



Uit

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges Fiskerihøgskole

Effekter av stress under tidlige livsstadier (egg- og yngelstadium) på stressindusert kortisolrespons, vekst og sjøvannstoleranse hos smolt av atlantisk laks (*Salmo salar*)

Vegar Jakobsen Bæhr

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap

August 2015



Effekter av stress under tidlige livsstadier (egg- og yngelstadium) på stressindusert kortisolrespons, vekst og sjøvannstoleranse hos smolt av atlantisk laks (Salmo salar)

***Vegar Jakobsen Bæhr
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
Universitetet i Tromsø – Norges arktiske universitet***

August 2015

Forord

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til mine to fantastiske, skremmende kunnskapsrike og endeløst tålmodige veiledere, professor Even H. Jørgensen og professor Helge K. Johnsen. Jeg er meget glad for tilliten dere har vist meg igjennom å gi meg mulighet til å ta del i prosjektet deres. Dere har viet meg mange av deres arbeidstimer, midt oppi en stappfull timeplan med både administrasjon, forskning, undervisning, fagfellevurderinger og veiledning av andre studenter på agendaen. At dere midt i et høyt arbeidspress evner å opptre såpass medmenneskelig og uformelt som dere gjør ovenfor deres studenter, med mange fantastiske røverhistorier og en god porsjon humor, er ikke annet enn beundringsverdig. Dette siste, har for min del vært av stor betydning, og jeg er dere begge en stor takk skyldig for å ha klart å få meg gjennom denne noe krevende siste etappen av mitt studieløp!

En takk rettes også til Helge Tveitens forskningsgruppe ved Nofima AS og mannskapene ved HiT for alt arbeidet som dere på forhånd og underveis har lagt ned i fisken som vi fikk til vår disposisjon. Ellers så ønsker jeg å takke alle dere som har hjulpet meg underveis i prosessen, både med utførelsen av eksperimentene og med laboratorieanalysene. Særlig vil jeg nevne søstrene Lone og Charlotte Gustavsen, som jeg har hatt gleden av å studere sammen med, og som begge har bidratt med et betydelig antall arbeidstimer i mitt prosjekt. Dere har vært helt uunnværlige, særlig i forbindelse med de radioimmunologiske analysene. Jeg kan heller ikke unngå å nevne Helge Tveiten, som både har vært en inspirator og som har vært involvert i flere deler av arbeidet mitt. Takk til Marianne Frantzen for å ha delt av sine erfaringer og takk til Morgan Bender for både hjelp, laboratoriehygieniske advarsler og hyggelig selskap i de mange lange timene jeg har tilbrakt på RIA-laben. En takk til Tanja Hanebrekke for alle rådene i prosessen med å dytte prøvene igjennom β -scintillasjonstellersen, og særlig for at du spurte meg og Charlotte om vi hadde husket å ha tellevæske i rørene når vi klagde på at justeringa av tracer-løsninga gikk merkverdig dårlig.

Jeg har hatt en veldig fin studietid i Tromsø, mye takket være alle mine gode studiekamerater og det rause og inkluderende miljøet som jeg har fått oppleve ved BFE-fakultetet. Gjennom størsteparten av perioden hvor jeg har jobbet med mastergradsprosjektet mitt, har jeg vært såpass heldig at jeg har fått disponere en

kontorplass ved Avdeling for Arktisk Biologi (AAB). Det har virkelig vært en berikelse, både sosialt og intellektuelt, og jeg skylder professor Lars Folkow og hele hans avdeling en stor takk. Tusen takk for alle sammenkomster jeg har fått ta del i og for at dere har tatt så godt vare på meg. Det beste ved mitt halvannet år lange opphold ved AAB, har nok vært å få et lite innblikk inn i arbeidshverdagen til en gruppe hardcore-fysiologer preget av høye vitenskapelige ambisjoner, idealer og prestasjoner. Dere setter standarden høyt og utgjør virkelig et eksempel til etterfølgelse.

En siste takk ønsker jeg å rette mine to aller kjæreste, min samboer Guro og vår sønn Sigvart. Takk for forståelsen for at jeg til tider har måttet være fraværende og ikke alltid har kunnet bidra med mitt! Guro, du er helt enestående. Takk for at du er den du er!

Til alle dere som arbeider med forskning og undervisning i academia, som skaffer til veie midler, planlegger, tilrettelegger for og veileder oss håpløse studenter, som utfører eksperimenter, analyserer, skriver, reviderer og publiserer: jeg ønsker med dette å uttrykke min beundring for det arbeidet dere gjør. År ut og år inn med et utrettelig pågangsmot får dere stadig nye brikker til å falle på plass i det store puslespillet.

Sammen drag

Hos fisk er det kjent at stress under tidlige livsstadier kan påvirke stressresponsen på senere livsstadier, men ikke kjent, og derfor testet i denne studien, hvorvidt stress påført under tidlige livsstadier vil kunne innvirke på laksesmoltens stressrespons, osmoregulatorisk kapasitet eller vekst. Fiskene som ble benyttet i dette forsøket besto av fire grupper som hadde blitt utsatt for ulik grad av stress gjennom gjentatte kuldesjokk og håndtering under sine tidlige livsstadier. Den ene gruppen hadde kun blitt stresset før klekking og den andre kun etter klekking. Den tredje hadde blitt stresset både før og etter klekking, og den siste fungerte som en kontrollgruppe og mottok derfor ingen stressbehandlinger under de tidlige livsstadiene. Samtlige grupper ble utsatt for den samme stressoren, en simulert transport, da de nådde smoltstadiet. Deretter fulgte en vekstperiode på 35 dager i sjøvann. Laksene ble målt, veid og tatt blodprøver av ved starten på, etter 18 dager og ved slutten av sjøvannsperioden. Plasmaet i blodprøvene ble analysert for å finne osmolalitet, kloridinnhold og kortisolkonsentrasjon. Det ble ikke på noe tidspunkt funnet forskjeller mellom behandlingsgruppene med hensyn til noen av disse blodparameterne. Det ble imidlertid funnet at gruppen som hadde mottatt stressbelastninger både før og etter klekking hadde vokst bedre enn gruppene som bare hadde mottatt én av delene, men ikke bedre enn kontrollgruppen, som på sin side kun hadde vokst bedre enn fisken som kun ble stresset etter klekking. Da effekten som kommer til syne ikke understøttes av resultatene for kortisolrespons og sjøvannstoleranse, så kan den bakenforliggende mekanismen ikke identifiseres med sikkerhet. Sammenligninger av den spesifikke vekstraten mellom gruppene antyder at den nevnte mekanismen har opphørt å utøve sin innvirkning på vekst under sjøvannsperioden, da denne var høyest for fisken som kun hadde blitt stresset etter klekking. At vekstraten til de to gruppene som ble stresset etter klekking var høyere enn hos de to som ikke ble stresset etter klekking, kan være en indikasjon på at laks som har mottatt gjentatte stressbelastninger etter klekking faktisk vokser bedre i perioden i etterkant av en hard stressbelastning (smolttransport), men dette kan like godt skyldes tilfeldig variasjon.

Nøkkelord: Atlantisk laks (*Salmo salar*), egg, yngel, smolt, stress, HPI-aksen, kortisol, kuldesjokk, smolttransport, vekst, sjøvannstoleranse.

Innhold

Innledning.....	1
Laksens biologi.....	1
Oppdrett av laks.....	3
Stress.....	5
Studiens hensikter.....	7
Materiale og metode.....	9
Forsøksmateriale og betingelser.....	9
Stamfisk og fasiliteter.....	9
Livsvilkår og røkting.....	9
Tidligere forsøk/undersøkelser i prosjektet.....	12
Gruppebehandling på tidlige livsstadier – utført av Nofima AS.....	12
Undersøkelser av smoltstatus.....	13
Forsøksoppsett.....	14
Gruppemerking og størrelsesregistrering.....	14
Felles transportstressbehandling – simulert smolttransport.....	14
Vekst i sjøvann.....	15
Prøvetaking.....	16
Avlivning.....	16
Blodprøver – Taking og etterbehandling.....	17
Registrering av vekt, lengde og kjønn.....	18
Plasmaanalyser.....	18
Osmolalitet.....	18
Kloridinnhold.....	19
Kortisolinnhold.....	19
Databehandling.....	24

Utregninger.....	24
Statistikk.....	24
Resultater.....	26
Stressforsøk – Simulert smolttransport	26
Vekt, lengde og kondisjonsfaktor ved forsøksstart	26
Kortisolinnhold i plasma	27
Vekstforsøk – Vekst etter utsett i sjøvann.....	29
Vekt	29
Lengde	29
Kondisjonsfaktor	30
Prosentvis daglig tilvekst – spesifikk vekstrate.....	31
Klorid og osmolalitet i plasma.....	32
Kortisolinnhold i plasma	33
Diskusjon.....	35
Stressforsøk	35
Vekstforsøk.....	36
Mulige epigenetiske effekter	37
Referanser.....	38
Vedlegg.....	42

Innledning

Laksens biologi

Den atlantiske laksen (*Salmo salar*) er en iteropar¹ anadrom² fisk i familien *Salmonidae*. Som navnet tilsier har den sitt naturlige utbredelsesområde i de nordlige delene av Atlanterhavet, samt i tilknyttede havbasseng, innsjøer og elver («Fishbase»). I vest strekker dette området seg fra Connecticut River i sør til Ungava Bay i nord. I øst er utbredelsen fra det nordlige Portugal i sør til de russiske elvene med utløp i Barentshavet og Kvitsjøen i nord (MacCrimmon & Gots 1979, Klemetsen *et al.* 2003). Arten er i nyere tid blitt introdusert til andre deler av verden med liknende klimatiske forhold, hovedsakelig gjennom akvakulturindustrien («FAO»).

Flertallet av de naturlige bestandene er anadrome. Det finnes noen «landlåste» bestander av atlantisk laks som har hele sin livssyklus i ferskvann, både i Nord-Amerika (Power 1958) og i Europa (Berg 1985). Dessuten er det i de anadrome bestandene en viss andel av hannene som ikke foretar beitevandring til sjø (før kjønnsmodning), men heller modner som parr og «sniker» seg til å gyte i konkurranse med de langt større anadrome hannene (Hutchings & Myers 1988).

I løpet av sommeren begynner kjønnsmoden laks å trekke fra havet og opp i elver og vassdrag hvor gytingen foregår den påfølgende høsten. De befruktete eggene begravnes i grus på elvebunnen og klekkes på sen vinteren. De nylig klekkede lakselarvene tar ikke til seg føde fra omgivelsene med det samme. I stedet vil de gjemme seg i bunnssubstratet og forbruker energien i en ventral utposning som kalles plommesekken. Dette skjer i påvente av at tarmkanalen skal utvikles ferdig. Plommesekken er karakteristisk for dette stadiet, og lakseungene kalles derfor for plommesekkyngel. Utover våren vil yngelen søke opp fra elvebunnen på jakt etter mat. I konkurransen om maten vil de utvikle en territoriell adferd, som særlig kjennetegner parrstadiet, hvor laksen også har fått karakteristiske laterale merker kalt parrmerker³. Laksen vil kunne være på dette stadiet i flere år, avhengig av vekstforholdene i elva. I et gitt tidsrom på ettersommeren, når fisken registrerer at daglengden blir kortere, vil det tas en avgjørelse på om prosessen med å klargjøre kroppen for utvandring til sjø den påfølgende våren skal igangsettes,

¹ Kan ha flere reproduksjonssykluser gjennom livet.

² Har beitevandring i sjøen, men gyter og tilbringer sine tidlige livsstadier i ferskvann.

³ Også kalt fingermerker.

Innledning

noe som gjøres med utgangspunkt i kroppens størrelse og tilgjengelige energireserver (Metcalf *et al.* 1988, Thorpe *et al.* 1998).

Prosessen med klargjøring for et liv i sjøvann kalles for smoltifisering. Dette er en pre-adapsjon som på forhånd vil klargjøre fisken for overgangen til et marint miljø (Boeuf 1993, McCormick *et al.* 1998b, Handeland *et al.* 2004). Selv om denne først igangsettes på høsten, vil den arresteres over vinteren og gjenopptas for fullt når daglengden øker utover våren. I dette tidsrommet på våren vil den fortsatt elvelevende fisken tydelig endre adferden sin samtidig som flere fysiologiske og morfologiske endringer finner sted. Den vil begynne å la seg drive med strømmen nedover elva og opptre i stim. Fisken vil få en mer langstrakt og strømlinjeformet kroppsform og et utseende som likner mer på det som er typisk for pelagiske arter. Parrmerkene vil forsvinne og erstattes av sølvblanke sider⁴ (McCormick & Saunders 1987). I gjellene vil kloridcellene, som gjennom transport av ioner sørger for en opprettholdelse av væske- og ionebalansen i kroppen, omstille seg fra et aktivt opptak av ioner fra det hypoosmotiske⁵ ferskvannet, til en aktiv utskillelse av ioner i de hyperosmotiske⁶ omgivelsene som sjøvannet utgjør (Handeland *et al.* 2000). I forbindelse med dette vil en økning i aktiviteten og antallet av natrium-kalium-pumper (Na^+/K^+ -ATPase-enzym) i gjellefilamentene kunne måles (Zaugg & Wagner 1973, McCormick *et al.* 2013). For at den utvandrende smolten skal være i stand til å takle den forhøyede konsentrasjonen av ioner som saliniteten i sjøvannet byr på, vil det også finne sted endringer i mage- og tarmsystemet (økt inntak og reabsorpsjon av væske), nyrene (reduert glomerulær filtrasjonsrate) og urinblæren (reduert reabsorpsjon av ioner) (McCormick & Saunders 1987). Dersom laksen blir hindret fra å foreta utvandringen til sjøen i løpet av et visst tidsrom⁷ hvor disse smolt-egenskapene viser seg tydeligst, vil prosessen reverseres⁸ og fisken vil returnere til en tilstand tilpasset et liv i elv (Lundqvist & Eriksson 1985). Styringen av smoltifiseringsprosessen er endokrint drevet (McCormick *et al.* 2007). En økning i mengden veksthormon⁹, somatomedin C¹⁰ og kortisol vil finne sted i plasma, noe som knyttes til regulering av endringene i smoltens osmoregulatoriske fysiologi. Trolig har også tyreoidhormoner en indirekte virkning på den osmoregulatoriske fysiologien, og er dessuten viktige for styringen av morfologi og adferd hos smolt (McCormick *et al.* 2007). Kortisol spiller

⁴ På engelsk kalles dette gjerne for «silvering».

⁵ Omgivelser med lavere konsentrasjon av osmotisk aktive partikler enn i kroppsvæskene til laksen.

