

# Bedøvelse ved ultra-lav temperatur

Faglig sluttrapport



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

### Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



#### Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



#### Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



#### Sunnalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



#### Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



#### Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

## Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 9/2022	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-711-2	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 31. mars 2022	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 16	<i>Prosjektnummer:</i> 13102
<i>Tittel:</i> <b>Bedøvelse ved ultra-lav temperatur – Faglig sluttrapport</b>		
<i>Title:</i> Ultra-low temperature stunning		
<i>Forfatter(e):</i> Svein Kristian Stormo, Anette Hustad og Torbjørn Tobiassen		
<i>Avdeling:</i> Sjømatindustri		
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901622		
<i>Stikkord:</i> Bedøvelse, velferd, ultra-kald lake, laks		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Hensikten med dette prosjektet var å teste og evaluere om ultra-kald temperatur (underkjølt saltlake) kan være en egnet metode for å bedøve fisk i forkant av slakting. I lakseindustrien brukes det i dag el-bedøving eller slag, og selv om begge metodene er effektive (virker raskt) så er feilprosenten såpass høy at optimalisering av gjeldende metoder eller vurdering av ny metode har blitt etterspurt. Saltlake kan underkjøles langt under vannets normale frysepunkt, og en mett NaCl-løsning kan teoretisk holdes flytende til -21 °C, men i praksis holdes stabil ved -18 °C. Eksperimenter i dette prosjektet viser at små laks (< 500g) roes ned svært raskt når de plasseres i en slik løsning. Håndteringen av fisken i forkant forårsaket noe stress og gav tydelige stressreaksjoner hos fisken. Denne responsen forsvant raskt etter at fisken ble plassert i den underkjølte laken. Det ble gjort observasjoner i en 30 sekunders periode der fisken var eksponert for denne behandlingen. Observasjonene viste at noen fisk ble slått ut (mistet likevekt og sluttet å bevege seg), mens majoriteten av fisken framstod som døsig med svake muskel- og gjellelokkbevegelser. Det er derimot ikke klart stadfestet om, og i hvilken grad fisken bedøves som følge av ultra-kald lake. Hvis fisken opplever umiddelbart ubehag av behandlingen, ville akutt fluktrespons være en forventet adferd. Fraværet av slike responser er en indikasjon på at fisken ikke opplever mye ubehag, noe som videre underbygges av målinger av stresshormoner. Nivået av kortisol ble forhøyet ved transport, men det ble ikke påvist noe forhøyning ved ultra-kald behandling i 30 sekunder. Siden dagens krav til hurtig bedøvelse av oppdrettsfisk er streng (virketid < 0,5 s), så vil bedøvelse ved ultra-lav temperatur foreløpig ikke være et alternativ for denne industrien. Det er derimot aspekter ved denne metoden som virker å være lovende, men det anbefales at videre dokumentasjon først og fremst rettes mot små individer (arter som sild, skalldyr) med sikte å kunne tilby bedøvelse for villfangst.		
<i>English summary/recommendation:</i> The purpose of this project was to test and evaluate if ultra-cold temperature (supercooled brine) can act as a method to stun fish prior to slaughtering. Today the salmon industry can choose between electrical stunning or a mechanical blow to the head. Both methods are fast, but the error rate can be high, and this has led to an increasing demand for optimization or new alternatives. Brines of salts can withstand the freezing temperature beyond waters normal freezing point. A saturated NaCl-brine can theoretically withstand freezing lower than -21 °C, but for practical purposes it is possible to keep such a brine at around -18 °C. Experiments on small salmon (< 500 g) show that the fish seemingly calm down when it enters supercooled brine. Handling prior to the treatment clearly induced a stress response, but this stress response seemed to be pacified shortly after entering the supercooled brine. This preliminary study show that a 30 s treatment might render the fish drowsy or totally inactive after a very short time, but whether the fish lose consciousness or how long this takes, is still unknown. If the fish experience stress by entering the brine, an acute escape response would be expected. This was not observed and furthermore, the stress hormone (cortisol) level was not elevated after ultra-cold treatment. The aquaculture industry operates under very strict demands, and stunning is to be carried into effect very rapidly (< 0.5 s). Ultra-cold temperature cannot meet this requirement, and thus, will not be an alternative to the salmon industry under these requirements. Nevertheless, some aspects of this sedation method seem to be very promising, and future work might benefit by focusing on wild caught species which are offered no sedation prior to slaughtering.		

## **Forord**

Dette arbeidet har blitt finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF-prosjekt nr. 901622).

## Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag (både på norsk og engelsk)</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>2</b>
2.1	Bakgrunn	2
2.2	Prosjektorganisering	3
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b>	<b>4</b>
3.1	Målsetting	4
3.2	Næringsnytte	4
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b>	<b>5</b>
4.1	Gjennomførte forsøk	5
4.1.1	Pre-studie og test av konsept	5
4.2	Metoder brukt i prosjektet	6
4.2.1	Lakebedøving (utstyr og metode)	6
4.2.2	VER/VOR (Visual Evoked Response/Vestibulo Ocular Reflex)	7
4.2.3	Blodanalyser	7
<b>5</b>	<b>Resultater, diskusjon og konklusjon</b>	<b>8</b>
5.1	Resultater og diskusjon	8
5.1.1	Test på død fisk	8
5.1.2	Pre-studie	8
5.1.3	Test av konsept	9
5.2	Anvendelse og nytteverdi	12
5.3	Konklusjon	13
<b>6</b>	<b>Hovedfunn</b>	<b>14</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser</b>	<b>15</b>
<b>8</b>	<b>Referanser</b>	<b>16</b>

## 1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Hensikten med dette prosjektet var å teste og evaluere om ultra-kald temperatur (underkjølt saltlake) kan være en egnet metode for å bedøve fisk i forkant av slakting. I lakseindustrien brukes det i dag el-bedøving eller slag, og selv om begge metodene er effektive (virker raskt) så er feilprosenten så pass høy at optimalisering av gjeldende metoder eller vurdering av ny metode har blitt etterspurt. Saltlake kan underkjøles langt under vannets normale frysepunkt, og en mettet NaCl-løsning kan teoretisk holdes flytende til  $-21\text{ °C}$ , men i praksis holdes stabil ved  $-18\text{ °C}$ . Eksperimenter i dette prosjektet viser at små laks ( $< 500\text{g}$ ) roes ned svært raskt når de plasseres i en slik løsning. Håndteringen av fisken i forkant forårsaket noe stress og gav tydelige stressreaksjoner hos fisken. Denne responsen forsvant raskt etter at fisken ble plassert i den underkjølte laken. Det ble gjort observasjoner i en 30 sekunders periode der fisken var eksponert for denne behandlingen. Observasjonene viste at noen fisk ble slått ut (mistet likevekt og sluttet å bevege seg), mens majoriteten av fisken framstod som døsig med svake muskel- og gjellelokkbevegelser. Det er derimot ikke klart stadfestet om, og i hvilken grad fisken bedøves som følge av ultra-kald lake. Hvis fisken opplever umiddelbart ubehag av behandlingen, ville akutt fluktrespons være en forventet adferd. Fraværet av slike responser er en indikasjon på at fisken ikke opplever mye ubehag, noe som videre underbygges av målinger av stresshormoner. Nivået av kortisol ble forhøyet ved transport, men det ble ikke påvist noe forhøyning ved ultra-kald behandling i 30 sekunder. Siden dagens krav til hurtig bedøvelse av oppdrettsfisk er streng (virketid  $< 0,5\text{ s}$ ), så vil bedøvelse ved ultra-lav temperatur foreløpig ikke være et alternativ for denne industrien. Det er derimot aspekter ved denne metoden som virker å være lovende, men det anbefales at videre dokumentasjon først og fremst rettes mot små individer (arter som sild, skaldyr) med sikte på å kunne tilby bedøvelse for villfangst.

