

Metode for påvisning av smoltstatus hos Atlantisk laks

Av Trond Rosten og Anders J. Fjellheim

Trond Rosten er forskningsleder ved NIVA og Anders J. Fjellheim forsker ved NIVA.

Sammendrag

Lakseoppdrett i Norge medfører at et betydelig antall millioner laksesmolt overføres fra ferskvannslokalteter til sjøanlegg hvert år. For at laksen skal overleve overføring fra ferskvann til sjøvann, er det viktig at den er godt smoltifisert. Smoltifiseringsprosessen innebærer både fysiologiske og morfologiske endringer og denne prosessen styres av miljøfaktorer. De viktigste miljøfaktorene er daglengde og temperatur i vannet, og disse kan til en viss grad styres ved et settefiskanlegg for laks. Før overføring til sjø vil det være viktig av dyrevelferdsmessige og økonomiske grunner, å kunne verifisere at fisken er godt smoltifisert. En metode for verifisering av smoltstatus er bruk av korttids sjøvannseksposering og deretter måling av kloridnivå i blodet, denne metoden beskrives i denne artikkelen.

Summary

Salmon farming in Norway implies that millions of salmon smolts are transferred from freshwater sites to seawater sites every year. In order for salmon to survive

the transfer from freshwater to seawater, it is important that the fish is smoltified. The smoltification process implies both physiological and morphological changes, and the process is controlled by environmental factors. The most important environmental factors are day length and temperature in the rearing water, and these factors can to some degree be controlled in freshwater aquaculture facilities. Before transfer of salmon to seawater it will be important due to animal welfare and due to economical reasons, to verify that the fish is smoltified. One method for verification of status of smoltification is the use of short term seawater exposure followed by measurement of the chloride level in the fish blood, this method is described in this article.

Bakgrunn

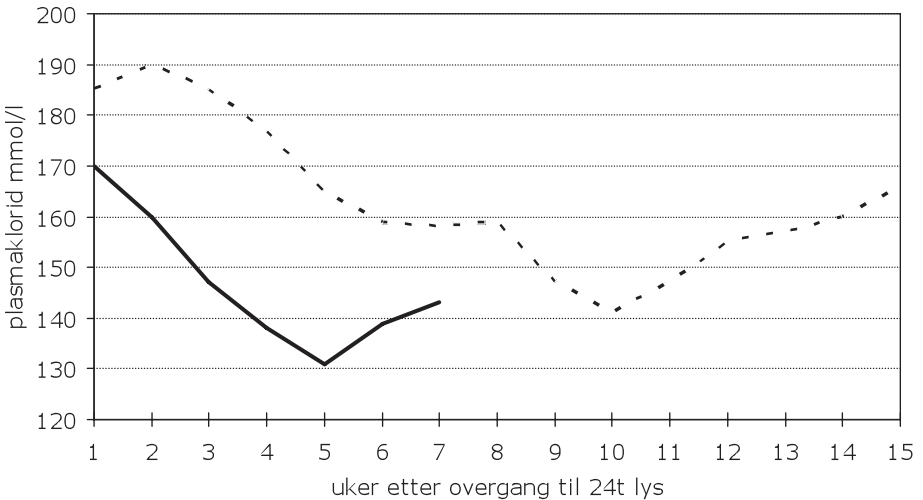
Produksjonen av laks i Norge har økt betydelig siden lakseoppdrett startet for rundt 40 år siden og for 2009 antas produksjonen å bli 850 000 tonn. Med denne økningen i produksjon kommer et økt behov for laksesmolt. Smoltbehovet an-

slås til å være over 350 millioner i 2021 (Kittelsen et al. 2006), mens dagens produksjon er rundt 240 millioner smolt i året. For at laksen skal overleve ved overføring fra ferskvann til sjøvann, er den avhengig av å ha gjennomgått smoltifisering.

Smoltifiseringsprosessen hos Atlantisk laks skal forandre en ferskvannslevende lakseparr til en smolt som har evnen til å overleve og vokse raskt i sjøvann. Denne omdannelsen involverer endringer i ytre morfologi, en smolt er sølvblank med svarte finnekantene, og den involverer kompliserte fysiologiske forandringer. Smoltifiseringen påvirkes av miljøet, primært av fotoperioden og temperaturen, figur 1. Disse parametrene kan bli manipulert av oppdretteren for å forbedre vekst og styre smoltifiseringen (Duncan

and Bromage 1998; Handeland et al. 2004). Økt temperatur stimulerer vekst ved at metabolismen (stoffskiftet) øker. Lange dager gir flere timer for fôropptak. Lang daglengde gjør at appetitten øker, og den vil samtidig påvirke de naturlige sesongmessige forandringer i fisken (de indre rytmene). Fisken har et eget organ som kalles pinealkjertelen som den benytter for å oppfatte daglengde og årstid. Informasjon den får via øynene og pinealkjertelen vil påvirke produksjonen av fiskehjernen signalstoffer, slik at fisken kan foreta de riktige omstillinger til livs stadium og årstid.