⁶ Omgivelser med høyere konsentrasjon av osmotisk aktive partikler enn i kroppsvæskene til laksen.

⁷ Tidsrommet kalles gjerne for smolt-vinduet.

⁸ En reversering av smoltifiseringsprosessen kalles for desmoltifisering.

⁹ Forkortet GH (growth hormone)

¹⁰ Forkortet IGF-I (insulin-like growth factor I)

Innledning

flere roller under smoltifiseringen hos laks. Foruten å stimulere dannelsen av sjøvannstilpassede kloridceller, vil en kortisol-stimulert mobilisering av fett og proteiner og produksjon av energi i form av glukose bidra til å gjøre fisken slankere og mer strømlinjeformet. Dette vil gjøre laksen morfologisk bedre tilpasset en pelagisk tilværelse under beitevandring i havet (Winans & Nishioka 1987, Björnsson *et al.* 2011).

Oppdrett av laks

Atlantisk laks er i dag en av de mest betydningsfulle artene innen kommersiell akvakulturproduksjon, og utgjør sammen med produksjon av ørret en av de viktigste eksportnæringene i Norge (Andreassen & Robertsen 2014). Tall som Fiskeridirektoratet har utarbeidet for 2014 antyder at det ble slaktet mellom 1,2 og 1,3 millioner tonn laks i Norge til en verdi av over 41 milliarder kroner («Fiskeridirektoratet»).

Produksjonssyklusen til laks (før slakt) kan deles inn i tre ledd. Rognleverandørene driver med avl og leverer ferdig befruktet rogn. Settefiskprodusentene bruker denne rognen til å produsere fisk klar for utsett i sjø og holder følgelig laksen gjennom de ulike livsstadiene i ferskvann fram til den har blitt smolt (og i noen tilfeller postsmolt). Matfiskprodusentene holder fisken i merder i sjøen og fører laksen fram til den er stor nok til å slaktes, noe som gjerne er når vekta viser mellom tre og fem kilo («FKD» 2009).

En utbredt prosedyre blant rognleverandørene er å sjokke eggene om lag 320 døgngader etter befruktning. Dette innebærer en mekanisk eller fysisk stressbelastning, hvor målet er å få plommemassen til ubefruktede og svake egg til å koagulere. Normale befruktede egg vil ha nådd øyerognstadiet på dette tidspunktet og vil tåle en slik type belastning. Metoden kan derfor brukes som et ledd i kvalitetssortering av rogn. Tradisjonelt har rogn blitt sortert manuelt en viss tid etter en slik sjokking. En slik prosedyre vil nødvendigvis innebære en viss mekanisk belastning i form av håndtering og eventuelt i form av lufteksponering, og kan derfor ansees som en fysisk stressbelastning (AquaGen 2007). Lakserogna transporteres normalt fra rognleverandørene til settefiskprodusentene mens eggene fortsatt befinner seg på øyerognstadiet. Denne transporten kan ha en varighet på opptil flere dager, og sendes da nedkjølt på is.

Innledning

Tidspunktet for igangsettelse av smoltifisering styres av en indre «biologisk klokke». I naturen vil denne synkroniseres med sesongvariasjonene i omgivelsene, blant annet ved at endringer i daglengden¹¹ registreres, noe som er en pålitelig indikator for årstid (Eriksson & Lundqvist 1982). I oppdrettssammenheng kan denne mekanismen utnyttes til å påvirke tidspunktet som smoltifiseringen skjer på, og dermed både forkorte produksjonstiden og styre synkroniseringen av prosessen for ulike grupper av fisk. Dette gjøres gjennom å kombinere bruk av kunstig belysning og mørklegging, og kalles for lysstyring (Soivio *et al.* 1989, Sigholt *et al.* 1995). Lysregimene som benyttes i lysstyringen kan deles inn i to hovedkategorier etter antall timer lys per døgn; lang dag og kort dag. Lang dag (LD¹²) er et lysregime med mer enn 12 timer lys i døgnet, mens kort dag (SD¹³) er mindre enn 12 timer lys per døgn. I tillegg til lys er også temperatur en viktig tidsangiver som utøver en betydelig effekt på igangsettelsen av smoltifiseringen (McCormick *et al.* 2000). Før igangsettelse av SD gis fisken gjerne et «vintersignal» bestående av en periode (gjerne et par uker) med en gradvis reduksjon i daglengde og temperatur. Dette gjøres for å fortelle laksen at «vinteren» er i anmarsj, noe som både virker til å hindre for tidlig (spontan) smoltifisering og til å starte prosessen med å klargjøre fisken for smoltifisering ved «vinterens» slutt. Ved overgangen fra SD til LD benyttes en periode med gradvis økning i daglengde og temperatur, noe som vil gi fisken beskjed om at «sommeren» snart kommer og at det er på tide å starte smoltifiseringen. Denne induksjonen av smoltifiseringen er selvfølgelig en forutsetning for at fisken skal kunne overføres til sjøvann.

En utbredt måte å sjekke om laksen har fullført smoltifiseringa og er klar for utsett i sjø, er gjennom å måle evnen til å osmoregulere etter en viss tids eksponering for sjøvann med full styrke¹⁴. Først utsettes fisken¹⁵ for en sjøvannstest¹⁶. Det vanligste er 24 timer, men lengre perioder kan også benyttes. Deretter utføres osmometriske analyser av blodprøver fra denne fisken. Kloridtitrering, for å måle konsentrasjonen av kloridioner i plasma er trolig den vanligste, da dette er en enkel og relativt billig målemetode. Alternativt, eller som et supplement, kan den totale mengden aktive osmolytter (osmolalitet) i blodplasma måles ved hjelp av et osmometer. På bakgrunn av disse målingene gjøres det en vurdering av status på smoltifiseringsprosessen. Dersom laksen har klart å holde innholdet av aktive osmolytter i

¹¹ Dvs. endringer i den døgnmessige vekslingen mellom lys og mørke, også kalt fotoperiode.

¹² LD = long day

¹³ SD = short day

¹⁴ [NaCl] = 35 ‰

¹⁵ Dvs., gjerne et representativt utvalg av en større gruppe.

¹⁶ Eng.: Sea Water Challenge Test (SWCT)

blodet innenfor det som regnes som likevekts-intervallet (homeostase) ved opphold i sjøvann, regnes den som ferdig smoltifisert.

Stress

Stress har av Selye (1973) blitt definert som kroppens ikke-spesifikke respons på de krav som den stilles ovenfor. Disse «kravene» kan være hva som helst som truer kroppens homeostase og som krever en respons for å kunne opprettholde denne tilstanden. En stressor kan da defineres som den tingen eller situasjonen som utløser denne responsen. De fysiologiske responsene som igangsettes, uavhengig av type stressor, er det som kalles fysiologisk stress. Hvorvidt situasjonen som utløser reaksjonen er skadelig eller smertefull spiller altså ingen rolle. Den kan sågar være preget av lyst og velbehag. Graden av stress bestemmes utelukkende av hvor intenst behovet er for tilpasning til situasjonen. Denne ikke spesifikke måten å respondere på kalles gjerne også det generelle tilpasningssyndromet¹⁷ (Selye 1973).

Selye (1950) har identifisert tre stadier som syndromet utvikler seg over. Først vil stressoren utløse en alarmreaksjon hos organismen, et stadium som hos oss mennesker typisk vil kjennetegnes av økende grad av vevskatabolisme¹⁸, hypoglykemi¹⁹, erosjoner i mage- og tarmsystem (evt. avføring), frislipp av sekretoriske granuler fra binyrebarken og en økning i hematokritt²⁰. Deretter følger et stadium kalt resistensstadiet, som kjennetegnes av en stabilisering og eventuelt en reversering av kjennetegnene fra det første stadiet. Det tredje stadiet kalles for utmattelsesstadiet, hvor kjennetegnene fra det første stadiet dukker opp igjen. Et individ som utsettes for stress vil ha en viss kapasitet til å takle dette, men dersom stressoren vedvarer, så vil det før eller siden framtvinge seg en situasjon hvor stressresponsen vil bli maladaptiv. Da tjener den ikke lenger sin hensikt, men kan faktisk være skadelig og potensielt dødbringende for organismen. På bakgrunn av varigheten og hyppigheten den opptrer med, kan stress deles inn i to kategorier, akutt og kronisk stress. Sistnevnte alltid vil være av en maladaptiv karakter, mens førstnevnte ikke trenger å være skadelig, men godt kan opptre kun gjennom de to første stadiene. Kronisk stress vil dessuten kunne påvirke responsen på akutte stressorer, noe man også har fått bekreftet gjennom studier av atlantisk laks (Madaro *et al.* 2015).

¹⁷ The General Adaption Syndrome (GAS)

¹⁸ Nedbryting av vevet

¹⁹ For lavt blodsukker

²⁰ Mengden av røde blodlegemer i forhold til mengden av plasma

Innledning

Når en fisk utsettes for en stressor vil blant annet hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen²¹ (HPI-aksen) mobiliseres. Det første som skjer etter at hjernen har identifisert stressoren er at hypothalamus begynner å produsere kortikoliberin²², som i dette tilfellet vil virke som en signalsubstans i nervesystemet²³ og påvirke den relativt nærliggende hypofysen til å produsere proopiomelanokortin²⁴. Disse er en type peptider som vil dele seg og inngå i dannelsen av hormonet adrenokorticotropin²⁵, som vil fraktes med blodet og binde seg til spesielle melanokortinreseptorer i hodenyren. Når denne bindingen skjer vil produksjonen av kortisol i det interrenale vevet stimuleres. Kortisol er et hormon som hos fisk fungerer som en bredspektret signalgiver. Viktige mål er gjeller, lever og tarm, noe som gjenspeiler at hormonet står helt sentralt i reguleringen av to ting: energimetabolisme og osmolyttinnhold. At kortisol virker hemmende både på vekstrate, reproduksjonsinvesteringer og immunforsvaret kan sies å understreke rollen som stress-hormon (Bonga 1997, Barton 2002).

En økning i innholdet av kortisol i blodplasma er den oftest brukte indikatoren på om en fisk er stresset. Ved eksponering for en akutt stressor, vil fiskens plasmakortisolnivå som regel begynne å øke hurtig etter noen minutter. En tilbakevending til normale nivåer skjer gjerne ikke før etter én til flere timer (Bonga 1997). En vanlig måte å måle dette innholdet på, er ved bruk av radioimmuologisk analyse (RIA).

Gjennom livet i et oppdrettsanlegg vil fisken bli utsatt for mange ulike stressorer. Plutselige miljøendringer, forårsaket av for eksempel håndtering eller overføring fra ferskvann til saltvann, vil med sikkerhet kunne utøve en betydelig påvirkning på denne homeostasen. Gjentatt over tid vil slike stressorer kunne gi redusert tilvekst (McCormick *et al.* 1998a, Bernier & Peter 2001), noe som også vil kunne representere et økonomisk tap for oppdretter.

Mye tyder på at det hos fisk (slik som det er tilfelle hos pattedyr) kan oppstå endringer i genuttrykk som følge av påvirkninger fra omgivelsene, med påfølgende midlertidige eller varige endringer i fenotype, uten at modifikasjoner av den underliggende nukleotid-sekvensen

²¹ Interrenal = foregår inne i nyrene

²² Også kalt kortikoinfrigjørende faktor (CRF)

²³ Eng.: neurotransmitter

²⁴ Eng.: Pro-opiomelanocortin (POMC)

²⁵ Eng.: Adrenocorticotropic hormone (ACTH)

Innledning

har funnet sted. Studien av slike genuttrykksendringer kalles epigenetikk (Li & Leatherland 2013). I en nylig publisert studie, fant Tsalafouta *et al.* (2015) at europeisk havabbor som utsettes for gjentatte harde stressbelastninger i løpet av tidlige livsstadier vil kunne oppleve endret respons på stress og redusert tilvekst på senere stadier. Fra studier av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er det kjent at HPI-aksen ikke har utviklet seg nok til å respondere på stressbelastninger før siste halvdel av perioden mellom klekking og det tidspunktet hvor den er i stand til å ta til seg næring fra omgivelsene²⁶ (Barry *et al.* 1995). Fra samme art er det også kjent at stress påført på de tidlige stadiene, også før HPI-aksen er aktiv, vil kunne ha en innvirkning på stressresponsen som utøves på det juvenile stadiet²⁷. Egg kan bære med seg varierende mengder med kortisol avhengig av stressbelastningen som moren har vært påført under vitellogenese²⁸, noe som igjen vil kunne påvirke HPI-aksens responsevne på det juvenile stadiet (Auperin & Geslin 2008). Det er imidlertid ikke kjent om stress påført anadrome laksefisker på de tidlige livsstadiene vil kunne påvirke mobiliseringa av HPI-aksen under smoltifiseringen. Fra regnbueørret er det også kjent at høye kortisolnivåer i oocytene også vil kunne påvirke uttrykket av gener assosiert med vekst, og også på denne måten kunne påvirke veksten som finner sted på det juvenile stadiet (Li *et al.* 2010).

Studiens hensikter

Laksen som ble brukt i dette forsøket, besto av fire ulike grupper som hadde blitt overtatt fra et tidligere eksperiment. I dette tidligere eksperimentet hadde fisken i de ulike gruppene blitt påført ulike mengder stress i form av kuldesjokk og lufteksponering på tidlige livsstadier, både før og etter klekking (se Figur 1. og Tabell 2 i materiale- og metodedel for en oversikt over hvilke behandlinger de ulike gruppene mottok). I et senere forsøk med den samme fisken, før og under ferskvannsdelen av smoltifiseringen, ble det undersøkt hvorvidt de tidligere behandlingene hadde hatt en effekt på HPI-aksens integritet og med dette påvirket utviklingen av smoltegenskaper.

I dette påfølgende forsøket ble laksen, i det den hadde nådd smoltstadiet, utsatt for en behandling som etterliknet transporten fra et settefiskanlegg til et matfiskanlegg. Hensikten med dette var å finne ut av hvorvidt eventuelle epigenetiske effekter induert av

²⁶ I fiskeoppdrett: det tidspunktet hvor startfôringen vil igangsettes

²⁷ I tidsrommet mellom plommesekkylstadiet og parrstadiet

²⁸ Stadiet hvor plommen dannes når eggene fortsatt befinner seg i ovariene.

Innledning

stressbelastninger under tidlige livsstadier vil kunne påvirke stressrespons og osmoregulatorisk kapasitet hos ferdig smoltifisert laks. Gjennom et 35-dagers vekstforsøk i etterkant av transportstressbehandlingen, ble det også undersøkt om stress påført laks på tidlige livsstadier vil kunne ha innvirkning på vekst i etterkant av utsett i sjøvann.