The purpose of this project was to test and evaluate if ultra-cold temperature (supercooled brine) can act as a method to stun fish prior to slaughtering. Today the salmon industry can choose between electrical stunning or a mechanical blow to the head. Both methods are fast, but the error rate can be high, and this has led to an increasing demand for optimization or new alternatives. Brines of salts can withstand the freezing temperature beyond waters normal freezing point. A saturated NaCl-brine can theoretically withstand freezing lower than  $-21\text{ °C}$ , but for practical purposes it is possible to keep such a brine at around  $-18\text{ °C}$ . Experiments on small salmon ( $< 500\text{ g}$ ) show that the fish seemingly calm down when it enters supercooled brine. Handling prior to the treatment clearly induced a stress response, but this stress response seemed to be pacified shortly after entering the supercooled brine. This preliminary study show that a 30 s treatment might render the fish drowsy or totally inactive after a very short time, but whether the fish lose consciousness or how long this takes, is still unknown. If the fish experience stress by entering the brine, an acute escape response would be expected. This was not observed and furthermore, the stress hormone (cortisol) level was not elevated after ultra-cold treatment. The aquaculture industry operates under very strict demands, and stunning is to be carried into effect very rapidly ( $< 0.5\text{ s}$ ). Ultra-cold temperature cannot meet this requirement, and thus, will not be an alternative to the salmon industry under these requirements. Nevertheless, some aspects of this sedation method seem to be very promising, and future work might benefit by focusing on wild caught species which are offered no sedation prior to slaughtering.

## 2 Innledning

### 2.1 Bakgrunn

Utviklingen i norsk havbruksnæring har i perioden 2000–2019 vært preget av stor vekst i mengde slaktet matfisk av laks, fra cirka 440 000 tonn i 2000 til cirka 1 300 000 tonn i 2019. Slaktevolumet i enkelte slakteri har også økt fra cirka 20–30 tonn per dag i 2000, til cirka 200–400 tonn per dag i 2019. I samme periode har et større fokus på fiskevelferd samt lovendringer fra staten bidratt til endringer i metoder for bedøving og avlivning av oppdrettsfisk. Håndtering av levende fisk i forbindelse med slakteprosessen vil alltid forårsake en viss stressrespons hos fisk. Derfor er det viktig å søke etter løsninger som vil gjøre slakteprosessen så skånsom som mulig, både med hensyn til fiskevelferden og produktkvaliteten. Den mest brukte metoden for å håndtere villfisk før bløgging er å eksponere fisken for luft fram til de roer seg ned eller dør. Andre metoder som har vært benyttet er kjøling (is og vann), CO<sub>2</sub>-bedøving, slag mot hode og strømbedøving. Hver enkelt metode har sine utfordringer, både med tanke på fiskevelferd og produktkvalitet. Det er også dokumentert at det kan være stor variasjon i om fisken faktisk blir bedøvet eller ikke, alt etter hvilke metode som benyttes og fiskeart (Poli *et al.*, 2005).

Under slakting av oppdrettsfisk er det i dag krav til at bedrifter skal ha nødvendig kompetanse på fiskevelferd slik at fiskevelferden under slakting av oppdrettsfisk skal ivaretas. Etisk forsvarlige bedøvnings- og avlivingsmetoder for fisk innebærer øyeblikkelig død eller bevissthetstap som varer inntil fisken er bløgget og deretter dør som følge av blodtapet. Fisken skal være bedøvet slik at den ikke opplever smerte, frykt eller vesentlig ubehag i fasen inntil den er bevisstløs og dør. For å bedømme om fisken er bedøvet eller bevisstløs, kan man se om fisken har spontane egeninitierte bevegelser, responderer på berøring/stimuli og viser tilstedeværelse av reflekser. En fisk som viser koordinerte egeninitierte bevegelser og som reagerer på ytre stimuli er ikke bedøvet eller bevisstløs. Andre reflekser som gjellelokkbevegelser, øyerulling eller vestibulo-okulær refleks (dvs. at øynene stiller seg etter horisontalplanet når fisken vugges fra side til side), kan indikere om fisken er bevisstløs eller ikke. Det er også mulig at fisken er bevisst, selv om disse refleksene ikke er til stede. Under kjøling av levende fisk er det kjent at bevegelser og reflekser hos fisk kan svekkes på grunn av nedkjølingen. Det vil si at fisken ikke nødvendigvis er bedøvet eller bevisstløs av kjølingen, selv om de mangler både bevegelse, reflekser og respons på ytre stimuli (Mattilsynet, 2014).

Etter Mattilsynets forbud mot bruk av CO<sub>2</sub>-bedøving i 2012, har utviklingen gått i retning av to ulike bedøvningsmetoder for oppdrettsfisk, enten strømbasert bedøving eller slag mot hode (Midling *et al.*, 2008; Lambooi *et al.*, 2010; Tobiassen *et al.*, 2012; Grimsbø *et al.*, 2016; Roth, 2018). Begge metodene har vært optimalisert de senere årene og er godkjent av Mattilsynet (Mattilsynet, 2014), men det er fortsatt utfordringer ved bruk av disse. Ved bruk av automatisert slagmaskin kan feilslag og mangelfull bløgging oppstå, noe som skjer hyppigere hvis størrelsesvariasjon på fisken er stor. Feilslag og feil bløggestikk går på bekostning av både fiskevelferd og utblødning, og bidrar til merarbeid. Elektrisk bedøving er også en godt dokumentert metode, men den kan forårsake ryggknekk og blødninger i muskulaturen (Tobiassen *et al.*, 2012). Felles for begge metodene er at feilprosenten kan variere betydelig og kostnadene dette medfører, både økonomisk og velferdsmessig, gjør det hensiktsmessig å vurdere alternative løsninger.