For å kunne bli en smolt må yngel ha en viss terskelstørrelse. Under naturlige lysforhold vil fisken bestemme seg for å smoltifisere på sensommeren men selve prosessen fullføres først den påfølgende



Figur 1. Utvikling av kloridverdier hos smolt fra samme kommersielle anlegg ved 3 grader (stiplet linje) og 10 grader (hel linje). Optimal smoltifisering er etter 5 uker ved 10 grader, og etter 10 uker ved 3 grader.

våren (naturlig eller kunstig vår). Laksen bestemmer seg altså for å smoltfisere på nedadgående daglengde. Manipulering av daglengde brukes i settefiskanlegg for å påvirke smoltifiseringstidspunkt. Fisk som utsettes for en ”kunstig” vinter (kort daglengde) om sommeren, vil smoltifisere om høsten og kalles 0-åring (Arnesen et al. 2003). En ”normal” smolt kalles 1 åring, og smoltifiserer om våren med økende daglengde og økende temperatur etter at den har gjennomgått en naturlig vinterperiode. Laksesmolt som ikke overføres til sjøvann når den er smolt, vil desmoltifisere og miste sjøvannstoleransen (Stefansson, Berge, and Gunnarsson 1998).

Ved overføring av laks fra ferskvann til sjøvann vil en dårlig smoltifisert fisk i de fleste tilfeller dø som en følge av vann- tap. Det vil derfor være av stor betydning for fiskevelferden at fiskens sjøvannstoleranse er testet før den overføres til sjøvann.

Det er i dag hovedsakelig to metoder som benyttes for å teste at laks er smoltifisert. Den ene metoden er Na K -ATPase, en metode som måler aktiviteten av et ionetransporterende enzym som er lokalisert i gjellene, den andre metoden er sjøvannstesting med etterfølgende måling av kloridinnhold i blodet. Bestemmelse av smoltifiseringsstatus ved hjelp av sjøvannstesting og måling av kloridinnhold vi bli nærmere beskrevet i denne artikkelen.

Oppsett av sjøvannstoleranse test

Benytt egnet stamp/kar for gjennomføring av sjøvannstoleranse test. Fyll opp

med naturlig temperert ferskvann, eventuelt med sjøvann hvis det er tilgjengelig. Vanntemperaturen bør være mellom 6 og 12 grader i løpet av testen. Bruk akvariesalt (Instant Ocean) for å justere salinitet til 35 promille. Tilsetting av salt bør gjøres i god tid før fisken skal overføres til stampen, slik at alle krystaller er løst opp. Luftesteiner som blir drevet av en akvariepumpe monteres. Unngå bruk av rent oksygen om dette ikke kan styres til å ligge stabilt på normale oksygenverdier. Stampene må dekkkes med skyggenetting eller liknende slik at ikke fisk hopper ut. La lyset stå på hele døgnet under testen. Dekk likevel til halve stampen slik at fisken kan stå skjermet hvis den ønsker. Unngå trafikk, bråk og risting i det rommet fisken skal testes (minst mulig stress). Alle stampene skal ha mest mulig like fysiske betingelser, også fra gang til gang.

Overføring og prøvetaking av fisk

Kar som det skal tas ut fisk fra skal sultes i ca 18 timer før overføring til teststamper. Det er viktig å være forsiktig og nøyaktig ved opptaket av fisk til tester. Forsøk å utføre prosessen så raskt som mulig slik at fisken påføres minst mulig stress. Utvalget av fisk bør være representativt for karet. Fisken skal stå 24 timer i stampene før den tas opp. Vann- temperatur i råvannet og teststampene registreres, differansen bør være minst mulig. Oksygenmetningen måles også i hver av teststampene. En fisketetthet på 0,7 fisk pr liter vann kan aksepteres om smolten ikke er for stor. Ved større smolt

(>90g) anbefales å gå ned på antall fisk pr liter vann.