Materiale og metode

Forsøksmateriale og betingelser

Stamfisk og fasiliteter

Fiskene som ble brukt i dette prosjektet var helsøsken av atlantisk laks (*Salmo salar* L.), som har gjennomgått flere generasjoner med avl hos en kommersiell stamfiskprodusent i Norge (AquaGen AS). Melke og rogn ble levert direkte fra produsenten. Begge individene (én hunnfisk og én hannfisk) var hentet fra en generasjon med konvensjonell oppdrettslaks. Eggene ble befruktet og inkubert ved HiT²⁹ sitt landanlegg på Ringvassøy i Troms, hvor alle enkelteksperimentene ble utført og fisken ble holdt fram til avlivning.

Livsvilkår og røkting

Helt fra befruktning av egg og fram til felles transportstressbehandling ble fisken holdt i ferskvann på gjennomstrømning. Det ble utført daglige kontroller av fiskens miljø av personalet på HiT, som også stod for selve røktinga av laksen gjennom hele livsløpet (fra 23. april 2013 til 25. april 2014).

²⁹ Havbruksstasjonen i Tromsø AS

Materiale og metode

Tabell 1. Oversikt over hvilke betingelser fisken i forsøket ble gitt på ulike livsstadier.

Simulert sesong	Startdato	Varighet	Oppholdstemperatur	Lysregime		Livsstadium i perioden	Stress-behandling
				Lys (t/døgn)	Mørke (t/døgn)		
Befruktning							
		250 døgngrader				Celledeling og gastrulasjon	-
		250 døgngrader				Embryogenese etter øyerognstadiet	5x kulde- og lufteksponering (gr.1 & gr.3)
Klekking							
	23. april 2013	9 døgn	7 °C	24	0	Plommesekk-yngel	3x kulde- og lufteksponering (gr.2 & gr.3)
Sommer	2. mai 2013	213 døgn	10 °C	24	0	Startfôring	-
«Høst»	1. des. 2013	7 døgn	Gradvis reduksjon: 10 → 7 °C	Gradvis reduksjon: 24 → 8 t lys/døgn		Igangsettelse av smoltifisering	-
Vinter	8. des. 2013	55 døgn	7 °C	8	16	Vinterdepresjon	-
«Vår»	1. feb. 2014	7 døgn	Gradvis økning: 7-10 °C	Gradvis økning: 8 → 24 t lys/døgn		Smoltifisering	-
Sommer	8. feb. 2014	40 døgn	10 °C	24	0	Smolt i ferskvann	-
Bedøvning, veiing og måling, gruppemerking og utsett i felles kar: 20. mars 2014							
Simulert smolttransport (21. mars: sjøvann 10 °C)							Salinitetsendring, bevegelse og trengsel (alle grupper)
Sommer	21. mars 2014	35 døgn	10 °C	24	0	Vekst i sjøvann	-
Eksperimentavslutning (fisk avlivet): 25. april 2014							

Materiale og metode

Fra klekking til startfôring (ni døgn) ble vanntemperaturen i bakkene og karene holdt på 7 °C. Fra og med overgang til startfôring og fram til en simulert høst (213 døgn) ble temperaturen økt til og holdt på 10 °C. Under simulert høst (7 døgn) ble temperaturen igjen senket til 7 °C, men denne gangen gradvis. Gjennom en påfølgende simulert vinter (55 døgn) ble fisken holdt på 7 °C. Deretter, under en simulert vår (7 døgn) ble vanntemperaturen igjen økt gradvis til 10 °C. Temperaturen nådde 10 °C ved overgangen til en simulert sommer. Gjennom denne siste simulerte sesongen i eksperimentet (75 døgn totalt) ble temperaturen holdt på 10 °C hele veien. Først sto laksen ytterligere 42 døgn i ferskvann. Etter dette ble det utført en felles stressbehandling (simulert smolttransport) i sjøvann (salinitet: 35 ‰). Til slutt ble fisken plassert i et felles kar, med samme salinitet som under «transporten», hvor den ble holdt fram til avlivning.

Gjennom hele livssyklusen har fisken vært holdt innendørs med kunstig belysning. Det ble brukt kontinuerlig lys fram til simulert høst, hvorpå daglengden ble redusert gradvis fram til den simulerte vinteren hvor laksen mottok åtte timer med lys per døgn. Etter dette, under den simulerte våren, ble den daglige dosen med lys økt gradvis fram til den simulerte sommeren hvor det igjen ble gitt kontinuerlig lys inntil avlivning (med unntak av under transportbehandlinga, hvor fisken ble holdt i lukkede beholdere).

Allerede før befruktningen av eggene ble det fortatt en inndeling i fire separate grupper, tre behandlingsgrupper og én kontrollgruppe. Hver av disse gruppene ble igjen inndelt i to paralleller. Alle disse ble holdt fysisk adskilt, fordelt på åtte kar, helt fram til dagen i forveien for den simulerte smolttransporten, hvor fisken ble bedøvet og gruppemerket. Etter merkingen ble all fisken samlet i ett felles kar, med unntak av de som skulle avlives (for prøvetaking) like i etterkant av transportbehandling.

Dødeligheten underveis i livsløpet ble registrert kar-vis. Denne overvåkingen ble utført av personalet på HiT. Alle karene hadde veldig lav dødelighet, også i etterkant av stressbehandlingene på egg- og yngelstadium.

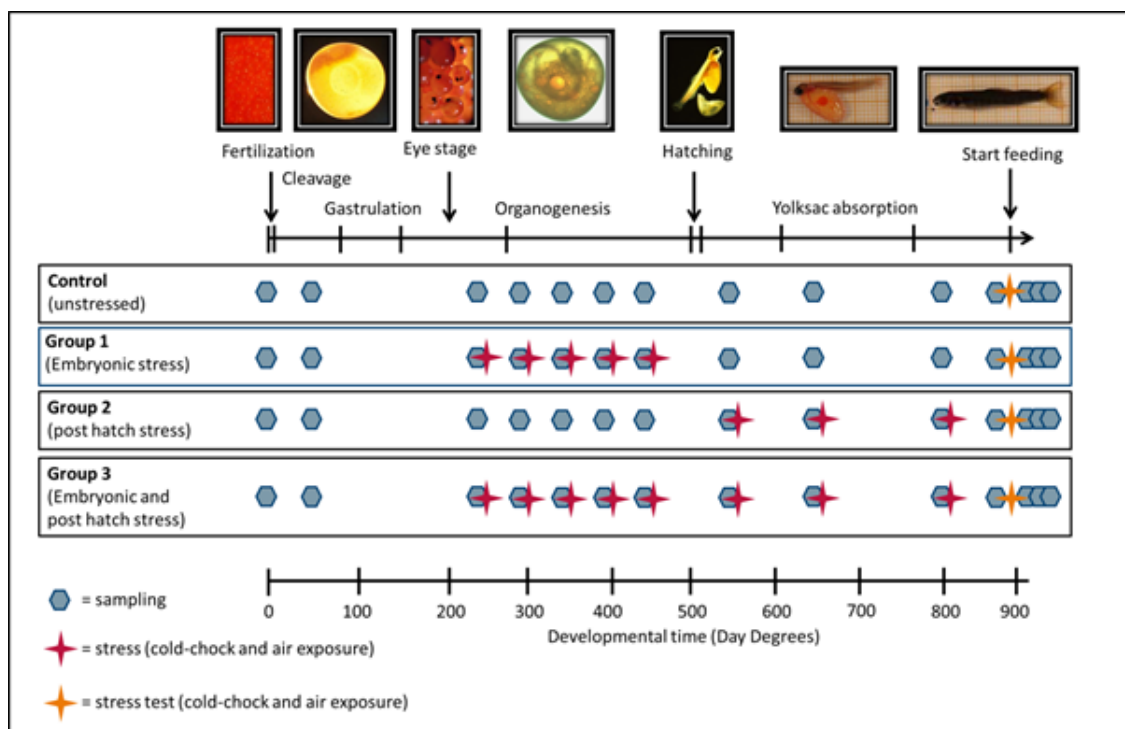
Alle kar ble fôret likt, med konvensjonelt tørrfôr (pellets) gitt i større doser enn hva fisken har klart å spise (overskuddsfôring). Frekvensen på utfôringsøktene fulgte konvensjonelle

fôringstabeller³⁰. Det ble fôret alle dager fra startfôring til avlivning, med unntak av en periode på tre dager (fra 19. til 21. mars 2014) i forbindelse med gruppemerking og transportstressbehandling.

Tidligere forsøk/undersøkelser i prosjektet

Gruppebehandling på tidlige livsstadier – utført av Nofima AS

Foranledningen for forsøket som er beskrevet i denne avhandlinga, var et prosjekt i regi av Nofima AS (med seniorforsker Helge Tveiten som prosjektleder). I forbindelse med en



Figur 1. Tidspunkter og livsstadier for stressbehandlinger på tidlige livsstadier. Figuren angir også tidspunkter for prøvetaking og stresstest i forbindelse med et (foreløpig) upublisert studie utført av Nofima AS. Fisken som er brukt til eksperimentene i denne avhandlinga, ble ikke utsatt for stresstesten. Gjengitt med tillatelse fra Helge Tveiten, Nofima AS.

epigenetisk studie av stress på tidlige livsstadier, ble de fire behandlingsgruppene stresset med kuldesjokk og lufteksponering på ulike tidspunkter. Gruppe 1 ble påført denne behandlingen fem ganger i løpet av de embryoniske stadiene av egg-utviklinga (ca. 200-500 døgngader etter befruktning). Gruppe 2 mottok stressbehandlinga tre ganger i løpet av plommeseekkyngelstadiet.

³⁰ Fra Skretting AS

Materiale og metode

Gruppe 3 ble utsatt for dette stresset både som egg (fem ganger) og som yngel (tre ganger). Kontrollgruppa ble ikke påført noen stressbehandling. Resultatene fra Nofima-prosjektet har i skrivende stund ikke blitt publisert i sin helhet (kun i form av «posters» og på konferanseforedrag). Imidlertid viser en foreløpig gjennomgang av datamaterialet en tydelig nedregulering av genuttrykket for melanokortinreseptor 2 (Mc2r) hos alle de tre gruppene som mottok stressbehandlinger (Gustavsen 2015).

Tabell 2. Dato, antall døgngrader etter befruktning og behandlingsgrupper.

Dato	Døgngrader	# stresseksposering	Gruppe
15.01.2013	248,1	Stress 1	1 & 3
22.01.2013	298,1	Stress 2	1 & 3
29.01.2013	345,8	Stress 3	1 & 3
05.02.2013	393,2	Stress 4	1 & 3
13.02.2013	448,6	Stress 5	1 & 3
26.02.2013	541,8	Stress 6 — 1. etter klekking	2 & 3
15.03.2013	660,8	Stress 7 — 2. etter klekking	2 & 3
05.04.2013	807,8	Stress 8 — 3. etter klekking	2 & 3

Undersøkelser av smoltstatus

På grunnlag av smoltegenskapsundersøkelser utført i forbindelse med et mastergradsprosjekt (Gustavsen 2015), med tilknytning til samme forskningsgruppe og overordnede prosjekt som mastergradsprosjektet denne avhandlinga omhandler, ble tidspunktet for når fisken var (fysiologisk sett) klar til å overføres fra ferskvann til saltvann fastsatt.

Forsøksoppsett

Gruppemerking og størrelsesregistrering

Bedøvning

Etter om lag 20 døgngader uten tilgang på fôr, ble laksesmolten bedøvet med en relativt mild dose³¹ benzocaine³². Dette ble gjort ved at de ble håvet gruppevis fra sine respektive kar og direkte over i en bøtte med 40 liter vann tilsatt bedøvelsesmiddelet.

Registrering av vekt og lengde før behandling

Når fisken var bedøvet, ble de tatt ut, lagt på en handduk og tørket vannet av forsiktig. Deretter ble de løftet enkeltvis over på en vekt³³ og veid. Oppå vekten var det også plassert et målebrett som ble brukt til å måle gaffellengden til smolten.

Merking

Da vekt og lengde hadde blitt registrert, ble fisken hurtig påført et gruppemerke ved hjelp av en tatoveringspistol. Blekket ble skutt fra pistolens munning, gjennom et glatt rør (L \approx 40 mm, Ø \approx 10 mm) hvis åpning ble holdt tett inntil fisken, og inn i skinnet dens. Det var plasseringen av de runde blekkmerkene fra apparatet på fiskenes buk som anga gruppetilhørigheten ved identifikasjon i forbindelse med senere prøvetakinger. Merkene holdt seg godt gjennom resten av forsøksperioden og fungerte utmerket til gruppeidentifikasjon. Overskuddsblekk ble etter påføring tørket varsomt av med en fuktig klut. Deretter ble fisken plassert i en bøtte med «friskt» vann og ført over for oppvåkning til et ferskvannskar som var felles for alle gruppene. Her ble det gjort et unntak for ti av fiskene fra hver gruppeparallel (80 tilfeldig utvalgte individer totalt), som ble plassert i et eget kar. Disse ble plukket ut for å gjøre prosessen, med uttak av 20 individer fra hver gruppe (ti fra hver parallel) i etterkant av den simulerte smolttransporten (dagen etter), enklere og hurtigere (for å minske tidsrommet mellom behandling og blodprøvetaking mest mulig).

Felles transportstressbehandling – simulert smolttransport

Dagen etter at fisken hadde blitt gruppemerket, ble samtlige smolt påført en felles stressbehandling som artet seg tilnærmet likt for alle individer. Denne besto av en simulert

³¹ 40 ppm (milliondeler)

³² Fra konsentrat av Benzoak®

³³ «Mettler IF Multi Range Scale»

Materiale og metode

smolttransport, med utgangspunkt i den belastningen som fisken vanligvis utsettes for i kommersiell lakseproduksjon. Stressbelastningen startet i det smolten ble håvet ut av det felles ferskvannskaret, over i en bølge med saltvann, flyttet en kort etappe og deretter håvet videre over i en transporttank med saltvann. De 80 individene som skulle avlives for prøvetaking etter behandlingen, ble på tilsvarende måte flyttet over fra sitt ferskvannskar og over i sin egen transporttank med saltvann. Alt vannet som ble brukt i forbindelse med stressbelastningen holdt samme temperatur som alt annet vann brukt i løpet av den siste simulerte sesongen (10 °C). De to transporttankene var plassert oppå planet på en tilhenger festet til en bil. Denne bilen ble brukt til å kjøre fisken rundt på en litt humpete gårds plass i intervaller på fem minutter. Mellom intervallene var det ett minutt pauser hvor bilen sto i ro. Slik som smolten i en brønnbåt, sto også fisken langt tettere i transporttankene enn i sine oppbevaringskar, men fikk kontinuerlig tilførsel av oksygen via et oksygen-nett tilkoblet en trykktank. Oppå tankene var det under «transporten» satt på lokk, slik at det var helt mørkt på innsiden. Etter den simulerte transporten ble fisken i det ene karet (200 stykker) tatt med hån over i en saltvannsbølge, flyttet en kort distanse og tømt direkte ut i et kar med saltvann for videre vekst. Stressbehandlingen var da avsluttet for denne fisken etter to timer og 35 minutters håndtering.