## **2.2 Prosjektorganisering**

### **Prosjektleder (tilsagnsmottaker/ansvarlig organisasjon):**

- Nofima AS v/Svein Kristian Stormo

### **Prosjektgruppe:**

- Nofima AS v/Sven Kristian Stormo, Anette Hustad og Torbjørn Tobiassen

### **Styringsgruppe:**

- Kurt Olav Oppedal (Mowi)
- Ivar Helge Melingen (Austevoll Laksepakkeri)
- Knut Roger Sivertsen (Hardanger Fiskeforedling)



## 3 Problemstilling og formål

### 3.1 Målsetting

Hensikten med prosjektet er å teste ut og evaluere underkjølt væske som metode for å bedøve fisk. Hypotesen for å bruke underkjølt væske er at denne behandlingen raskt vil kjøle blodet som går fra gjellene og videre opp til fiskens hjerne. Sammen med den ytre nedkjøling av hjernen vil dette bidra til et sjokk som raskt medfører tap av bevissthet. En kort periode med slik behandling vil mest sannsynlig ikke stoppe hjertet og dermed ikke hemme utblødning etter bløgging. Nedkjøling av fisk kan føre til redusert utblødning, men ved denne behandlingen vil kulden ikke rekke å kjøle ned store deler av det sirkulatoriske systemet før fisken overføres til utblødningskar hvor et eventuelt tynt frossent ytre lag vil tine raskt. Denne behandlingen vil også være en effektiv start på nedkjøling av fisken, noe som er avgjørende for påfølgende kvalitet og holdbarhet.

Det ble i utgangspunktet satt følgende mål for prosjektet:

#### Hovedmål

Målsettingen med prosjektet er å teste ultra-lav temperatur som metode for å bedøve oppdrettsfisk (laks og ørret) og dokumentere hvorvidt denne metoden ivaretar kravene som stilles til velferd og effektivitet.

#### Delmål

Gjøre tilsvarende vurderinger for rensefisk slik at metoden potensielt kan benyttes til både bedøvelse og avliving av mindre fiskearter.

Siden det var svært vanskelig å få tillatelse til å gjennomføre forsøk (av Mattilsynet) ble hovedfokuset etter hvert rettet mot å teste metoden på små fisk.

### 3.2 Næringsnytte

Hvis metoden fungerer som bedøvelse for stor oppdrettsfisk så vil implementeringen i forkant av avlivning (bløgging) være enkelt sett fra et teknisk ståsted. Moderne kjøleteknologi i kombinasjon med underkjølt væske vil sannsynligvis enkelt kunne tilfredsstille krav til effektivitet for dagens slaktelinje. I tillegg til å kunne brukes i oppdrettsnæringen (laks/ørret + rensefisk) så kunne denne metoden være et alternativ for bedøving av hvitfisk og pelagiske arter. Ved å utvide varigheten av ultra-kjøling så vil dette føre til avliving av fisken, og for små arter vil det skje raskt, og vil kunne være et reelt alternativ for å øke velferden ved avliving av små fisk. Ved å utvide varigheten ytterligere så vil det være mulig å slå sammen bedøvelse, avliving og innfrysing i en felles og effektiv prosess. For pelagiske arter kan dette være interessant siden innfrysing av små fisk skjer veldig raskt i et underkjølt medium (nært -20 °C).

## 4 Prosjektgjennomføring

### 4.1 Gjennomførte forsøk

#### 4.1.1 Pre-studie og test av konsept

Det var i utgangspunktet planlagt både en pre-studie der konseptet først skulle vurderes, og deretter et forsøk med slakteklar laks der det skulle gjøres kvalitetsvurderinger i tillegg til velferdsmessige vurderinger. Forsøk som involverer bruk av levende dyr krever søknad og godkjenning av FOTS (forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem). Vår søknad til gjennomføring ble avslått, og etter klage på dette avslaget ble det kun gitt tillatelse til å gjøre forsøk på tre fisk i den første pre-studien. En ytterligere begrensning fra opprinnelig oppsett i søknaden var at behandlingsperioden i ultra-kald lake var satt til 2 sekunder per fisk. I den påfølgende dialogen med Mattilsynet ble det tydelig at videre arbeid med konseptet ikke ville få godkjenning hvis målet var å tilby bedøvelse til oppdrettsfisk. Dette fordi Mattilsynet anså metoden som for belastende og eksperimentell, særlig med tanke på at det eksisterer tilfredsstillende bedøvelsesmetoder som er godkjente for oppdrettsfisk. For å i det hele tatt komme videre i prosjektet ble det søkt om å gjøre en test av konseptet på små fisk med mål om å finne en egnet bedøvelse for (små) villfisk. Dette ble godkjent, og tillatelsen gav muligheter til å observere fisken både under og etter behandling.

#### Test på død fisk

Hel torsk (1 uke post mortem – til overs fra annet forsøk) ble behandlet i ultra-kald lake (-18 °C) i 10, 30, 120 og 300 sekunder. Dette ble gjort for å teste håndtering av fisk og for å kunne observere ytre virkninger av behandlingen. Fisken ble holdt i vann (4 °C) i forkant av behandlingen, og lagt tilbake i det samme vannet i 5 minutter etter behandling i ultra-kald lake.

#### Pre-studie

Forsøket ble gjennomført i desember 2020 hvor 3 laks (størrelse 800, 982 og 552 gram) ble behandlet i ultra-kald lake i 2 sekunder. Testene ble gjort ved at laksen ble håvet fra merd og plassert i holdetank (ca 1000 liter) med oksygenering noen timer for å roe ned. Testen startet med å håve fisken forsiktig fra holdetanken (naturlig sjøvannstemp 7,1 grader) og over i et håndholdt bur nedsenket i vann, hvor vi sjekket at alle normale responser på at fisken var til stede før fisken ble senket ned i lakebadet (-18,6 °C). Eksponeringstiden startet når fisken var senket ned i bedøvelseslaken. Etter to sekunder ble buret åpnet for å enklere kunne observere gjellelokkbevegelse, tap av likevekt og svømmebevegelser. I vedtaket fra Mattilsynet fikk vi tillatelse til å holde laksen i ultra-kald lake i 2 sekunder, og hvis fisken ikke viste tegn til sprelling og gjellelokkbevegelser kunne perioden utvides til maks 15 sekunder eksponering. Fisken var i denne perioden delvis eksponert for den kalde laken. Fisken ble avlivet med slag mot hodet ved det minste tegn til bevegelse etter de første 2 sekundene.

#### Test av konsept

Forsøket ble gjennomført i oktober 2021 og involverte 35 fisk (307 ± 41g). Av disse ble 21 fisk behandlet med ultra-lav temperatur (lake). Fremgangsmåte og gjennomføring var tilsvarende som for pre-studien, men mengden fisk og eksponeringen var forskjellig. Følgende grupper var involverte i forsøket:

- 1) Kontroll 1 (n=6): måling av blodverdier rett ut av karet (ustresset fisk) på Havbruksstasjonen (Kårvika). Ikke utsatt for ultra-kald lake.
- 2) Kontroll 2 (n=6): måling av blodverdier etter transport fra Havbruksstasjonen (Kårvika) til Nofima (Tromsø). Ikke utsatt for ultra-kald lake.
- 3) For-test (n=5): gjort i samråd med PMSK (personell med særskilt kontrollansvar) for å observere fisken gjennom behandlingen. Hvis behandlingen virket uforsvarlig, skulle forsøket termineres på dette stadium. Fisken ble avlivet (slag) umiddelbart etter eksponering i lakebadet.