Etter 24 timer eksponering for sjøvann tas 10 fisk ut fra teststampen med håv. Fiskene overføres til en bøtte med sterk bedøvelsesløsning (Benzoak eller lignende). I det fisken mister likevekten (30-90 sekunder) overføres den til en bøtte med vedlikeholdsbedøvelse. Blodprøver gjennomføres ved å legge litt papir i venstre hånd. Fisken tas opp fra vedlikeholdsbøtten og legges i papiret og gis tre knips i hodet. Blod tas fra caudalaorta med en heparinisert sprøyte med 0.6 x 25mm nålespiss. Hold fisken med buken opp og hodet fra deg, og stikk 5-8 mm bak gattfinnen. Trekk forsiktig i stemplet, unngå for kraftig vakuum da blodåren kan klappe sammen. Når ca 0.3 ml blod er sugd opp avsluttes sprøytestikket. Blodet overføres til 1.5 ml merkede eppendorfrør som korkes og settes klar til sentrifugering.

Fisken legges bort for senere veiing, og bestemmelse av ytre morfologi (smoltkarakterer). Sentrifugering bør gjennomføres etter hver 10 fisk, maksimalt 30 minutter etter at blodprøven ble tatt. Sentrifuger blodet i 3 minutter ved 5 000 omdreininger i minuttet. Plasma suges av og overføres til nye, merkede eppendorfrør, disse korkes og settes kaldt i påvente av analyse. Pipettespiss skiftes for hver prøve. Unngå å få med blod i plasmaet.

Fiskens ytre morfologi registreres og føres inn på registreringsskjema for smolt-dokumentasjon. Ytre morfologi vil variere fra parr til ferdig smolt. En parr vil være grå/grønn og ha typiske "fingermerker", mens en smolt vil være sølv-

farget og ha svarte finnekanten. Fiskenes vekt (gram) og lengde (cm) noteres, slik at kondisjonsfaktor (likning 1) kan bestemmes senere. Kondisjonsfaktoren går ned når laksen smoltifiserer, det vil si at fisken blir slankere. Den samme prosedyren gjennomføres for referansefiskene (6 fisk tatt direkte fra oppdrettskaret).

$$\text{Kondisjonsfaktor} = ((\text{vekt i g}) \times (\text{lengde i cm})^{-3} \times 100) \quad (1)$$

Etter hver ca 40. test fisk settes brettet med plasmaprøver i kjøleskapet. Prøvene skal helst ikke fryses, men oppbevares ved 0-4 grader fram til analysering. Prøvene kan stå i maksimalt 5-7 dager i kjøleskap før de analyseres. Lengre oppbevaring forutsetter frysing ved minus 18 grader.

Gjennomføring av kloridmålinger

Denne beskrivelsen baserer seg på bruk av Sherwood Scientific klorid analysator.

Sjekk at sølvstavene er klare for bruk før oppstart. Hvis sølvstavene er svarte kan disse tas ut og pusses blanke. Dette gjøres med egen pussepasta (evt. stålull). Ved bruk av stålull; vær oppmerksom på at stålstøv ikke må komme på instrumentet, da dette kan gi kryptstrøm og feilmålinger. Sølvstavene vaskes deretter med spritløsning (isopropanol) og settes på plass i soklene. Unngå å få fingeravtrykk/fett på sølvstavene eller på soklene, vask over med Q-tips dynket i sprit. Bergerglasset fylles ca 1/2 fullt med kombinerbuffer (Sherwood buffer system,

VWR). Volumknappen skal stå inntrykt på 20 µl. Instrumentet må nå klargjøres ved hjelp av en "condition cyclus". Dette gjøres ved at man tilsetter 2 x 20 ul med kloridstandard og trykker på "condition" knappen. Kloridforurensinger vil da bli fjernet fra kombinertbufferen og instrumentet vil klargjøre seg selv.

For kalibrering benyttes 100 mmol/l kloridstandard. Tilsett 20 µl kloridstandard og trykk på "titrate" knappen. Kjør 3-4 kalibreringskontroller og noter disse på analyseeskjema. En godt trent operatør kan oppnå en nøyaktighet på om lag 2 % i analysene. Ved behov stilles kalibreringsskruen for 20 µl opp eller ned, men kun etter test med kjent 100 mmol/l kloridstandard.