Vekst i sjøvann

Etter den simulerte transporten ble smolten plassert i et kar med saltvann, som en etterligning av utsett i sjømerder i kommersielle sammenhenger. Foruten at saliniteten hadde endret seg, og at fisken fra alle gruppene nå var samlet i et felles kar, var alle andre forhold tilnærmet de samme som tidligere. I dette karet ble laksen holdt i 35 dager før de ble avlivet.

Da det hadde gått 18 dager (180 døgngrader) etter utsett ble 90 individer tatt ut av karet og bedøvet, målt og veid. På dette tidspunktet hadde ni individer blitt fjernet fra karet (fem døde og fire skadede/tapere fjernet) av røkterne. De 90 laksene utgjorde et tilfeldig utvalg på om lag halvparten av individene i karet. Planen var å plassere disse tilbake i karet igjen for videre vekst etter registrering av vekt og lengde (med unntak for et mindre utvalg). Den resterende halvparten skulle også gjennomgå samme prosedyre i løpet av samme dag. Det var planlagt at det kun skulle avlives 40 fisk, med fem individer fra hver parallell (dvs. ti fra hver gruppe) denne dagen. Dessverre ble det ved en feiltakelse benyttet en for sterk dose med bedøvelse til de 90 individene som først ble hentet ut av karet, noe som medførte at samtlige, unntatt åtte individer, døde som følge av behandlingen. Disse åtte fiskene ble for ordens skyld også avlivet.

For å unngå risikoen med å miste den resterende halvparten av individene ut av det videre forsøket (ytterligere 17 dager med vekst), ble disse derfor ikke hentet ut av karet.

Av de 90 fiskene som ble tatt ut etter 18 dagers vekstfase i sjøvann, ble fem tilfeldig utvalgte individer fra hver gruppe (totalt 20 fisk, alle i hver gruppe tilhørende den samme parallellen) også tatt blodprøve av og registrert kjønn på.

Når det hadde gått 35 dager (350 døgngreder) etter utsett i sjøvann ble samtlige av de gjenlevende laksene (102 individer) i forsøket avlivet med en overdose³⁴ benzocaine, gruppe-identifisert, veid og lengdemålt. Ingen av fiskene i karet hadde dødd siden 18-dagersuttaket. I tillegg ble det tatt blodprøve av og registrert kjønn på fem tilfeldig utvalgte individer fra hver parallell (ti stykker fra hver gruppe, 40 stykker totalt).

Prøvetaking

Avlivning

Like etter stressbehandling

De 80 fiskene som det skulle tas blodprøver av direkte etter transportstressbehandlingen ble håvet fra transporttanken og over i en bønne tilsatt en dødelig dose benzocaine³⁵. I avlivningsbøtten sto de i omtrent fem minutter før de ble tatt blodprøve av. Dette ble gjort over flere omganger, med maksimalt ti individer i hver pulje, for å sikre at det ikke gikk for lang tid mellom avlivning og blodprøvetaking. For den enkelte fisk var tidspunktet for uttak til bedøvelse, og dermed også blodprøvetaking, tilfeldig (og derfor uavhengig av gruppetilhørighet).

Den første avlivningspuljen ble tatt ut av transporttanken 165 minutter etter at behandlingen startet. Den siste puljen ble håvet ut av tanken 205 minutter etter behandlingsstart (første kontakt med saltvann). Ved blodprøvetakingen av denne ble det oppdaget at ett av de 80 individene manglet.

³⁴ 160 ppm (milliondeler)

³⁵ 160 ppm (milliondeler)

18 døgn etter transportbehandling

Da det hadde gått 18 døgn etter transportbehandlingen ble 90 individer utslaktet utsatt for en overdose benzocaine under et forsøk på bedøvningsmiddel. 82 av disse fiskene døde, mens de åtte som overlevde dosen for ordens skyld ble avlivet med et slag mot hodet. Siden det ble brukt bedøvelsesmiddel til avlivning, lyktes det likevel, helt uten problemer, å få tatt blodprøve av et tilfeldig utvalg av disse individene.

35 døgn etter transportbehandling

Da det hadde gått 35 døgn etter den simulerte smolttransporten ble de siste 102 gjenlevende laksene avlivet på samme måte (og med samme dose) som ved uttaket like i etterkant av stressbehandlingen. Fisken ble håvet fra vekstkaret til avlivningsbøtten i puljer, hvorpå ti individer ble valgt ut for ytterligere undersøkelser (blodprøvetaking og kjønnsregistrering) etter et opphold på om lag fem minutter. Disse ble valgt ut på grunnlag av gruppetilhørighet (og eller mest mulig tilfeldig), på en slik måte at det hadde blitt hentet ut like mange fra hver parallell etter uttak fra alle puljene. De resterende individene i hver pulje ble stående i overdoseblandingen fram til etter at de ti fiskene hadde blitt tatt blodprøve av.

Blodprøver – Taking og etterbehandling

Til taking av blodprøver ble det brukt vakuumbor innsett med antikoagulerende middel (litium-hepariniserte Vacutainer®-rør (34 IU), 2 milliliter) og tilhørende engangsspisser som ble stukket inn i de kaudale blodårene. Blodprøverørene ble umiddelbart etter taking vendt et par ganger for å blande blod og heparin, og plassert i en beholder med is.

Når blodprøvetakingen hadde blitt fullført for alle individene i én avlivningspulje, ble blodplasmaet separert fra blodet, pipettert over i lukkede plastbeholdere og fryst ned (-80 grader celsius, for oppbevaring fram til videre analyser). Til separasjon ble det benyttet en sentrifuge (Sorvall RC 5B Plus) som spann blodprøvene med 5.000 omdreininger i minuttet i ti minutter. Under denne prosessen sørget maskinens kjølesystem for at temperaturen i rotasjonskammeret ble holdt like over frysepunktet.

Plasmaprøvene ble oppbevart på -80 °C i fire til fem måneder, fram til de de første laboratorieanalyser ble gjennomført (osmolalitet og kloridinnhold). Gjennom hele perioden med laboratorieanalyser, som varte i seks til syv måneder (kortisolanalyser ble utført over en

periode på fem til seks måneder), ble prøvene oppbevart på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ved uttak av prøver til laboratorieanalyser, ble prøvene tint opp like i forkant, oppbevart på is, og frosset ned igjen etter kort tid (maksimalt to-tre timer).

Registrering av vekt, lengde og kjønn

Vekt og lengde ble registrert ett døgn i forkant av stressbehandlingen. Disse resultatene er satt til å representere fiskens størrelse ved starten av perioden med vekst i sjøvann. Ved 18-dagersuttaket ble blodprøvene, på grunn av omstendighetene som oppsto i forbindelse med bedøvelsesoverdosen, tatt før veiing for å sikre et tilstrekkelig uttak av blod fra hvert individ. Av denne grunn er det i resultatene fra nevnte måling lagt til 1,5 gram på individvekten, da det ble tatt ut omtrent 1,5 milliliter blod fra hver fisk. Ved 35-dagersuttaket ble vekten registrert i forkant av blodprøvetaking. For de to uttakene i sjøvannsfasen ble vekt og lengde ellers registrert på samme vis som beskrevet for målingene i forkant av transportbehandlingen.

Plasmaanalyser

Analysene av osmolalitet og kloridinnhold ble gjennomført parallelt. Prøvene (med hele prøverøret), ble først tint og mikset (vortexet i minimum 15 sekunder). Etter at målingene var gjennomført ble prøvene fryst ned igjen for senere analyse av kortisol.

Osmolalitet

For å måle osmolalitet i blodplasma, ble det benyttet et frysepunktdepresjons-osmometer³⁶. Først ble 15 μl pipettert over i en engangstube (uten luftbobler). Denne ble så plassert i apparatets målekammer, som ble lukket, slik at proben (spissen) ble ført ned i plasmaprøven. Frysepunktdepresjonsmålingen ble så satt i gang. Resultatet, angitt i mOsm, ble lest direkte av maskinens skjerm. Proben ble rensert mellom hver analyse ved hjelp av en bomullspinne. Det ble, som kontroll, kjørt to paralleller for hver prøve. Ved avvik større enn $\pm 4\text{ mOsm}$ ble det foretatt ny måling. Inntil ni prøver ble analysert før instrumentet ble kontrollert ved hjelp av en standardløsning (290 mOsm, $\pm 2\text{ mOsm}$).

³⁶ Fiske® Associates, Model 110

Kloridinnhold

For å måle kloridinnholdet i blodprøvene, ble det benyttet en kloridtitrator³⁷. Et målebeger med nivåmerke (medfølgende instrumentet) ble først fylt med en bufferløsning³⁸. Dette ble så satt på en plattform som ble hevet til elektrodene. Deretter ble 40 µl standardløsning (100 mmol/l (MultiCal™: 140^{Na}/5^K/1,5^{Li}/100^{Cl}/2,5^{Ca})) tilsatt begeret og kondisjonering igangsatt. Når titeret var kondisjonert ble ytterligere 20 µl standard tilsatt begeret og titrering av denne standarden gjennomført for å kontrollere instrumentet. Deretter ble inntil ni plasmaprøver titeret før en ny kontroll med standardløsning ble utført. Resultatet ble avlest direkte fra apparatet, som automatisk regnet ut og anga kloridkonsentrasjonen i den tilsatte plasmaprøven, angitt i mmol/l. I forkant av kondisjoneringen, hadde programmet for 20 µl (et av to valgbare standardvolum) blitt valgt, slik at utregningen skulle bli korrekt. Det ble titeret minst to paralleller av hver prøve. Ved avvik større enn ±3 mmol/l mellom disse, ble ny(e) parallell(er) titeret. Ved gjentatte store parallellavvik, eller når instrumentets varselampe ga beskjed om det, ble bufferløsningen byttet, kondisjonert og kontrollert på nytt, samt at sølvvanodene (to staver) ble pusset rene med sølvpussemiddel. Av hensyn til oksidasjonen under oppbevaringen av utstyret, ble dette også gjort ved starten av alle dagene med kloridanalyser.

Kortisolinnhold

Kortisolinnholdet i blodplasmaprøvene ble målt ved bruk av radioimmunoassay (RIA) i henhold til (men med noen tilpasninger) en protokoll etablert av Schulz (1985). Denne framgangsmåten er validert av Frantzen *et al.* (2004) og Tveiten *et al.* (2010). Kortisolinnholdsanalysene ble utført ved Institutt for arktisk marin biologi (ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi) på Universitetet i Tromsø – Norges arktiske universitet.

Arbeidsløsninger

Alle arbeidsløsningene ble oppbevart i kjøleskap (~2°C) og holdt på is under bruk.

Bufferløsning

Det ble laget 1 liter i bufferløsning ved hver tilberedning. Etter tre til fire ukers oppbevaring, eller ved observert saltutskillelse i forbindelse med obligatorisk visuell sjekk før bruk, ble løsningen erstattet av en ny (også tilfelle for arbeidsløsningene tilsatt bufferløsning). Ved tillaging ble først 1,00 g gelatin løst opp i omtrent 200 ml oppvarmet destillert vann (dH₂O)

³⁷ Corning®, Chloride Analyzer 925

³⁸ Innhold i bufferløsning: CH₃COOH (<100 g/l), HNO₃ (9 g/l), løsningsmiddel, antikoaguleringsmiddel

Materiale og metode

under omrøring. Deretter ble 4,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 21,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ og 9,00 g NaCl løst i ca. 700 ml dH_2O i en egen beholder under omrøring. Innholdet i denne beholderen ble så tilsatt 1 ml Na-azid (5%-løsning i dH_2O), og deretter blandet sammen med gelatinløsningen i en ny beholder. Denne hadde en smal hals øverst med et 1-liters-merke, og fikk påfyll av dH_2O inntil løsningen var på nivå med merket.

Løsning med dextran-overtrukket aktivt kull (DCC)

Ved tillaging ble 1,00 g aktivt kull og 0,10 g dextran T70 tilsatt 100 ml av bufferløsningen. Deretter ble dette satt på omrøring med en magnetrører på lav hastighet i minst én time, mens beholderen var omgitt av is. Løsningen fikk en omrøring i 15 minutter på tilsvarende måte før hver bruk.

Tracerløsning

Tracer-løsningen ble laget med utgangspunkt i en lagringsløsning bestående av kortisol merket med tritium (^3H) fortynnet ca. 100 ganger i etanol (EtOH). Et gitt volum av lagerløsningen ble ytterligere fortynnet til en 10.000-gangers fortynning ved tilsetning av en utmålt mengde bufferløsning. Før tracer-løsningen ble tatt i bruk ble radioaktiviteten (β -stålinga) kontrollert i en scintillasjonsteller³⁹. Dette ble gjort ved at 50 μl av tracer-løsningen ble blandet med 600 μl bufferløsning i et tellerør (med lokk), og deretter tilsatt 7 ml tellervæske⁴⁰. Innholdet i tellerøret ble så vendt noen ganger med lokket på og satt til telling i 5 min (per rør). Dette ble gjort i to paralleller (dvs. med to tellerør). Dersom telleren viste 4500-5000 tellinger per minutt (CPM), ble løsningen brukt. Ved resultat utenfor dette området, ble løsningen enten ytterligere fortynnet eller tilsatt en tilmålt mengde lagerløsning. Ved resultatdifferanse mellom parallellene på mer enn 200 CPM ble kontrollen gjort om igjen med to nye paralleller.

Antistoffløsning

Antistoffløsninga (As) ble laget med utgangspunkt i en ferdigprodusert 10-gangers fortynning av antistoff (for kortisol) produsert i kanin. Et gitt volum av denne ble ytterligere fortynnet til en 10.000-gangers fortynning ved tilsetning av en utmålt mengde bufferløsning.