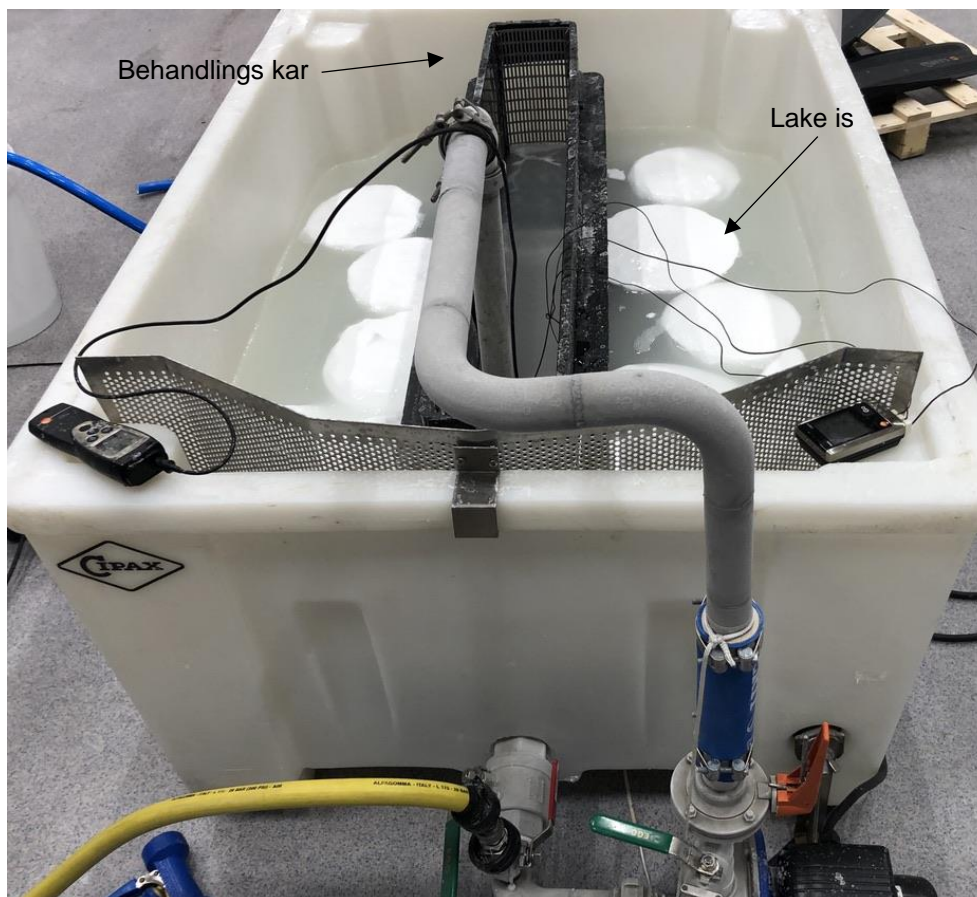
- 4) Standard behandling (n=8): Fisken ble behandlet (15 + 15 s) og observasjoner ble gjort underveis. Derneft ble fisken umiddelbart avlivet, og det ble tatt blodprøver.
- 5) Standard behandling + oppvåkning (n=8): etter behandling ble fisken overført til kar med sjøvann og observert. Fisken ble avlivet med slag mot hodet rett etter oppvåkning.
- 6) Kontroll 3 (n=8): Fisken ble holdt i buret som ble brukt til overføringen av fisk i lakekaret. Perioden tilsvarte tiden det tok å overføre fisken og holde den i behandlingsskaret (45 s). Ikke utsatt for ultra-kald lake.

## 4.2 Metoder brukt i prosjektet

På grunn av utfordringer med å få tillatelse til å gjennomføre forsøkene som opprinnelig var planlagt ble alle forsøk med slakteklar laks skrinlagt, og med dem også metodikk for å vurdere kvalitet i etterkant av bedøvelse og avliving. Siden hovedhensikten etter hvert dreide mot å varsomt fremskaffe dokumentasjon om konseptets beskaffenhet, så ble prosjektets industrielle relevans noe avkortet samtidig som at metodikken i sin helhet satte søkelys på velferdsmessige aspekter.

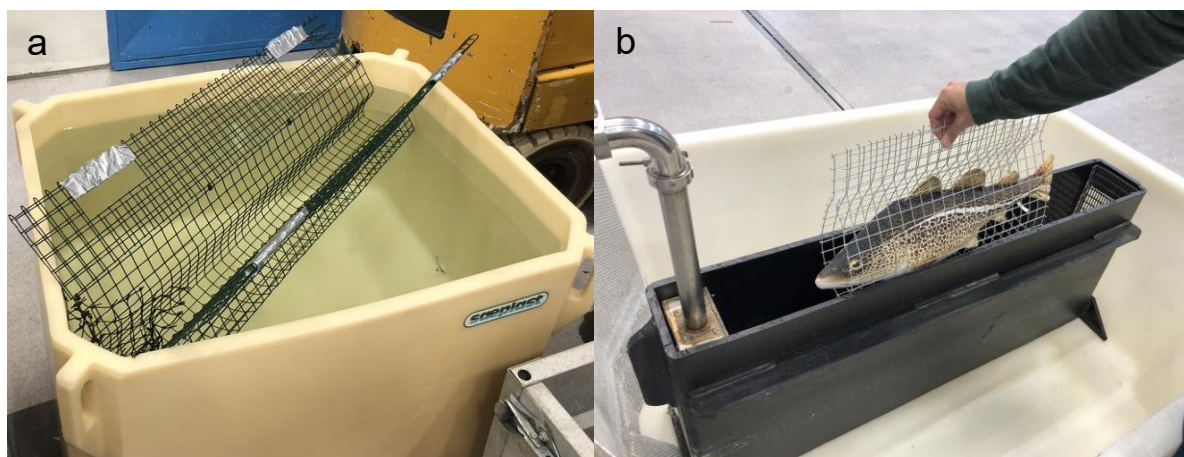
### 4.2.1 Lakebedøving (utstyr og metode)

Det ble konstruert et system for å kunne gjennomføre behandlingen med så kontrollerte betingelser som mulig. Selve bedøveren bestod av et 15 cm bredt kar som fikk pumpet kald lake fra et større kar (Figur 1). Systemet bestod av underkjølt lake med et overskudd av lake-is for å holde temperaturen lav og stabil. Behandlingskaret var plassert i det største karet slik at laken hele tiden ble resirkulert og holdt kald av det største karet. Hastigheten på laken i behandlingsskaret var 0,1 m/s og fisken ble plassert i retning mot strømmen.



Figur 1 Apparatet som ble brukt til bedøving ved ultra-lav temperatur. Underkjølt lake med lake-is blir pumpet fra det største (hvite) karet inn i et smalere behandlingsskar (i midten, svart). Under forsøk ble all lake-is lagt på den ene siden av behandlingsskaret.

