anesthesia in Atlantic Salmon, *Salmo-Salar*, Prevents Plasma-Cortisol Increase during Stress. *Aquaculture*, 134, 155-168.
- OPPEDAL, F., DEMPSTER, T. & STIEN, L. H. 2011. Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: A review. *Aquaculture*, 311, 1-18.
- PANKHURST, N. W. 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170, 265-275.
- PANKHURST, N. W., WELLS, R. M. G. & CARRAGHER, J. F. 1992. Effects of stress on plasma cortisol-levels and bloodviscosity in blue mao mao, *Scorpius-violaceus* (Hutton), a marine teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*, 101, 335-339.
- PAOLO, P. & RANDAL, J. E. 2000. An annotated checklist of the species of the labroid fish families *Labridae* and *Scaridae*. *Ichthyological Bulletin of the J. L. B. Smith Institute of Ichthyology*, 1-97.
- PEREZ-CASANOVA, J. C., RISE, M. L., DIXON, B., AFONSO, L. O. B., HALL, J. R., JOHNSON, S. C. & GAMPERL, A. X. 2008. The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. *Fish & Shellfish Immunology*, 24, 600-609.
- PERRY, S. F. & GILMOUR, K. M. 2002. Sensing and transfer of respiratory gases at the fish gill. *Journal of Experimental Zoology*, 293, 249-263.
- PIKE, A. W. & WADSWORTH, S. L. 2000. Sealice on salmonids: Their biology and control. *Advances in Parasitology*, Vol 44, 44, 233-337.
- REGJERINGEN 2009. Politisk plattform for flertallsregjeringen. [Online]. Regjeringen. Tilgjengelig: <http://www.imr.no/temasider/fisk/leppefisk/>. Side 23. [Hentet: 24.04.2011].
- SAYER, M. D. J. 1999. Duration of refuge residence by goldsinny, *Ctenolabrus rupestris*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79, 571-572.
- SAYER, M. D. J. & DAVENPORT, J. 1996. Hypometabolism in torpid goldsinny wrasse subjected to rapid reductions in seawater temperature. *Journal of Fish Biology*, 49, 64-75.
- SAYER, M. D. J. & READER, J. P. 1996. Exposure of goldsinny, rock cook and corkwing wrasse to low temperature and low salinity: Survival, blood physiology and seasonal variation. *Journal of Fish Biology*, 49, 41-63.

- SAYER, M. D. J., TREASURER, J. W. & COSTELLO, M. J. 1996. North european wrasse: Identification, distribution and habitat. I: Wrasse: biology and use in aquaculture, Oxford, Fishing News Books. 3-42.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1997. Animal physiology: adaptation and environment. (5. ed.). Cambridge Cambridge University Press. Cambridge UK.
- SCHURMANN, H. & STEFFENSEN, J. F. 1997. Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology*, 50, 1166-1180.
- SHERWOOD SCIENTIFIC Ltd. 1997. Model 926S Chloride Analyser, Operator's Manual.
- STATISTISK-SENTRALBYRÅ 2011. Økonomiske analyser 1/2011. [Online]. Tilgjengelig: <http://www.ssb.no/emner/08/05/10/oa/201101/oa2011-1.pdf> [Hentet: 21.04.2011].
- STEFFENSEN, J. F., BUSHNELL, P. G. & SCHURMANN, H. 1994. Oxygen consumption in four species of teleosts from Greenland: No evidence of metabolic cold adaptation. *Polar Biology*, 14, 49-54.
- TAYLOR, E. W., LEITE, C. A. C., MCKENZIE, D. J. & WANG, T. 2010. Control of respiration in fish, amphibians and reptiles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43, 409-424.
- THANGSTAD, T. 1999. Spatial and temporal distribution of three wrasse species (*Pisces: Labridae*) in Masfjord, western Norway: habitat association and effects of environmental variables. Hovedoppgave, Universitetet i Bergen (UiB).
- THORARENSEN, H. & FARRELL, A. P. 2011. The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. *Aquaculture*, 312, 1-14.
- TRUSHENSKI, J., SCHWARZ, M., TAKEUCHI, R., DELBOS, B. & SAMPAIO, L. A. 2010. Physiological responses of cobia *Rachycentron canadum* following exposure to low water and air exposure stress challenges. *Aquaculture*, 307, 173-177.
- UICN. 2010. Native (Residens) of *Ctenolabrus rupestris* [Online]. International Unit for Conservation of Nature. Tilgjengelig: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/187751/0/rangemap> [Hentet: 22.07.2010].
- WARNER, R. R. & ROBERTSON, D. R. 1978. Sexual Patterns in the Labroid Fishes of the Western Caribbean Part 1 the Wrasses *Labridae*. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 1-27.
- WWF. 2009. Salmon Aquaculture Dialogue - Draft principles and criteria for environmentally, socially and economically responsible salmon farming [Online]. World Wildlife Foundation. Tilgjengelig: http://www.fair-fish.ch/files/pdf/english/wwf_salmon_draft-20090219.pdf [Hentet: 20.03.2011].
- WWF. 2011. Ordinære lusemilder mot lakselus [Online]. naturvernorganisasjonen WWF. Tilgjengelig: http://www.wwf.no/dette_jobber_med/hav_og_kyst/akvakultur/parasitter_og_sjukdommer/ordinare_lusemilder_mot_lakselus/. [Hentet: 23.03.2011].