³⁹ Perkin Elmer Inc., Tri-CarB 2900TR

⁴⁰ Ultima Gold XR Scintillation Fluid

Standardkurvefortynninger

Til hver analyseomgang ble det laget en standardkurve. Denne ble laget med utgangspunkt i en ferdiglages lagringsløsning bestående av en kortisolstandardløsning løst i en gitt mengde EtOH ([kortisol] i lagringsløsning = 500 mg/ml). Til alle videre fortynninger ble den tillagede bufferløsningen benyttet. Før hvert nye ledd i arbeidet med tillaging av standardkurvefortynninger, ble den aktuelle løsningen mikset (med noen sekunder på en vortexer). Først ble et gitt volum av lagringsløsningen fortynnet 100 ganger, til en blanded-løsning med [kortisol] = 5.000 µg/ml. Av denne løsningen ble det så laget ni ulike fortynninger til å sette opp standardkurven med. Den første standardkurvefortynningen var en 125-gangers fortynning av blanded-løsningen, med [kortisol] = 40 µg/ml. Et gitt volum av denne ble så pipettert ut og blandet med en lik mengde bufferløsning, slik at kortisolkonsentrasjonen i den andre standardkurvefortynninga (20 mg/ml) var en halvering av den første. Det samme ble gjort med de påfølgende fortynningene, slik at konsentrasjonen i den neste var en halvering av den forrige. Deretter ble 50 µl av hver standardkurvefortynning tatt ut og blandet med lik mengde bufferløsning og analysert radioimmunologisk på samme måte som plasmaprøveekstraktene (fra og med det punktet i RIA-proseduren hvor prøven blandes med tracer). Resultatene fra β -tellinga ble lagt inn i et Excel-ark, hvor bindingsprosenten⁴¹ for hver enkelt fortynning ble beregnet. Standardkurven ble så satt opp ved at forholdet mellom bindingsprosent og [kortisol] ble plottet i en tabell og som en graf.

Intra- og interassayvariasjon

For å kunne kontrollere variasjonen mellom hvert enkelt assay (hver analyseomgang – interassayvariasjon), og variasjonen innad i et assay (mellom enkeltprøvene – intraassayvariasjon), ble det brukt en blanding av ekstraherte prøver fra en tidligere analyse av plasmakortisolinnhold hos laks. Samtlige prøveekstrakter hadde blitt fortynnet 30 ganger i RIA-buffer og deretter blitt oppbevart nedfrosset (-20°C) i et snaut år. Prøvene var rester av eterekstrakt hentet fra et utvalg fisk. Disse sammenslåtte prøvene⁴² ble behandlet på samme måte som prøvene fra forsøket i radioimmunoassayet. Det ble inkludert en PS i hver omgang (intra), og ti PS-er i én enkeltomgang. Resultatene fra β -tellinga av disse, ble brukt til å beregne variasjonskoeffisienten (CV) for både intra- og interassayvariasjonen.

⁴¹ Bindingsprosent = $\text{CPM}/\text{TC} \times 100\%$, hvor CPM = antall tellinger per minutt (Counts Per Minute) og TC = det totale antallet tellinger (Total Count)

⁴² PS = Pooled sample (en sammenblanding av prøver fra et utvalg)

Eter-ekstraksjon

I forkant av selve kortisolanalysen ble dietyleter (DEE) brukt til å ekstrahere steroidene fra plasma. All eter-ekstraksjon ble unnagjort før videre analyser av kortisolinnhold. Plasmaprøvene ble da tint, vortexet og ekstrahert, i omganger på rundt 15 prøver av gangen. De ekstraherte prøvene (ekstraktene) ble fryst ned igjen umiddelbart etter prosessen, og oppbevart på -20 °C i påvente av de radioimmunologiske analysene.

Framgangsmåten beskriver behandlingen av hver enkelt plasmaprøve. Først ble 150 µl pipettert over i et prøverør (dimensjon: 16x120 mm), som ble tilsatt fire ml DEE og satt kork på. Deretter ble røret beveget med små sirkulære bevegelser i en ristemaskin, i fire minutter, med en hastighet på 1200 omdreininger i minuttet. Da dette var gjort, ble korken tatt av og røret fikk stå i ro i tre minutter, før flytende nitrogen ble brukt til å fryse ut vannfasen i prøverøret. Dette ble gjort ved at røret ble holdt nedsenket i nitrogenet i ti sekunder. Deretter ble den fortsatt flytende DEE-fasen i røret, med de fettløselige steroide hormonene, dekantert over i et nytt prøverør (12x75 mm), mens den frosne vannfasen forble værende i det gamle røret. Da dette var gjort fikk røret stå i vannbad (~45°C) med lett omrøring i omtrent 20 minutter, for å dampe av eteren. For å sikre at røret kun inneholdt hormoner løst i fett, ble det blåst på med nitrogengass fra en slange tilkoblet en trykktank i noen sekunder, slik at eventuelle rester av DEE ble fordampet. Prøverøret ble så tilsatt 450 µl med bufferløsning (slik at det opprinnelige plasmavolumet ble fortynnet tre ganger), før blandingen ble homogenisert (hard vortexing/virvelblanding i minimum 15 sekunder). Etter det ble prøven plassert tilbake i vannbadet i ytterligere fem minutter, og mikset på samme vis på nytt, før overførsel til rør med lokk for nedfrysing.

Radioimmunologisk analyse

Alle arbeidsløsningene ble laget ferdig i forkant av analysen. Det viste seg at de fleste prøveekstraktene måtte fortynnes ytterligere for å kunne gi en sikker avlesning. Dette vil si at det tiltrengtes β -tellerresultater som samsvarte med det optimale området på standardkurven (området i midten av den negative sigmoide kurven hvor helningen var «brattest» og mest lineær). Dette ble definert som det området hvor standardkurvefortynningenes var mellom 13 og 30 %. Da kortisolkonsentrasjonen i prøveekstraktene ikke var kjent, måtte det totalt sett allokeres mange uker for å finne en konsentrasjon som passet for hver enkelt (denne variasjonen var relativt stor – med alt fra fra 3 til 480 gangers fortynning). Etter

Materiale og metode

fortynning av ekstraktene, ble disse, samt PS og standardkurvefortynningene pipettert over i prøverør og tilsatt tracer- og antistoffløsning (med volumer i henhold til

Tabell 3). For å måle totaltellingen (TC), den totale bindingen (TB) og den ikke-spesifikke bindingen i hvert enkelt assay, ble ulike volumer av buffer pipettert over i egne prøverør og tilsatt ulike mengder av tracer og antistoff (

Tabell 3). Samtlige av disse ble tillaget og analysert i to paralleller. Det ble analysert omtrent 30 prøver (inkludert PS) i hver omgang.

Tabell 3. Pipetteringsskjema: volumer (vist i μ l) og kombinasjoner av løsninger brukt i radioimmunoassay. TC = løsning for måling av det totale antallet tellinger inkludert fritt antigen (Total Count), TB = løsning for fullstendig binding av tracer til antistoff (Total Binding), NSB = Løsning for måling av ikke-spesifikk binding (Non-Specific Binding), verken fritt eller bundet antigen, dvs. «bakgrunnsstråling» fra radioaktivt merket antigen som kullet ikke har klart å filtrere ut.

	Buffer	Standard	Prøve	Tracer	Antistoff
TC	600	–	–	50	–
TB	100	–	–	50	200
NSB	300	–	–	50	–
Standardløsninger	50	50	–	50	200
Prøve + PS	–	–	100	50	200

TC-løsningen ble ikke blandet sammen i prøverør, men pipettert direkte over i tellerør. Da løsningene hadde blitt tilsatt (i henhold til

Tabell 3), ble de blandet ved lett manuell resting/omrøring og satt til inkubasjon i kjøleskap (2°C) i minst 16 timer. Prøverørene ble lagret med åpningen tett av sølvfolie, mens de tilhørende lokkene ble satt på de to TC-tellerørene. Etter inkubasjonen ble 300 μ l av DCC tilsatt hvert av prøverørene i hurtig tempo med en multipipette. Nøyaktig fem minutter etter at DCC var tilsatt det siste prøverøret, ble sentrifugering igangsatt (4.700 omdreininger i minuttet i fem minutter, 4°C). Umiddelbart etter sentrifugering ble innholdet i prøverørene dekantert over i

hvert sitt tellerør. Disse og TC-tellerørene ble så tilsatt syv milliliter av tellevæsken. Innholdet i tellerørene ble så homogenisert (vendt noen ganger med lokket på) og satt til telling i scintillasjonstellersen i fem minutter (per rør – ett rør av gangen). Etter telling ble prøveresultatene overført til et Excel-ark og kontrollert. Dersom differansen mellom to paralleller var større enn 200 CPM ble prøveresultatet forkastet og prøven analysert på nytt. Det samme ble gjort dersom bindingsprosenten til prøven var utenfor det definerte standardkurveintervallet.

Databehandling

Utregninger

Osmolalitet og kloridinnhold

I forbindelse med måling av osmolalitet og kloridinnhold, ble gjennomsnittet av de to plasmaprøveparallellverdiene med lavest differanse valgt til å representerte verdien for den aktuelle prøven. Dersom en prøveparallell hadde samme differanse til to andre målinger, ble gjennomsnittet av alle tre verdiene brukt som resultat.

Kortisolanalyser

Variasjonskoeffisienten, både for inter- og intraassayvariasjon, ble beregnet som standardavviket av gjennomsnittet av PS-ene dividert på gjennomsnittet av disse multiplisert med 100 %. Denne var 8,8 % for interassayvariasjonen og 8,4 % for intraassayvariasjonen.

Som mål på kortisolinnholdet i plasmaprøvene, ble gjennomsnittet av de to prøveparallellene som passet med standardkurven brukt. Resultatet for hver gruppe er representert som et gjennomsnitt av de respektive prøvene for de ulike måletidspunktene, med standard feil beregnet ut fra dette gjennomsnittet i Excel.

Statistikk

Samtlige statistiske beregninger ble gjort på PC ved bruk av statistikkprogrammet SYSTAT. Alle datasettene fra transportstressbehandlingen og fra vekstforsøket i sjøvann, med unntak av blodparametermålingene for dag 18 i vekstforsøket, ble hver for seg (alle dataene for et gitt

Materiale og metode

parameter på et gitt tidspunkt) først kjørt gjennom en variansanalyse⁴³, for å granske tilstedeværelsen av eventuelle signifikante forskjeller mellom gruppene. Normalfordelingen ble ikke testet, da metoden er særlig robust mot brudd på denne antakelsen dersom utvalgsstørrelsen er stor. Dersom det ble funnet en tilstedeværende signifikant effekt av minst én av behandlingene⁴⁴ på et bestemt parameter, ble det kjørt en post-hoc-test⁴⁵ for å kunne spesifisere hvilke (av to) behandlinger som på et gitt tidspunkt var signifikant forskjellige fra hverandre. Ved dag 18 i vekstforsøket er Kruskal-Wallis-tester benyttet, i stedet for vanlig variansanalyse, på alle blodparameter-dataene. Dette ble gjort på grunn av ulikt antall blodprøver fra hver gruppe.

⁴³ ANOVA (analysis of variance)

⁴⁴ Dvs. når forskjellen mellom minst to av gruppene er større enn hva en burde kunne forvente ved ren tilfeldighet. Metoden angir ikke hvilke(n) av gruppene (behandlingene) dette gjelder for.

⁴⁵ "Tukey's Honestly-Significant-Different Test"

Resultater

Stressforsøk – Simulert smolttransport

Vekt, lengde og kondisjonsfaktor ved forsøksstart

Det ble funnet en signifikant effekt av stressbehandling i tidlige livsstadier på både vekt [ANOVA: N=80, $F_{3,76}=5,144$, $P=0,003$] og lengde [ANOVA: N=80, $F_{3,76}=5,018$, $P=0,003$] i smoltstadiet. Like i forkant av transportstressbehandlingen var Gruppe 3, som hadde gjennomgått stressbehandling både før og etter klekking, signifikant større enn de tre andre behandlingsgruppene, både med hensyn til vekt [Tukey HSD: Gr.0; $P=0,015$, Gr.1; $P=0,004$, Gr. 2; $P=0,023$] og lengde [Tukey HSD: Gr.0; $P=0,016$, Gr.1; $P=0,004$, Gr. 2; $P=0,043$]. De fiskegruppene som enten ikke hadde mottatt noen behandling (Gruppe 0/ kontrollgruppa), hadde mottatt stressbehandlinger kun i forkant av klekkingen (Gruppe 1), eller hadde mottatt stressbehandlinger kun i etterkant av klekkingen (Gruppe 2), skilte seg størrelsesmessig ikke signifikant fra hverandre (hverken med hensyn til vekt eller lengde). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor⁴⁶ mellom noen av gruppene [ANOVA: N=80, $F_{3,76}=0,722$, $P=0,542$]. Tabell 5. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av de biometriske dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 2. (a, b og c) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Klorid og osmolalitet i plasma