Rett i forkant av behandling ble fisken håvet opp fra transportkar til et bur senket i et kar med sjøvann (Figur 2 a). Dette karet ble raskt transportert helt inntil bedøvelseskaret, og fisken ble raskt overført i behandlingskaret, som illustrert i Figur 2b. Når laken er i bevegelse, gjør innløst gass den relativt ugjennomsiktig. Derfor var det utfordrende å observere fisken i perioden den var senket i (det svarte) behandlingskaret. Etter en periode på 2 (pre-studie) eller 15 (test av konsept) sekunder ble buret med fisken overført i det store karet slik at fisken kunne håndteres og observeres. I denne perioden var halve fisken eksponert i laken, noe som gjorde det lettere å observere fisken. For oppvåkningstesten ble fisken overført direkte fra lakebadet til kar med sjøvann. I alle andre tilfeller ble fisken avlivet rett etter bedøvelse, ved slag mot hodet.



Figur 2 a) Buret som fisken ble overført til og b) måten fisken ble ført ned i behandlings karet. Kunstig fisk brukt for illustrasjon.

#### 4.2.2 VER/VOR (Visual Evoked Response/Vestibulo Ocular Reflex)

Fisken ble overvåket kontinuerlig gjennom hele forsøket av personell med god kunnskap og erfaring i forsøk på fisk. For å vurdere fiskevelferden var det flere parametere som ble vurdert. Fiskens aktivitet og bevegelse, før, under, og etter behandling. Under behandling ble bedøvelsesgraden registrert etter VER-metoden, hvor en sjekker de viktigste faktorene i forhold til fiskens bevissthetsnivå og hvor god bedøvelsen er. Parametere som sjekkes er: fiskens likevekt, pusting og øyerespons.

VER-metoden er blant annet omtalt i Nofima rapport 48/2010 (Tobiassen et al., 2010). Kriteriene studeres på enkeltindivider av fisk som holdes i vann like etter bedøvelse og en tid utover (Midling et al., 2008). Kriteriene evalueres og gis karakterer fra 0 (ingen respons), 1 (svak respons) til 2 (normal respons). Kriterier for vurdering av fiskens bevissthetsnivå kan bedømmes ut fra endringer i likevekt, svømming, pusting (gjellelokkbevegelse) og øye-rulling (Vestibulo Ocular Reflex «VOR»). VOR er sammen med gjellelokkbevegelser de siste refleksene som forsvinner før fisken dør, og de forsvinner samtidig med opphør av hjerneaktivitet (ingen EEG-respons). Fravær av disse refleksene regnes generelt som sikre tegn på bevisstløshet på slaktedyr etter bedøving.

#### 4.2.3 Blodanalyser

Alle målinger blir gjennomført umiddelbart etter bedøving og avliving ved slag mot hodet. Blodlaktat, blodglukose og kortisol blir brukt som indikatorer på stress da disse parametere i stor grad endrer seg ved høyt energiforbruk ved stress/aktivitet. Blodprøver ble samlet fra halevenen med vacutainer. Deretter ble laktat målt ved bruk av laktatePro2 teststrips, blodglukose målt med AccuCheck Guide teststrips og plasma kortisol analyse med ELISA, demeditec kit.



## 5 Resultater, diskusjon og konklusjon

### 5.1 Resultater og diskusjon

#### 5.1.1 Test på død fisk

I denne delen av prosjektet ble konseptet testet på død fisk, både for å evaluere utstyret og praktisk gjennomføring uten å belaste fisk unødvendig. Det ble bruk relativt stor fisk (4–5 kg), og etter en kort (10 s) behandling var det kun øynene på fisken som var synlig påvirket av behandlingen. Påvirkningen bestod av et tynt lag av frost i det ytterste laget av øyet (også observert etter 30 sekunder, se Figur 3). Dette laget tinte etter et par sekunder i sjøvann, og det var ingen permanente synlige spor etter behandlingen. Etter 120 og 300 sekunders behandling var det ytterste laget av fisken begynt å stivne (tynt frossent lag), men dette laget tinte raskt i vann (4°C) og det var heller ikke her noen synlige tegn av behandlingen.

Det ble ikke lagt veldig stor vekt på disse resultatene, men det ble gjennomført som en del av varsom tilnærming i forkant av forsøk med levende dyr. Observasjon av synlige ytre skader etter behandling av døde dyr vil kunne ha medført begrensinger i påfølgende forsøk.



Figur 3 Viser en fisk som var behandlet i ultra-kald lake i 30 sekunder; før (venstre), liker etter (midten) og etter tining (høyre).

#### 5.1.2 Pre-studie

Vi hadde kun tillatelse til å senke 3 laks i lakebadet (laks størrelse 800, 982 og 552 gram) i dette forsøket. Følgende observasjoner ble gjort:

Fisk 1: ble slått ut etter 2 sekunder i bedøvelseslaken, og ble dernest løftet over i det store kammeret for videre observasjon. Fisken viste først ikke tegn til å reagere på håndteringen, og den hadde mistet likevekten og fløt opp i overflaten. Etter 5–6 sekunders observasjon ble det registrert muskelbevegelse/refleks, og behandlingen ble avbrutt umiddelbart og fisken avlivet med slag mot hodet.

Fisk 2 og 3: Samme prosedyre som for fisk 1 blir forsøkt gjennomført, men for begge disse fiskene ble det registrert bevegelser i løpet av de første 2 sekunder. Derfor ble forsøket umiddelbart avbrutt, og fisken ble avlivet.

I og med at regelverket krever at bedøvelse for fisk skal lede til umiddelbart bevissthetstap, innen 0,5 sekunder eller mindre, så vil ikke denne metoden ut fra dette forsøket møte dagens krav som egnet bedøvelsesmetode. På dette stadiet i prosjektet var det ikke mulig å si noe om hvor lang tid det eventuelt vil gå før fisk i ultra-kald lake er bedøvd. En av tre fisker virket å bli slått ut momentant, men det forhindret ikke påfølgende bevegelser/reflekser for dette individet. Den tillatelsen som ble gitt av Mattilsynet tillot 2 sekunder behandling med påfølgende observasjoner fram til 15 sekunder (for 3 fisk). Forsøket skulle også avbrytes ved den minste bevegelse av muskel eller gjeller. I påfølgende dialog var det opplagt at Mattilsynet anser hurtigheten til dagens metoder som avgjørende, og at nye metoder primært må kunne

framvise tilsvarende effektivitet. På dette grunnlaget ble det konkludert med at metoden ikke er like effektiv som slag og el-bedøving. Det finnes derimot metoder for bedøving av dyr før slakting som ikke inntreer momentant. For kylling brukes både CAS (Controlled Atmospheric Stunning) og LAPS (Low Pressure Atmospheric Stunning), og virkningen av disse metodene kan typisk inntre etter et minutt eller mer. Fordelen med slike metoder er at feilprosenten er svært lav, og dette aspektet kan være en svært relevant utfordring å ta stilling til, også for oppdrettsbransjen.

For å komme ett skritt videre i prosjektet ble problemstillingen rettet mot villfanget små fisk siden det er lettere å få tillatelse å gjøre forsøk under disse vilkårene. Det var ikke mulig å dra noen konklusjoner ut fra resultatene i pre-studiet, og siden behovet for nye og bedre metoder for bedøvelse er stort både i fiskeri og oppdrett, så var behovet for en tydeligere avklaring angående denne metoden tilsvarende stor.