Instrumentet er nå klart for analyser av plasmaprøvene. Kjør helst 2 paralleller av hver prøve. Mellom hver titrering skiftes eller skylles pipetten i destillert vann og tørkes. Før inn nummer på prøven og analyseresultater på analyseeskjema. Etter 20 prøver kjøres en kalibreringssjekk av instrumentet. Viser instrumentet feil ved denne sjekken skal de siste fem prøvene tas om igjen. Når lampen "change sol" lyser, byttes syrebufferen og sølvelektroden pusses hvis de ikke er blanke. Ved skifte av løsning eller driftsproblemer gjentas oppstartprosedyren. Se forøvrig instruksjonsbok for feilsøking ved driftsproblemer.

Instrumentet bør oppbevares i et rom med jevn romtemperatur og sølvelektroden fjernet. Bufferløsningen oppbevares mørkt ved romtemperatur. Vedlikehold skal utføres i henhold til instrumentets instruksjonsbok. Etter kjøring

av prøver tørkes instrumentet over med en svamp fuktet med isopropanol. Dette vil desinfisere og reingjøre instrumentet for organisk materiale og fett.

Talking av resultater

1. Vurder helheten i alle opplysningene som er tilgjengelige, som fiskeadferd i karet, fiskens ytre morfologi, vann- og sjøtemperatur når du skal avgjøre smoltstatus.
2. Se på vanntap i fisken ved å sammenligne kondisjonsfaktor på referansefisk med kondisjonsfaktor etter 24 timer i sjøvann. God smolt bør ikke ha større nedgang i kondisjonsfaktoren enn 1-5 % etter å ha vært et døgn i sjøvann.
3. Se på forskjellen mellom plasmaklorid i ferskvann og plasmaklorid i sjøvann. Forskjellen mellom disse bør være så liten som mulig, men en god smolt ligger gjerne 5-10 mmol/l over referansefisken etter 24 timer i 35 ppt sjøvann.
4. Normalverdi for plasmaklorid i laksesmolt ligger gjerne mellom 130-140 mmol/l. Høyere eller lavere verdier enn dette indikerer grad osmotisk eller annet stress. Lavere verdier i fisk i ferskvann indikerer som oftest at fisken har blitt utsatt for stress. Sykdom, håndtering, dårlig vannkvalitet, saltforgiftning og en rekke andre ting, kan medføre fall i plasmakloridverdien. I intensivt smoltoppdrett vil forhøyet CO₂-nivå gi opphav til tap

- av plasmaklorid, og derigjennom lavere verdier (Fivelstad and Binde, 1994).
5. Plott opp snittverdiene for sjøvannstestet fisk. Tilstreb å få flere punkter på kurven ved å følge gruppens utvikling over tid (2-3 måneder før utsett). Se på kurvens utvikling (opp eller nedadgående?). Sett heller ut smolten når kurven er på tur ned, enn på tur opp.
 6. Se på spredningen av sjøvannstoleranse i gruppen. Standardavviket bør være så lite som mulig (+/- 5-8 mmol/l) hos god smolt.
 7. Ta alltid min 20 fisk i hver sjøvannstest gruppe slik at det statiske grunnlaget blir så bra som mulig.
 8. Merkelige verdier må anmerkes og vurderes spesielt.

Referanser

- Arnesen, A. M., H. Toften, T. Agustsson, S. O. Stefansson, S. O. Handeland, and B. T. Björnsson. 2003. Osmoregulation, feed intake, growth and growth hormone levels in 0+ Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred to seawater at different stages of smolt development. *Aquaculture* 222, no. 1-4: 167-187.
- Duncan, N. J., and N. Bromage. 1998. The effect of different periods of constant short days on smoltification in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 168, no. 1-4: 369-386.
- Fivelstad, S., and Binde, M. 1994: Effects of reduced water flow (increased loading) in soft-water on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) while maintaining oxygen at constant level by oxygenation of the inlet water. *Aquacultural Engineering* 13:211-238.
- Handeland, S. O., E. Wilkinson, B. Sveinsbø, S. D. McCormick, and S. O. Stefansson. 2004. Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture* 233, no. 1-4: 513-529.
- Kittelsen, A.T., T. Rosten, Y. Ulgenes, J.R. Selvik, and H. Alne. 2006. *Tilgjengelige ferskvannsressurser til fremtidig produksjon av settefisk til laks og ørret*. FHL rapport.
- Stefansson, S. O., ÅI Berge, and G. S. Gunnarsson. 1998. Changes in seawater tolerance and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity during desmoltification in Atlantic salmon kept in freshwater at different temperatures. *Aquaculture* 168, no. 1-4: 271-277.