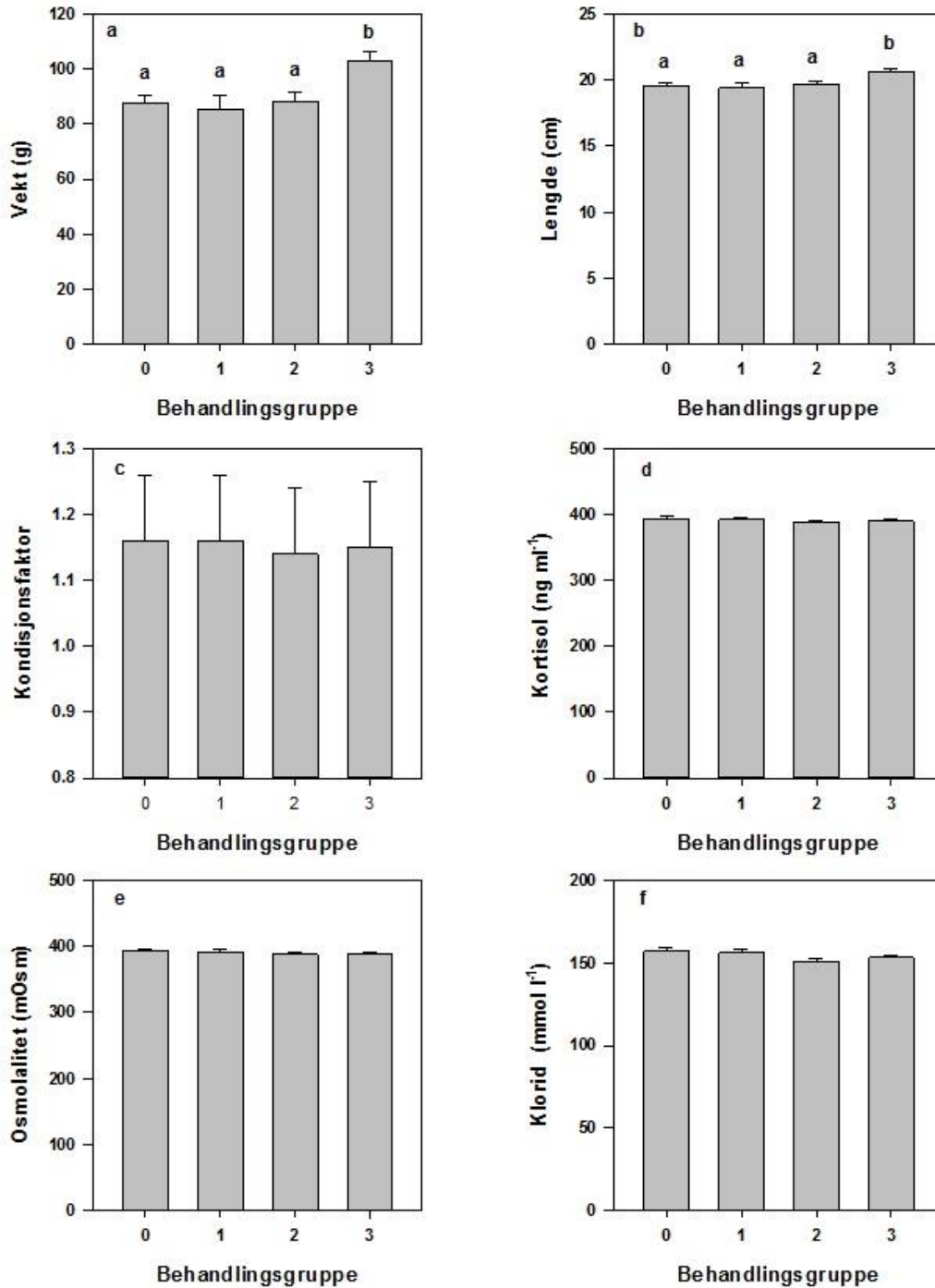
I blodprøvene tatt like i etterkant av transportstressbehandlingen, ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom noen av behandlingsgruppene, verken med hensyn til innholdet av klorid [ANOVA: N=79, $F_{3,75}=2,124$, $P=0,104$] eller osmolalitet [ANOVA: N=79, $F_{3,75}=0,625$, $P=0,601$]. Tabell 5. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 2. (e og f) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

⁴⁶ K-faktor = (vekt i gram / lengde i cm ³) * 100

Kortisolinnhold i plasma

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i plasmakortisolinnhold [ANOVA: $N=78$, $F_{3,74}=0,583$, $P=0,628$] mellom gruppene i etterkant av transportstressbehandlingen og heller ingen korrelasjon mellom plasmakortisolinnhold og lengden til individene i forsøket (se Figur 5. i vedlegg). Tabell 5. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 2. (d) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Resultater



Figur 2. **Transportstressforsøk**, gjennomsnittsverdier \pm standardfeil for de fire gruppene av laksesmolt som inngikk i forøket. Ulike bokstaver over hver kolonne angir grupper som er signifikant forskjellige ($P < 0,05$). (a) **Vekt** i gram. (b) **Lengde** i cm. (c) **Kondisjonsfaktor**. (d) **Kortisolkonsentrasjon** i plasma i ng/ml. (e) **Osmolalitet** i plasma i mOsm. (f) **Kloridinnhold** i plasma i mmol/l. Se Tabell 5. (vedlegg) for de ulike parameterens absoluttverdier.

Vekstforsøk – Vekst etter utsett i sjøvann

Vekt

Det ble funnet signifikante vektforskjeller mellom gruppene, både ved forsøkets start (dag 0) [ANOVA: $N=199$, $F_{3,195}=10,986$, $P<0,001$], etter 18 dager i sjøvann [ANOVA: $N=90$, $F_{3,86}=9,005$, $P<0,001$] og etter 35 dager i sjøvann [ANOVA: $N=102$, $F_{3,98}=3,570$, $P=0,017$]. Ved forsøkets start (like før utsett i sjøvann – dag 0) hadde gruppe 0 signifikant høyere vekt enn gruppe 2 [Tukey HSD: $P=0,001$], og signifikant lik vekt som de to andre behandlingsgruppene (gruppe 1 og gruppe 3). Etter 18 dager var dette mønsteret fortsatt gjeldende [Tukey HSD: Gr.2; $P<0,001$]. Etter 35 dager hadde også gruppe 2 oppnådd samme (signifikant lik) vekt som gruppe 0. Ved dag 0 hadde gruppe 1 signifikant lavere vekt enn gruppe 3 [Tukey HSD: $P<0,001$], og samme (signifikant lik) vekt som gruppe 0 og gruppe 2. Etter 18 dager i sjøvann veide gruppe 1 det samme (hadde signifikant lik vekt) som alle de andre gruppene. Etter 35 dager var den relative vekten til gruppe 1 (i forhold til de andre gruppene) igjen den samme som ved dag 0, da denne igjen var lavere enn gruppe 3 [Tukey HSD: $P=0,031$]. Ved dag 0 hadde gruppe 2 signifikant lavere vekt enn gruppe 0 [Tukey HSD: $P=0,001$] og gruppe 3 [Tukey HSD: $P<0,001$], og signifikant lik vekt som gruppe 1. Etter 18 dager var dette mønsteret fortsatt gjeldende [Tukey HSD: Gr.0; $P<0,001$, Gr.3; $P<0,001$]. Etter 35 dager i sjøvann hadde gruppe 2 fortsatt signifikant lavere vekt enn gruppe 3 [Tukey HSD: $P=0,033$], men signifikant lik vekt som både gruppe 0 og gruppe 1. Ved dag 0 hadde gruppe 3 samme (signifikant lik) vekt som gruppe 0, og signifikant høyere vekt enn gruppe 1 [Tukey HSD: $P<0,001$] og gruppe 2 [Tukey HSD: $P<0,001$]. Etter 18 dager veide gruppe 3 det samme (hadde signifikant lik vekt) som gruppe 0 og gruppe 1, men hadde fortsatt signifikant høyere vekt enn gruppe 2 [Tukey HSD: $P<0,001$]. Etter 35 dager var den relative vekta til gruppe 3 (i forhold til de andre gruppene) igjen den samme som ved dag 0 [Tukey HSD: Gr.1; $P=0,031$, Gr.2; $P=0,033$]. Tabell 6. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 3. (a) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Lengde

Det ble funnet signifikante forskjeller i kroppslengde mellom gruppene, både ved dag 0 [ANOVA: $N=199$, $F_{3,195}=9,513$, $P<0,001$], etter 18 dager i sjøvann [ANOVA: $N=90$, $F_{3,86}=4,526$, $P=0,005$] og etter 35 dager i sjøvann [ANOVA: $N=102$, $F_{3,98}=6,460$, $P<0,001$]. Kroppslengden til gruppe 0 var ved dag 0 signifikant høyere enn lengda til gruppe 2 [Tukey

Resultater

HSD: $P=0,008$], men signifikant lik lengden til gruppe 1 og gruppe 3. Etter 18 dager var dette lengdeforholdet fortsatt det samme [Tukey HSD: Gr.2; $P=0,018$]. Etter 35 dager i sjøvann var lengden til gruppe 0 signifikant lik lengden til samtlige av de tre andre fiskegruppene. Ved dag 0 var lengden til gruppe 1 signifikant lavere enn lengden til gruppe 3 [Tukey HSD: $P=0,001$], og signifikant lik lengden til gruppe 0 og gruppe 2. Etter 18 dager i sjøvann var lengden til gruppe 1 signifikant høyere enn lengden til gruppe 2 [Tukey HSD: $P<0,017$], og signifikant lik lengden til gruppe 0 og 3. Etter 35 dager i sjøvann var lengden til gruppe 1 signifikant lavere enn lengden til gruppe 3 [Tukey HSD: $P=0,003$], og signifikant lik lengden til gruppe 0 og gruppe 2 (samme mønster som ved dag 0). Ved dag 0 var lengden til gruppe 2 signifikant lavere enn lengden til gruppe 0 [Tukey HSD: $P=0,008$] og gruppe 3 [Tukey HSD: $P<0,001$], og signifikant lik lengden til gruppe 1. Etter 18 dager i sjøvann var lengden til gruppe 2 signifikant lavere enn lengden til samtlige av de andre gruppene [Tukey HSD: Gr.0; $P<0,018$, Gr.1; $P=0,017$, Gr.3; $P=0,031$]. Etter 35 dager i sjøvann var lengden til gruppe 2 signifikant lavere enn lengden til gruppe 3 [Tukey HSD: $P=0,001$], og signifikant lik lengden til gruppe 0 og gruppe 2. Ved dag 0 var lengden til gruppe 3 signifikant høyere enn lengden til gruppe 1 [Tukey HSD: $P=0,001$] og gruppe 2 [Tukey HSD: $P<0,001$], og signifikant lik lengden til gruppe 0. Etter 18 dager i sjøvann var lengden til gruppe 3 signifikant høyere enn lengden til gruppe 2 [Tukey HSD: $P=0,031$], og signifikant lik lengden til gruppe 0 og gruppe 1. Etter 35 dager i sjøvann var lengden til gruppe 3 signifikant høyere enn lengden til gruppe 1 [Tukey HSD: $P=0,003$] og gruppe 2 [Tukey HSD: $P=0,001$], og signifikant lik lengden til gruppe 0 (samme mønster som ved dag 0). Tabell 6. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 3. (b) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Kondisjonsfaktor

Det ble funnet signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor mellom gruppene like før overføring til sjøvann (dag 0) [ANOVA: $N=200$, $F_{3,196}=4,096$, $P=0,008$] og etter 18 dager i sjøvann [ANOVA: $N=90$, $F_{3,86}=2,899$, $P=0,040$]. Etter 35 dager i sjøvann hadde alle gruppene signifikant lik K-faktor [ANOVA: $N=102$, $F_{3,98}=0,434$, $P=0,729$]. Ved dag 0 hadde gruppe 0 en K-faktor signifikant høyere enn gruppe 1 [Tukey HSD: $P=0,027$] og gruppe 2 [Tukey HSD: $P=0,007$], og signifikant lik gruppe 3. Etter 18 dager i sjøvann hadde gruppe 0 en K-faktor signifikant høyere enn gruppe 1 [Tukey HSD: $P=0,047$], og signifikant lik gruppe 2 og gruppe 3. Både ved dag 0 og etter 18 dager i sjøvann hadde gruppe 1 en K-faktor signifikant lavere enn

Resultater

gruppe 0 [Tukey HSD: Dag 0; P=0,027, Dag 18; P=0,042], og signifikant lik gruppe 2 og gruppe 3. Ved dag 0 hadde gruppe 2 en K-faktor signifikant lavere enn gruppe 0 [Tukey HSD: P=0,007], og signifikant lik gruppe 1 og gruppe 3. Etter 18 dager i sjøvann hadde gruppe 2 en K-faktor signifikant lik samtlige av de andre gruppene. Gruppe 3 hadde en K-faktor signifikant lik alle de andre gruppene gjennom hele vekstforsøket. Tabell 6. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 3. (c) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Prosentvis daglig tilvekst – spesifikk vekstrate

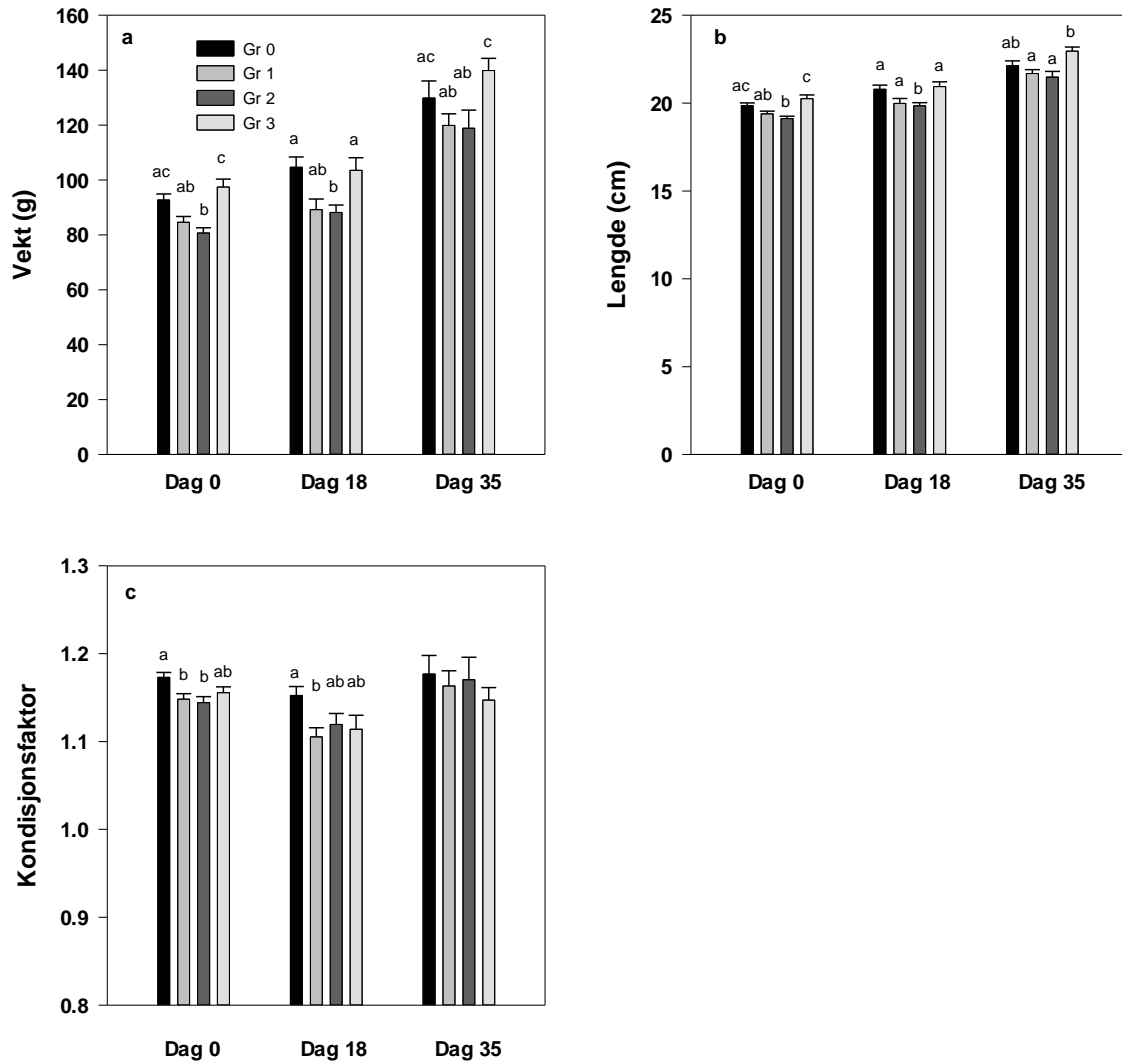
I de 35 dagene smolten sto i sjøvann (etter transportstressbehandlingen), hadde de ulike behandlingsgruppene følgende daglige tilvekst (spesifikk vekstrate⁴⁷, SGR): Gruppe 0 = 0,97 %, Gruppe 1 = 1,00 %, Gruppe 2 = 1,11 %, Gruppe 3 = 1,04 % (Tabell 4. Prosent tilvekst i de ulike behandlingsgruppene per dag i sjøvannsperioden (35 dager).). Variasjonen i dette tallmaterialet forblir ukjent, da individene i forsøket kun hadde blitt merket med gruppetilhørighet (ikke individmerket). Av denne grunn lar det seg heller ikke gjøre å beregne hvorvidt forskjellene i vekstrate mellom gruppene er statistisk signifikante eller ei.