### **5.1.3 Test av konsept**

#### **For-test**

I denne delen av prosjektet var tillatelsen fra Mattilsynet en 15 + 15 sekunders eksponering i ultra-kald lake. I den første perioden (15 s) ble fisken ført ned i laken i et bur, og dernest tatt ut av buret og observert i nye 15 sekunder – totalt 30 sekunders eksponering. En av milepælene i prosjektet var å gjennomføre en for-test med begrenset antall individer (5). I denne delen ble det ikke gjort noen blodmålinger, men alle forsøksdeltagere (3 forskere + PMSK) ble instruert til å gjøre en velferdsvurdering basert på forsøk på et begrenset antall individer. Intensjonen var å terminere prosjektet på dette stadiet hvis det ble observert tydelige tegn på overlast. Behandlingen av de første 5 fiskene viste ingen slike tegn. Fisken virket stresset ved håndteringen i forkant av selve bedøvelsen, det vil si etter håving fra transportkar og plassering i behandlingsbur. Fiskens bevegelser ble umiddelbart redusert etter at den ble eksponert i den ultra-kalde laken, og fisken viste ingen ytre tegn til stress eller fluktresponser i laken.

#### **Hovedforsøk**

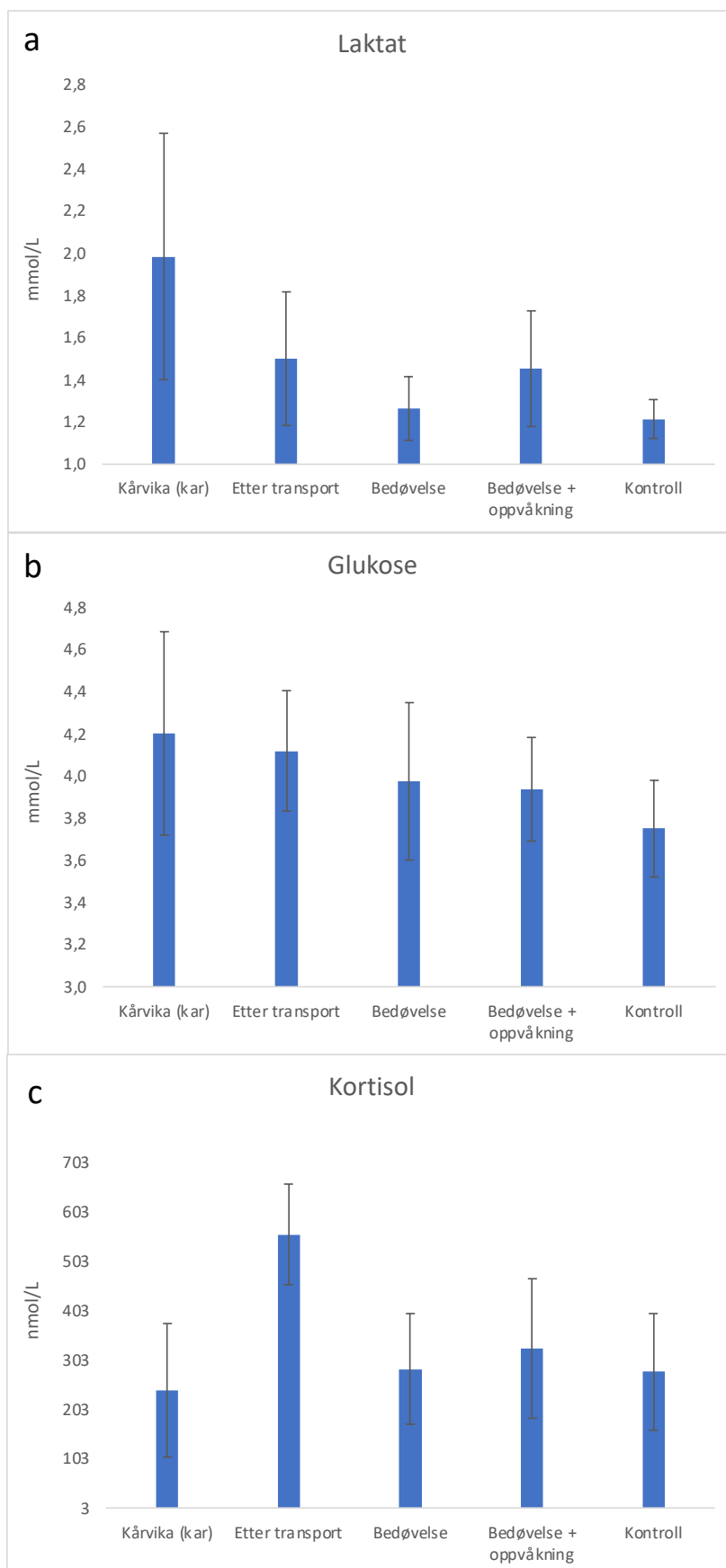
I tillegg til for-testen (5.3.1) ble det gjort 2 runder med behandling i ultra-kald lake. Selv om det var gitt godkjenning for bruk av 10 fisk i hver runde, så ble 8 stykk ansett som tilstrekkelig for dette forsøket og reduksjon av antallet ble foretatt. Det ble gjort følgende tester:

- 7) Testgruppe 1: Bedøvelse 15 + 15 sekunder
- 8) Testgruppe 2: Bedøvelse 15 + 15 sekunder, etterfulgt av oppvåkning
- 9) Testgruppe 3: Fisk ble holdt i behandlingsbur i 45 sekunder før avliving

All fisk som ble eksponert i ultra-kald lake i 15 sekunder var slått ut og bedøvd/immobilisert, derfor holdt vi fisken i ultra-kald lake i ytterligere 15 sekunder for å øke varigheten av bedøvelsen samtidig som fisken var lettere å iakttas utenfor buret. Vi observerte at fisken fløt med buken i været under eksponering i laken, og vi kunne på noen fisk se veldig svak gjellelokkbevegelse og muskelsammentrekninger, noe som også er vanlig på medikamentelt bedøvd fisk. Ingen stress eller fluktresponser ble registrert for noen av fiskene. For testgruppe 2 hvor vi sjekket oppvåkningstid etter overføring til sjøvann, tok det kun få sekunder før fisken igjen var kommet til hektene (mellom 12 og 37 sekunder). Fisken var øyensynlig fullt restituert og klar til å svømme rundt, men siden fisken skulle avlives like etter oppvåkning, så er det sparsomt med slike observasjoner. I dette forsøket ble grensen for eksponering satt til 30 sekunder, og den raske oppvåkningen viser at en så kort behandling neppe er tilstrekkelig for bedøvelse i forkant av slakting. For små fisk vil det trolig være ønskelig at behandlingen går videre til avliving av fisken. Hvor lang tid dette tar er et av spørsmålene som bør avklares. Det er også viktig å avklare hvorvidt fisk som våkner opp har tatt skade av behandlingen, både på kort og lang sikt.