Tabell 4. Prosent tilvekst i de ulike behandlingsgruppene per dag i sjøvannsperioden (35 dager).

Gruppe	0	1	2	3
Tilvekst	0,97 %	1,00 %	1,11 %	1,04 %

⁴⁷ Spesifikk vekstrate = $\left(\frac{\text{sluttvekt}}{\text{startvekt}}\right)^{\frac{1}{\text{antall dager}}} - 1 * 100 \%$

Resultater



Figur 3. Den gjennomsnittlige biometriske utviklingen \pm standardfeil til de fire gruppene av laksesmolt gjennom 35 dager (350 døgngrader) i sjøvann (35‰) etter felles transportstressbehandling. Ulike bokstaver over hver kolonne angir grupper som er signifikant forskjellige ved det aktuelle måletidspunktet ($P < 0,05$). (a) **Vekt** i gram ved forsøkets start, etter 18 dager og etter 35 dager. (b) **Lengde** i cm ved forsøkets start, etter 18 dager og etter 35 dager. (c) **Kondisjonsfaktor** ved forsøkets start, etter 18 dager og etter 35 dager. Se Tabell 6 (vedlegg) for de ulike parameternes absoluttverdier.

Klorid og osmolalitet i plasma

Alle de fire behandlingsgruppene hadde signifikant likt innhold av klorid i blodplasma, både etter 18 dager i sjøvann [Kruskal-Wallis: $H=0,955$, 3 d.f., $P=0,812$] og etter 35 dager i sjøvann [ANOVA: $N=40$, $F_{3,36}=1,200$, $P=0,324$]. Alle de fire behandlingsgruppene hadde signifikant lik osmolalitet i blodplasma, både etter 18 dager i sjøvann [Kruskal-Wallis: $H=2,362$, 3 d.f.,

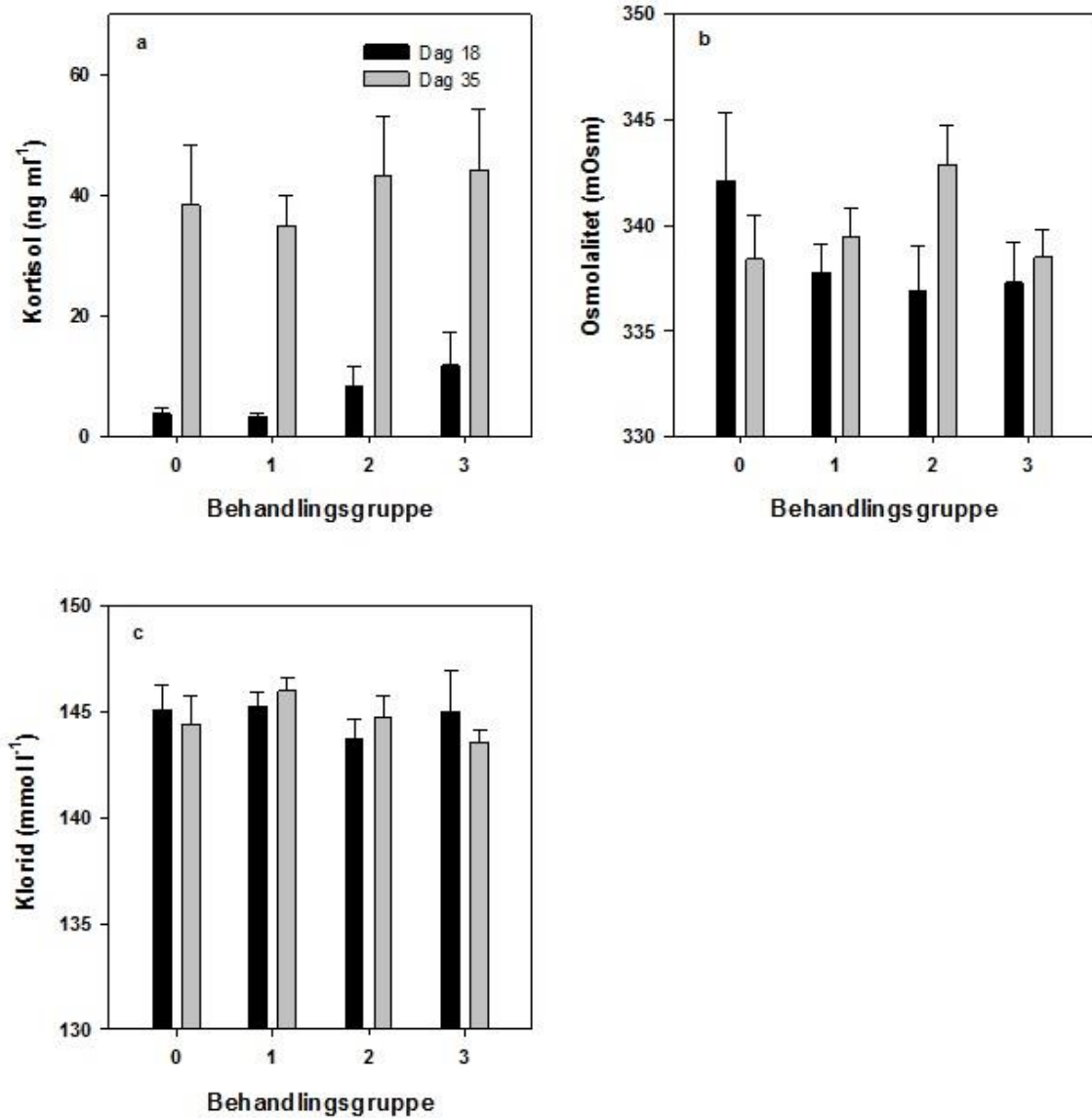
Resultater

P=0,501] og etter 35 dager i sjøvann [ANOVA: N=40, $F_{3,36}=1,669$, P=0,191]. Tabell 7. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 4. (b og c) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Kortisolinnhold i plasma

Alle de fire behandlingsgruppene hadde signifikant lik konsentrasjon av kortisol i blodplasma både etter 18 dager i sjøvann [Kruskal-Wallis: H=1,710, 3 d.f., P=0,635] og etter 35 dager i sjøvann [ANOVA: N=40, $F_{3,36}=0,232$, P=0,874]. Tabell 7. i vedlegg viser gjennomsnittene (\pm standardavvik) av dataene som ligger til grunn for disse resultatene, mens Figur 4. (a) viser en grafisk framstilling av de samme verdiene.

Resultater



Figur 4. Vekstforsøk: Gjennomsnitt \pm standardfeil av blodparametere for de fire gruppene av laksesmolt som inngikk i forsøket etter 18 og 35 dager (180 og 350 døgngader) i sjøvann (35%). (a) **Kortisolkonsentrasjon** i plasma i ng/ml. (b) **Osmolalitet** i plasma i mOsm. (c) **Kloridinnhold** i plasma i mmol/l. Se Tabell 7 (vedlegg) for de ulike parameterens absoluttverdier.

Diskusjon

Stressforsøk

Pickering (1993) har påpekt at kroniske stressorer vil kunne utøve negativ påvirkning på vekst hos fisk. Videre argumenterer han for at en redusert kortisolrespons vil kunne være en fordelaktig genetisk egenskap ved avl til kommersielt bruk, da dette vil kunne ha positiv innvirkning på vekst. Gruppen som hadde blitt utsatt for stress både før og etter klekking var større, både med hensyn til vekt og lengde, enn de andre gruppene ved forsøkets start. Kanskje kan det tenkes at stressinduserte forstyrrelser i HPI-aksens utvikling før denne er ferdig utviklet, vil kunne hemme mobiliseringa av aksene noe i de første påfølgende stadiene etter startføring, og med dette påvirke veksten positivt på de tidlige stadiene (Pickering 1993). En slik mekanisme vil kunne forklare hvorfor gruppe 3 var større ved forsøkets start. Noe som taler mot denne slutningen, er at kortisolresponsen av transportstressbelastninga var lik for alle gruppene. Det er imidlertid ikke sikkert at dette var tilfelle under yngel- og parrstadiene, og det kan derfor tenkes at en eventuelt tilstedeværende gruppevis forskjell i kortisolrespons vil ha kunnet jevnet seg ut underveis, kanskje som en epigenetisk respons på de homogene livsbetingelsene som gruppene har fått (Li & Leatherland 2013).

Det er ingenting som tyder på at de stressbelastningene som fisken ble påført under de tidlige livsstadiene har påvirket evnen til å respondere på en relativt hard stressbelastning under smoltstadiet. Det burde presiseres at det i dette tilfellet er snakk om akutt stress, og det ikke nødvendigvis ville vært tilfelle om fisken hadde blitt utsatt for en mer kronisk (maladaptiv) belastning (McCormick *et al.* 1998a). Det ser heller ikke ut til at det tidlige stresset har påvirket utviklingen av smoltegenskaper, noe som understøttes både av at den osmoregulatoriske kapasiteten i etterkant av den simulerte transporten var lik og av at kondisjonsfaktoren var lik for alle gruppene. Det er ikke dermed logisk gyldig å slutte at alt stress på de stadiene hvor HPI-aksen utvikles er uten betydning. Vi har i det minste med resultatene fra dette forsøket en sterk indikasjon på at stress som sjokkbehandlinger, håndtering og liknende, gitt i den grad som er normalt på de tidlige stadiene innen kommersiell akvakulturproduksjon, ikke vil ha noen betydning for evnen til å respondere på det stresset som den vil bli utsatt for idet den når smoltstadiet.

Vekstforsøk

Når det gjelder den gruppevisse størrelsesfordelingen, så er det ikke helt samsvar mellom målingene gjort ved stressforsøket og vekstforsøkets start, verken med hensyn til lengde, vekt eller kondisjonsfaktor. En mulig forklaring på dette kan være at forskjellene mellom forsøkene kan tilskrives forskjellen i utvalgsstørrelse. Mer konkret, så vil en eventuell tilstedeværende effekt av behandling kunne maskeres av en lav utvalgsstørrelse, noe som antakelig kan ha skjedd i stressforsøket. Da ingen av de biometriske trendene i vekstforsøket samsvarer med blodparametermålingene, kan verken forskjellen i vekst, lengde eller kondisjonsfaktor mellom gruppene forklares av osmoregulatorisk evne eller HPI-aksens mobilisering i perioden. Forklaringen må med andre ord ligge en annen plass. De tilstedeværende forskjellene ved periodens start har kanskje sammenheng med stressbehandlingene på de tidlige livsstadiene, men det virker da litt motstridende at både gruppe 0 og gruppe 4 har vokst bedre enn fisk som har vært stresset enten mer eller mindre. Det burde i alle fall utøves meget stor grad av forsiktighet om en skulle forsøke å konkludere med at enten lite eller mye stress på tidlige livsstadier gir bedre grunnlag for vekst enn noe midt imellom. For øvrig ser ikke størrelsesforskjellene ved dag 0 ut til å gjenspeiles av den spesifikke vekstraten i sjøvannsperioden. At vekstraten til de to gruppene som ble stresset etter klekking var høyere enn hos de to som ikke ble stresset etter klekking, kan isolert sett sees som en indikasjon på at laks som har mottatt gjentatte stressbelastninger etter klekking faktisk vokser bedre i perioden i etterkant av en hard stressbelastning (smolttransport), men dette kan like godt skyldes tilfeldig variasjon. Noe entydig bilde tegnes i alle fall ikke her, og det virker vanskelig å si noe sikkert om sammenhengen mellom stress under tidlige livsstadier og vekst etter utsett i sjøvann. Det som virker mest påfallende er at ukjente eksterne forhold kan ha virket ulikt inn på veksten i gruppene i livsstadiene før stressforsøket, på tross av bestrebelsene med å oppnå homogene livsbetingelser⁴⁸ og bruken av parallelle behandlingsgrupper.

Da samtlige blodparametere ble funnet like for alle gruppene, både etter 18 og 35 dager i sjøvann, kan det konkluderes med at stresset som ble påført under de tidlige livsstadiene, ikke hadde noen innvirkning på verken de basale kortisolnivåene eller på den osmoregulatoriske kapasiteten etter at smolten ble satt ut i sjø.

⁴⁸ Også kjent som kar-effekt.

Mulige epigenetiske effekter

Som nevnt i materiale- og metodedelen, så viser en foreløpig gjennomgang av datamaterialet som ble samlet inn i forbindelse forsøket som fisken ble overtatt fra, en tydelig nedregulering av genuttrykket for melanokortinreseptor 2 (Mc2r) hos alle de tre gruppene som mottok stressbehandlinger (Gustavsen 2015). Siden melanokortinreseptorer er direkte involvert i produksjonen av kortisol (Bonga 1997), kan dette indikere at HPI-aksen funksjonelt sett lar seg nedregulere genetisk som følge av stress gitt under tidlige livsstadier. En slik slutning må imidlertid brukes med stor varsomhet inntil de endelige resultatene og konklusjonene fra det aktuelle studiet foreligger. Gustavsen (2015) undersøkte de fire fiskegruppene i et oppfølgende studie i perioden før overføring til sjøvann, og konkluderte da med at de tidlige stressbelastningene hadde påvirket kortisolresponsen under smoltifiseringsprosessen, noe som kanskje antyder at nedreguleringen av genuttrykket for Mc2r har vart fram til da. Da denne effekten uteble i perioden etter smolttransporten, kan det tyde på at de eventuelle epigenetiske endringene som har funnet sted som følge av stressbelastningene før og etter klekking ikke har vedvart, og at de derfor ikke har vært av en permanent karakter. Det burde innvendes at det aktuelle genuttrykket ikke ble målt direkte, verken i dette eller Gustavsens (2015) forsøk, og at eventuelle slutninger omkring dette nødvendigvis vil være særdeles spekulative.