Mål på stressparametere laktat, glukose og kortisol i blod er oppsummert i Figur 4. Både glukose og laktat påvirkes av generelle metabolske prosesser som ikke har noe med stress å gjøre, men indikatorene kan likevel være nyttige indikatorer på akutt stress. Laktatverdiene var uventet høy ved uttaket i kar før håndtering. Årsaken til dette er ikke åpenbar, men laktatverdiene var ikke forhøyet etter ultra-kald lake eksponering i forhold til det innledende transport/håndteringsstresset. Man kan også forvente en økning av glukose etter akutt stress, men denne responsen er noe langsommere enn for andre stressparametere. Resultatene fra glukosetestene indikere at ultra-kald lake ikke har stor påvirkning innenfor det korte tidsintervallet som er interessant for denne bedøvelsesmetoden.

Kortisol er det viktigste stresshormonet som måles ved håndtering av laks. Vi kan se ut fra våre resultater at selve transporten (*etter transport* uttaket), som var i forkant av eksponering i ultra-kald lake, hadde størst påvirkning med et forhøyet kortisolnivå i blod. Blodprøvene ble også tatt cirka 1 time etter transporten var over, så det er grunn til å anta at kortisolnivået ville ha vært høyere om blodprøven ble tatt like etter ankomst. Særlig med tanke på at kortisolnivået var redusert fra cirka 550 nmol/L til < 300 nmol/L (etter testgruppe 1) etter ytterligere 3 timer (4 timer etter transport). Selv om nivåene av kortisol normalt senkes gradvis etter fisken er utsatt for en stressor, så kan vi ikke vite om fisken var tilstrekkelig restituert til utgangspunktet før eksponering i ultra-kald lake i dette forsøket. Likevel ser vi at kortisolnivået vi måler etter bedøvelse i ultra-kald lake er marginalt høyere (284 nmol/l) enn hva vi måler for den siste kontrollgruppen (279 nmol/l) som ikke ble eksponert i lake. Dette gir en indikasjon på at 30 sekunder lakebehandling ikke utløser kraftige stressresponser hos laks i denne størrelsen.



Figur 4 Blodverdier målt ved ulike tidspunkt før og etter bedøvelsesbehandling; a) blodlaktat målt med laktatePro2 teststrips, b) blodglukose målt med AccuCheck Guide teststrips og c) plasma kortisol analyse, ELISA, demeditec kit. Oppgi antall fisk bak snittverdiene?



I og med at regelverket krever at bedøvelse for fisk skal lede til umiddelbart bevissthetstap på 0,5 sekunder eller mindre, så vil ikke denne metoden møte dagens krav som bedøvelsesmetode. Det er imidlertid grunn til å vurdere hvor hensiktsmessig et slikt krav er. I forhold til villfanget fisk, som i dag får lite tilbud om bedøvelse, er det gode grunner til å vurdere alle metoder som kan være med å redusere lidelse i forbindelse med fangst og slaktning. Motforestillinger overfor metoden som er testet ut i dette prosjektet har vært at behandlingen i seg selv påfører individene lidelse; at metoden påfører fisken både stress og fysiologiske utfordringer. Det faktum at vi hverken kan eller bør sette to streker under svaret etter disse preliminnære resultatene er en av hovedargumentene for en fortsatt forsiktig tilnærming. Men, resultatene så langt gir ingen grunn til å legge dette til side. Det at vi ikke observerte ytre tegn på stress (fluktrespons) for noen av fiskene, kan være en indikasjon på at fisken ikke opplever dette som svært belastende. Det er mye som tyder på at fisken blir stresset av håndteringen i forkant av selve behandlingen, noe som adferden til fisken bestemt gir inntrykk av. Denne adferden ser ut til å raskt bli «slått av» gjennom behandlingen i ultra-kald lake. Hvorvidt dette er en immobilisering (muskulaturen kjøles ned) eller kommer av tapt hjerneaktivitet (mindre og kaldere blod til hjernen) er ikke mulig å si med sikkerhet. Men, vi observerte fisk som beveget seg, også mot slutten av den totale behandlingstiden på 30 sekunder. I noen tilfeller virket dette å være refleksbevegelser etter at fisken hadde vært i ro en periode. Dette tyder på at fisken ikke er fullstendig immobilisert, selv etter 30 sekunder i ultra-kald lake. Det er også grunn til å tro at fisken ikke blir utsatt for noe osmotisk stress da det ytterste laget av iskrystaller vil dannes på få sekunder og dermed fungere som en barriere for transport av saltioner inn i fisken.

## 5.2 Anvendelse og nytteverdi

I tiden fremover vil et økende fokus være rettet mot velferdsaspekter både innenfor fiskeri og oppdrett. Hvorvidt selve avlivingen kan anses som en del av fiskens velferd kan debatteres, men tiltak for å redusere lidelser når dyr avlives er en moralsk forpliktelse så vel som et juridisk ansvar (dyrevernsloven). Slaktning av dyr (herunder også fisk) har i økende grad blitt et følsomt tema i den offentlige fremstillingen av matproduksjon, og dagens forbrukere blir i mindre grad enn før eksponert for bilder og reportasjer av slaktning via medieoppslag. For å sikre matindustriens renommé er det viktig at næringen selv tar ansvar for å skaffe kunnskap og bedre løsninger, spesielt for de områder hvor man ikke kan unngå å påføre dyr lidelser.

Dette prosjektet kommer som et resultat av oppdrettsindustriens ønske om mer kunnskap og nye metoder for bedøvelse i forkant av slaktning. Denne etterspørselen skyldes at mye fisk feilbedøves ved bruk av dagens metoder (slag og el-bedøving), og det er et klart ønske fra industrien at dagens metoder forbedres eller at man erstatter dem med nye og bedre metoder.

Resultatene fra prosjektet gir foreløpig ikke et klart svar hvorvidt bedøvelse med ultra-kald temperatur er en forbedring i forhold til dagens metoder. Spesielt i forhold til dagens krav til bedøving av oppdrettsfisk hvor virkningen skal inntre på mindre enn et halvt sekund. Det gjenstår også å fremskaffe mer solid dokumentasjon på hvordan denne behandlingen påvirker fisken. Når det gjelder små organismer så fremstår metoden som lovende, og metoden vil kunne forenkle prosesser ved for eksempel å slå sammen bedøvelse, avliving og innfrysing til ett steg. For veldig små organismer som f.eks. reker, som i dag fryses sakte i blokk, vil metoden innebære et stort velferdsmessig løft. Ved å singelfryse rekene i lake kan denne prosessen gå i størrelsesorden mer enn hundre ganger raskere enn nåværende kommersielle praksis, noe som burde ha stor betydning både for å redusere lidelser og samtidig bevare kvaliteten på dette råstoffet.

Dette prosjektet representerer forskningsfelt innen fiskeforedling og prosessering hvor Nofima i Tromsø har sin spesialkompetanse. Nofima har omfattende erfaring og kompetanse på temaet bedøvelse og avliving av fisk og har flere tilgrensende prosjekter. Resultatene fra dette prosjektet vil forhåpentligvis gi

grunnlag for videre arbeid på temaet. Gjennom prosjektet har Nofima ytterligere økt kompetansen på dette området, og med vår nære tilknytning til industrien så vil dette komme hele næringen til nytte.