Referanser

Andreassen, O. & R. Robertsen (2014). "Nasjonale ringvirkninger av havbruksnæringen."

AquaGen (2007). Ny teknologi for kvalitetssortering av befruktet rogn tatt i bruk. Kunnskapsbrev Nr. 1 / 2007 - AquaGen AS. <http://aquagen.no/kategori/nyhetsbrev/aquagen-kunnskapsbrev/>.

Auperin, B. & M. Geslin (2008). "Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content." General and comparative endocrinology **158**(3): 234-239.

Barry, T. P., J. A. Malison, J. A. Held & J. J. Parrish (1995). "Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout." General and comparative endocrinology **97**(1): 57-65.

Barton, B. A. (2002). "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids." Integrative and comparative biology **42**(3): 517-525.

Berg, O. (1985). "The formation of non-anadromous populations of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Europe." Journal of Fish Biology **27**(6): 805-815.

Bernier, N. J. & R. E. Peter (2001). "The hypothalamic–pituitary–interrenal axis and the control of food intake in teleost fish." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **129**(2): 639-644.

Björnsson, B. T., S. O. Stefansson & S. D. McCormick (2011). "Environmental endocrinology of salmon smoltification." General and comparative endocrinology **170**(2): 290-298.

Boeuf, G. (1993). Salmonid smolting: a pre-adaptation to the oceanic environment. Fish ecophysiology, Springer: 105-135.

Bonga, S. W. (1997). "The stress response in fish." Physiological reviews **77**(3): 591-625.

Eriksson, L.-O. & H. Lundqvist (1982). "Circannual rhythms and photoperiod regulation of growth and smolting in Baltic salmon (*Salmo salar* L.)." Aquaculture **28**(1): 113-121.

«FAO» [WWW Dokument], lastet ned 26.06.2015 fra:
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en.

Referanser

«Fishbase» [WWW Dokument], Lastet ned 26.06.2015 fra:
<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=236&AT=Atlantic+salmon#>.

«Fiskeridirektoratet» [WWW Dokument], lastet ned 17.07.2015 fra:
<http://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Statistikk-for-akvakultur-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret> (sist oppdatert: 01.06.2015).

«FKD» (2009). Høringsnotat om transport av levende fisk. Fiskeri- og kystdepartementet.
<https://www.regjeringen.no/globalassets/upload/fkd/vedlegg/hoeringer/2009/transport-av-levende-fisk/hoerings-notat.pdf>

Frantzen, M., B. Damsgård, H. Tveiten, S. Moriyama, M. Iwata & H. Johnsen (2004). "Effects of fasting on temporal changes in plasma concentrations of sex steroids, growth hormone and insulin-like growth factor I, and reproductive investment in Arctic charr." Journal of fish biology **65**(6): 1526-1542.

Gustavsen, L. (2015). Effekter av embryonal stressbelastning på utvikling av smoltegenskaper hos Atlantisk laks (*Salmo salar*). Mastergradsoppgave, Universitet i Tromsø.

Handeland, S., Å. Berge, B. T. Björnsson, Ø. Lie & S. Stefansson (2000). "Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures." Aquaculture **181**(3): 377-396.

Handeland, S., E. Wilkinson, B. Sveinsbø, S. McCormick & S. Stefansson (2004). "Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon." Aquaculture **233**(1): 513-529.

Hutchings, J. & R. Myers (1988). "Mating success of alternative maturation phenotypes in male Atlantic salmon, *Salmo salar*." Oecologia **75**(2): 169-174.

Klemetsen, A., P. A. Amundsen, J. Dempson, B. Jonsson, N. Jonsson, M. O'connell & E. Mortensen (2003). "Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories." Ecology of freshwater fish **12**(1): 1-59.

Li, M., D. P. Bureau, W. A. King & J. F. Leatherland (2010). "The actions of in ovo cortisol on egg fertility, embryo development and the expression of growth-related genes in rainbow trout embryos, and the growth performance of juveniles." Molecular reproduction and development **77**(10): 922-931.

Li, M. & J. F. Leatherland (2013). "The implications for aquaculture practice of epigenomic programming of components of the endocrine system of teleostean embryos: lessons learned from mammalian studies." Fish and Fisheries **14**(4): 528-553.

Referanser

- Lundqvist, H. & L.-O. Eriksson (1985). "Annual rhythms of swimming behaviour and seawater adaptation in young Baltic salmon, *Salmo salar*, associated with smolting." Environmental biology of fishes **14**(4): 259-267.
- MacCrimmon, H. R. & B. L. Gots (1979). "World distribution of Atlantic salmon, *salmo solar*." Journal of the Fisheries Board of Canada **36**(4): 422-457.
- Madaro, A., R. Olsen, T. Kristiansen, L. Ebbesson, T. Nilsen, G. Flik & M. Gorissen (2015). "Stress in Atlantic salmon: response to unpredictable chronic stress." The Journal of experimental biology: jeb. 120535.
- McCormick, S. D. & R. L. Saunders (1987). Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. Am. Fish. Soc. Symp.
- McCormick, S., J. Shrimpton, J. Carey, M. O'dea, K. Sloan, S. Moriyama & B. T. Björnsson (1998a). "Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol." Aquaculture **168**(1): 221-235.
- McCormick, S. D., L. P. Hansen, T. P. Quinn & R. L. Saunders (1998b). "Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **55**(S1): 77-92.
- McCormick, S. D., S. Moriyama & B. T. Björnsson (2000). "Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **278**(5): R1352-R1361.
- McCormick, S. D., J. M. Shrimpton, S. Moriyama & B. T. Björnsson (2007). "Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: a possible developmental basis for smolting." Aquaculture **273**(2): 337-344.
- McCormick, S. D., A. M. Regish, A. K. Christensen & B. T. Björnsson (2013). "Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon." The Journal of experimental biology **216**(7): 1142-1151.
- Metcalfe, N., F. A. Huntingford & J. Thorpe (1988). "Feeding intensity, growth rates, and the establishment of life-history patterns in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar*." The Journal of Animal Ecology: 463-474.
- Pickering, A. (1993). "Growth and stress in fish production." Aquaculture **111**(1): 51-63.

Referanser

- Power, G. (1958). "The evolution of the freshwater races of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in eastern North America." Arctic: 86-92.
- Schulz, R. (1985). "Measurement of five androgens in the blood of immature and maturing male rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson)." Steroids **46**(2): 717-726.
- Selye, H. (1950). "Stress and the general adaptation syndrome." British medical journal **1**(4667): 1383.
- Selye, H. (1973). "The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones." American scientist: 692-699.
- Sigholt, T., M. Staurnes, H. J. Jakobsen & T. Åsgård (1995). "Effects of continuous light and short-day photoperiod on smolting, seawater survival and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Aquaculture **130**(4): 373-388.
- Soivio, A., M. Muona & E. Virtanen (1989). "Temperature and daylength as regulators of smolting in cultured Baltic salmon, *Salmo salar* L." Aquaculture **82**(1): 137-145.
- Thorpe, J. E., M. Mangel, N. B. Metcalfe & F. A. Huntingford (1998). "Modelling the proximate basis of salmonid life-history variation, with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L." Evolutionary Ecology **12**(5): 581-599.
- Tsalafouta, A., N. Papandroulakis & M. Pavlidis (2015). "Early life stress and effects at subsequent stages of development in European sea bass (*D. labrax*)." Aquaculture **436**: 27-33.
- Tveiten, H., P. Bjørn, H. Johnsen, B. Finstad & R. McKinley (2010). "Effects of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* on temporal changes in cortisol, sex steroids, growth and reproductive investment in Arctic charr *Salvelinus alpinus*." Journal of Fish Biology **76**(10): 2318-2341.
- Winans, G. A. & R. S. Nishioka (1987). "A multivariate description of change in body shape of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification." Aquaculture **66**(3): 235-245.
- Zaugg, W. S. & H. Wagner (1973). "Gill ATPase activity related to parr-smolt transformation and migration in steelhead trout (*Salmo gairdneri*): influence of photoperiod and temperature." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **45**(4): 955-965.

Vedlegg

Tabell 5. Data fra transportstressforsøket – brukt i Figur 2. N = antall prøver per gruppe. \bar{x} = aritmetisk gjennomsnitt. $SE_{\bar{x}}$ = standardfeilen av det aritmetiske gjennomsnittet.

TRANSPORTSTRESSFORSØK				
Parameter	Gruppe	N	\bar{x}	$SE_{\bar{x}}$
Vekt (gram)	0	20	87,7	2,70
	1	20	85,6	4,64
	2	20	88,5	2,96
	3	20	103,0	3,40
Lengde (cm)	0	20	19,6	0,19
	1	20	19,4	0,33
	2	20	19,7	0,24
	3	20	20,7	0,22
Kondisjonsfaktor	0	20	1,16	0,010
	1	20	1,15	0,011
	2	20	1,14	0,008
	3	20	1,16	0,005
Plasmakortisolinnhold (ng/ml)	0	20	198	12,8
	1	21	187	9,1
	2	19	215	14,0
	3	18	209	12,2
Plasmaosmolalitet (mOsm)	0	20	393	3,5
	1	21	392	3,2
	2	20	388	2,8
	3	18	390	2,6
Plasmakloridinnhold (mmol/l)	0	20	157	2,2
	1	21	156	2,3
	2	20	151	1,8
	3	18	153	1,3

Vedlegg

Tabell 6. Biometriske data fra vekstforsøket – brukt i Figur 3. N = antall prøver per gruppe. \bar{x} = aritmetisk gjennomsnitt. $SE_{\bar{x}}$ = standardfeilen av det aritmetiske gjennomsnittet.

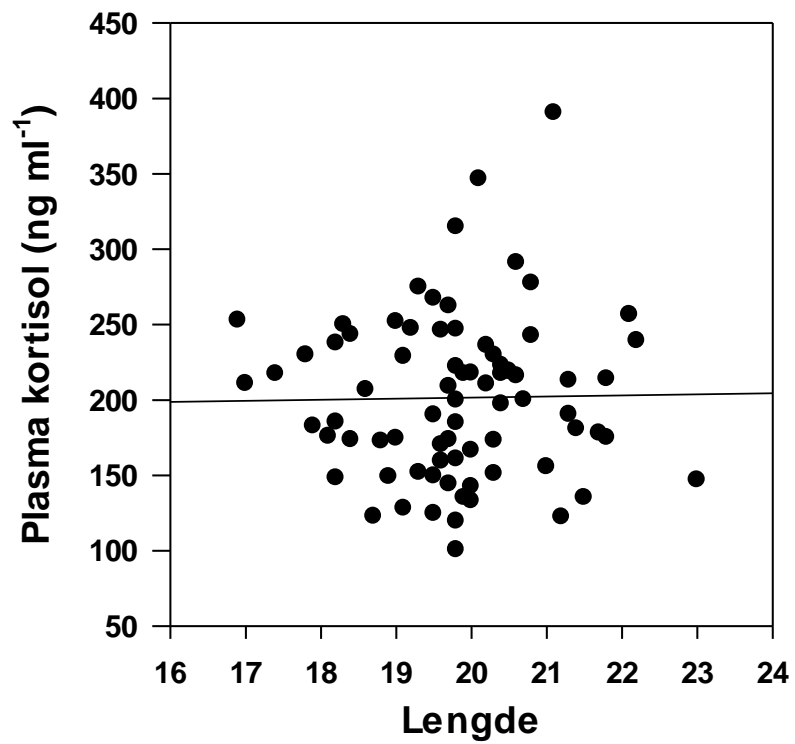
VEKSTFORSØK – BIOMETRI					
Parameter	Dag	Gruppe	N	\bar{x}	$SE_{\bar{x}}$
Vekt (gram)	0	0	50	92,7	2,19
	0	1	50	84,6	2,11
	0	2	50	80,7	1,88
	0	3	50	97,5	2,86
	18	0	25	104,7	3,72
	18	1	20	89,2	3,83
	18	2	25	88,2	2,70
	18	3	20	103,5	4,61
	35	0	23	129,9	6,24
	35	1	29	119,9	4,22
	35	2	23	118,9	6,61
	35	3	27	139,9	4,44
Lengde (cm)	0	0	50	19,9	0,15
	0	1	50	19,4	0,15
	0	2	50	19,1	0,14
	0	3	50	20,3	0,20
	18	0	25	20,8	0,23
	18	1	20	20,0	0,28
	18	2	25	19,8	0,18
	18	3	20	20,9	0,27
	35	0	23	22,1	0,28
	35	1	29	21,7	0,21
	35	2	23	21,5	0,32
	35	3	27	23,0	0,23
Kondisjonsfaktor	0	0	50	1,17	0,006
	0	1	50	1,15	0,006
	0	2	50	1,14	0,007
	0	3	50	1,16	0,007
	18	0	25	1,15	0,010
	18	1	20	1,11	0,010
	18	2	25	1,12	0,013
	18	3	20	1,11	0,016
	35	0	23	1,18	0,021
	35	1	29	1,16	0,017
	35	2	23	1,17	0,025
	35	3	27	1,15	0,014

Vedlegg

Tabell 7. Blodparameterdata fra vekstforsøket – brukt i Figur 4. N = antall prøver per gruppe. \bar{X} = aritmetisk gjennomsnitt. $SE_{\bar{x}}$ = standardfeilen av det aritmetiske gjennomsnittet.

VEKSTFORSØK – BLODPARAMETERE					
Parameter	Dag	Gruppe	N	\bar{X}	$SE_{\bar{x}}$
Plasmakortisolinnhold (ng/ml)	18	0	5	3,8	1,16
	18	1	5	3,5	0,50
	18	2	5	8,5	3,14
	18	3	5	11,8	5,53
	35	0	10	38,4	9,96
	35	1	10	35,0	5,01
	35	2	10	43,2	9,99
	35	3	10	44,3	9,85
Plasmaosmolalitet (mOsm)	18	0	5	342	3,2
	18	1	5	338	1,3
	18	2	5	337	2,1
	18	3	5	337	1,9
	35	0	10	338	2,1
	35	1	10	339	1,4
	35	2	10	343	1,8
	35	3	10	339	1,3
Plasmakloridinnhold (mmol/l)	18	0	5	145	1,2
	18	1	5	145	0,6
	18	2	5	144	0,9
	18	3	5	145	1,9
	35	0	10	144	1,4
	35	1	10	146	0,6
	35	2	10	145	1,0
	35	3	10	144	0,6

Vedlegg



Figur 5. Konsentrasjon av kortisol i plasma i etterkant av simulert smolttransport, plotta mot lengden, til samtlige laksesmoltindivider som inngikk i transportstressforsøket (N=78).