### 5.3 Konklusjon

For oppdrettsfisk er nåværende krav til hurtig bedøvelse så streng ( $< 0,5$  s) at bedøvelse ved ultra-lav temperatur ikke oppfyller kriteriene til å være et alternativ til dagens metoder. Selv om feilprosenten ved dagens anvendte metoder (slag/el-bedøving) er høy, så er metodene svært effektive (raske) når bedøvelsen er vellykket. En mulig svakhet i vurderingen av dagens metoder er at tidsregnskapet ikke inkluderer det stresset som fisken utsettes for i forkant av bedøvelsesbehandlingen ( $>> 0,5$  s). Et annet moment ved dagens praksis er at antallet mislykkede bedøvinger med påfølgende stress/lidelser egentlig ikke kan vurderes langs den samme akse som brukes når man vurderer metoder under ideelle betingelser. På den måten kan noen få vellykkede eksempler pynte på virkeligheten slik at lidelsene ved virkningsløs bedøvelse blir bagatellisert. En potensiell styrke ved bedøvelse ved ultra-lav temperatur, er muligheten til å legge inn sikring slik at *alle* individer blir inkludert i behandlingen. Men, dette forutsetter at man klarer å dokumentere at behandlingen i seg selv ikke påfører stress/lidelse.

Observasjoner i dette prosjektet tyder på at adferden til fisken som behandles med ultra-lav temperatur ser ut til å være mer påvirket av stress fra håndtering i forkant enn stress ved selve behandlingen i ultra-kald lake. De svake gjellelokk- og muskelbevegelsene som ble observert viser at fisken hverken blir totalt immobilisert eller dør av behandlingen. Det er derimot ikke klart stadfestet om, og i hvilken grad, fisken bedøves som følge av ultra-kald lake. Hvis fisken opplever umiddelbart ubehag av behandlingen ville akutt fluktnesponser være en forventet adferd. Fraværet av slike responser er en indikasjon på at fisken ikke opplever mye ubehag, noe som videre underbygges av lav mengde stresshormoner i blodet.

**Hovedkonklusjonen** fra prosjektet er at ultra-lav temperatur foreløpig ikke kan anses som kandidat som bedøvelse for slakteklar laks. Det er aspekter ved denne metoden som virker å være lovende, men det anbefales at videre dokumentasjon først og fremst rettes mot små individer med sikte på å kunne tilby bedøvelse for villfanget fisk. Hvis metoden tas i bruk og etableres for mindre villfisk, vil det også være mulig å igjen vurdere utvikling av metoden for effektiv bedøving av større fisk.

## 6 Hovedfunn

- Bedøvelse ved ultra-lav temperatur er ikke en like rask metode som slag eller el-bedøving, og med dagens tidskrav (< 0,5 s) så er denne metoden derfor ikke en kandidat som bedøvelse for slakteklar laks.
- Metoden virker å bedøve/immobilisere små fisk relativt umiddelbart. Selv om fisken klarer å bevege seg (reflekser) etter 30 s eksponering i laken, ble det ikke observert fluktnesponser hos noen av fiskene.
- Bedøvelse ved ultra-lav temperatur kan bli nyttig for villfanget råstoff og slakteprosess ved at det fungerer som både bedøvelse og avliving i samme prosess. For råstoff som skal fryse inn helt så vil både bedøvelse, avliving og innfrysing kunne slås sammen i én prosess.
- Reker vil kunne være den første kandidaten man tester ut metoden på. Dette er et råstoff som ikke tilbys bedøvelse ved innfrysing, samtidig som at den kommersielle innfrysingen er en langsom prosess. Basert på antall individer vil man derved kunne bedre velferden for et antall individer som er minst 10 ganger større enn hva oppdrettsindustrien omfatter.

## 7 Leveranser

Det ble avtalt følgende leveranser i prosjektet:

1. Referat fra RG's oppstartsmøte (nettbasert)	30. juni	2020
2. Referat fra møte i RG (nettbasert)	1. desember	2020
3. Statusrapport FHF	1. januar	2021
4. Referat fra siste møte i RG (fysisk møte i Tromsø)	1. mars	2021
5. Artikkel i fagblad	30. april	2021
6. Faglig sluttrapport i tråd med FHF's <i>Retningslinjer for sluttrapportering</i>	15. mai	2021
7. Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's <i>Retningslinjer for sluttrapportering</i>	15. mai	2021

Siden prosjektet ble forsinket så er det avvik mellom den planlagte og gjennomførte prosjektperioden. Endringer av plan og gjennomføringer har vært diskutert underveis i referansegruppen, og gjennomføringen av prosjektet har vært gjort innenfor de tillatelser som ble gitt.

## 8 Referanser

- Grimsbø, E., Nortvedt, R., Hjertaker, B.T., Hammer, E. & Roth, B. (2016). Optimal AC frequency range for electro-stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **451**, 283–288.
- Lambooj, E., Grimsbø, E., Van de Vis, J.W., Reimert, H.G.M., Nortvedt, R. & Roth, B. (2010). Percussion and electrical stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after dewatering and subsequent effect on brain and heart activities. *Aquaculture*, **300**:1-4, 107–112.
- Mattilsynet (2014). Veileder. Veiledning om krav til god fiskevelferd ved slakteri for akvakulturdyr. [https://www.mattilsynet.no/om\\_mattilsynet/gjeldende\\_regelverk/veiledere/veileder\\_fiskevelferd\\_ved\\_slakteri\\_for\\_akvakulturdyr.9471/binary/Veileder%20fiskevelferd%20ved%20slakteri%20for%20akvakulturdyr](https://www.mattilsynet.no/om_mattilsynet/gjeldende_regelverk/veiledere/veileder_fiskevelferd_ved_slakteri_for_akvakulturdyr.9471/binary/Veileder%20fiskevelferd%20ved%20slakteri%20for%20akvakulturdyr)
- Midling, K.Ø., Mejdell, C., Olsen, S.H., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., Aas, K., ... & Oppedal, K. (2008). Slakting av oppdrettslaks på båt, direkte fra oppdrettsmerd. Rapport 6/2008, Nofima, Tromsø.
- Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F. & Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, **13**:1-2, 29–49.
- Roth, B. (2018). Bedøvelse og avliving av flekksteinbit før slakt. Rapport 29/2018, Nofima, Tromsø.
- Tobiassen, T., Mejdell, C.M. Midling, K. & Akse, L. (2010). Sanitetslakting på merdkanten. Rapport 48/2010, Nofima, Tromsø.
- Tobiassen, T., Hustad, A., Evensen, T.H., Ageeva, T.N., Martinsen, G., Joensen, S., ... & Mejdell, C.M. (2018). Bedøvelse og bløgging av fisk om bord i fartøy – Faglig sluttrapport. Rapport 28/2018, Nofima, Tromsø.
- Tobiassen, T., Herland, H., Heide, M., Østli, J., Sogn-Grundvåg, G., Midling, K.Ø., ... & Digre, H. (2012). Bedøvelse av laksefisk-status i forhold til forskrift og produktfeil. Rapport 32/2012, Nofima, Tromsø.