



Stress och beteende vid bedövning av öring

Victoria Welander

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
NJ-fakulteten
Uppsala 2022



Stress och beteende vid bedövning av öring

Victoria Welander

Handledare: Ann-Britt Florin, Sveriges lantbruksuniversitet, SLU Aqua
Bitr. handledare: Erik Petersson, Sveriges lantbruksuniversitet, SLU Aqua
Examinator: Elin Dahlgren, Sveriges lantbruksuniversitet, SLU Aqua

Omfattning: 15 hp
Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E
Kurstitel: Självständigt arbete i Biologi
Kurskod: EX0894
Kursansvarig inst.: Institutionen för akvatiska resurser (SLU Aqua)
Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2022
Fakultet NJ-fakulteten

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap (NJ)
SLU Aqua

Sammanfattning

I samband med att fiskar har blivit allt vanligare inom områden som forskning, odling och miljöövervakning har behovet av att säkerställa god djuromsorg blivit mer uppmärksammat. För att minska fiskens stress och underlätta den fysiska hanteringen brukar bedövningsmedel användas i många sammanhang. Eftersom det råder stor artvariation mellan fiskars svar på bedövning är det viktigt att lägga resurser på bedövningsstudier för att säkerställa bästa möjliga djurhållning för varje enskild art. I den här studien undersöktes stressrespons samt beteende hos öring (*Salmo trutta*) vid bedövning med olika koncentrationer av bedövningsmedlen trikain, eugenol, bensokain samt metomidat. Ettåriga, odlade öringar PIT-tag märktes för att möjliggöra identifiering av varje fiskindivid. Knappt fyra veckor efter märkningen utfördes bedövningsexperimentet där låga och höga koncentrationer av de olika bedövningsmedlen (3 mg/L respektive 6 mg/L för metomidat och 40 mg/L respektive 80 mg/L för de övriga) användes för bedövning av fisk genom tillsats till vatten följt av upptag genom gälarna. Bedövningsprocessen filmades och induktionstid, rusningstid samt uppvisandet av ett specifikt beteende noterades. Av bedövningsmedlen var det eugenol som hade lägst induktionstid. Varken bedövningsmedel eller koncentration hade en signifikant påverkan på rusningstiden. Det specifika beteendet innebar att fiskarna efter förlorad balans lade sig på sidan men fortsatte röra mycket på stjärtfenan, ofta i cirkulära rörelser, tillsammans med mer eller mindre häftiga sidorörelser med huvudet mot ytan som för att "kippa efter syre". Beteendet var vanligare vid bedövning med metomidat än med de andra bedövningsmedlen, 80% av fiskarna som bedövades med den lägre koncentrationen metomidat uppvisade det. Slutligen fastställdes 40 mg/L eugenol som det rekommenderade bedövningsmedlet för ettåriga, odlade öringar inom längdintervallet 95 - 140 mm vid en vattentemperatur runt 3 - 4°C. Detta baserat på den korta induktionstiden (medianvärde 1,3 minuter) och den hämmande effekten på fiskars stressrespons eugenol har beskrivits ha. Bedövning med 3 mg/L metomidat rekommenderas inte under förhållanden som liknar studiens.

Abstract

As fish has become more frequently used in areas such as research, aquaculture and environmental monitoring the need for ensuring animal welfare has gained more attention. In order to reduce the stress level of the fish and to facilitate the physical handling anesthetics are commonly used. Since there is great species variation between fish in their response to anesthetics it is important to put resources into studies of fish anesthetizing to ensure the highest possible fish wellbeing. In this study the stress response and behavior of trout (*Salmo trutta*) was analyzed during anesthesia with tricaine, eugenol, benzocaine and metomidate. One year old, farmed trout were PIT-tagged in order to enable identification of every fish. Around four weeks after the tagging the anesthetics experiment took place where low and high concentrations of the anesthetics (3 mg/L and 6 mg/L for metomidate and 40 mg/L and 80 mg/L for the other ones) were used to anesthetize the fish through addition to water followed by absorption through the gills. The anesthetizing process was recorded and the induction time, excitation time and the display of a specific behavior was noted. Of the tested anesthetics eugenol resulted in the shortest induction time. Neither the anesthetic nor the concentration had a significant effect on the excitation time. The specific behavior involved the fish falling to the side after having lost balance but continuing to move the tail fin, often in circular motions, together with more or less forceful side movements where the head went towards the surface as if the fish was “gasping for air”. The behavior was more common during metomidate anesthetizing than for the other anesthetics, 80% of the fish anesthetized with the lower dose of metomidate displayed it. In the end 40 mg/L eugenol was established as the recommended anesthetic for one year old, farmed trout between the length interval 95-140mm at a water temperature around 3 – 4°C. This based on the short induction time (median value 1,3 minutes) together with the inhibiting effect on the stress response of fish that eugenol is said to have. The use of 3 mg/L metomidate is not recommended under conditions similar to those in this study.

Innehållsförteckning

1	Introduktion	6
1.1	Bedövningsmedel	8
1.1.1	Trikain	8
1.1.2	Bensokain	8
1.1.3	Eugenol	8
1.1.4	Metomidat	9
2	Material och metod.....	9
2.1	Märkning av öring med PIT-tags.....	9
2.2	Bedövningsexperiment	10
2.2.1	Stamlösningar av bedövningsmedel	10
2.2.2	Utförande	11
2.3	Dokumentation av beteende	12
2.4	Statistisk analys	12
3	Resultat	13
4	Diskussion	17
4.1	Slutsats	19
5	Referenser.....	20

1 Introduktion

Användandet av fiskar i olika sammanhang såsom forskning, matproduktion och miljöövervakning har sett en stadig ökning under de senaste decennierna, både i Sverige och internationellt. Zebrafiskens begränsade storlek och lättskötta natur i kombination med dess relativa komplexitet gör den exempelvis lämplig som modelldjur för studier av grundläggande fysiologi (Toni et al., 2018). Det bedrivs även kontinuerlig forskning för att utveckla och förbättra vattenbruket i Sverige. Fisk kan odlas i konsumtionssyfte, men även för produktion av fisk som i slutändan sätts ut i olika naturvatten för att till exempel återintroducera förlorade arter i ett visst område, kompensera för bortfall av laxfisk orsakat av vattenkraftverk eller för att helt enkelt förbättra det lokala fisket (Jordbruksverket, 2022). Fisk fångas även in som del av fortlöpande miljöövervakning, då ofta för att studera förekomst samt täthet av olika bestånd (Havsmiljöinstitutet, 2022).

Öringen (*Salmo trutta*) är en mycket vanlig fiskart i Sverige, populär inte minst hos sportfiskare. Dess utbredning inkluderar vattendrag, sjöar och havsområden i hela landet (Havs- och vattenmyndigheten, 2022). Öringar med anadrom livscykel vandrar efter ett par år i sötvatten ut till havs innan de återvänder uppströms för att leka i strömmande vatten med grusbotten. Innan utvandringen genomgår fiskarna fysiologiska och beteendemässiga förändringar, en process som kallas smoltifiering. Det finns även öringar som tillbringar hela sina liv i sötvatten som sjöar och bäckar (Artdatabanken, 2022). Öringen är en fisk som är vanlig i miljöövervakningssammanhang och förekommer i det svenska vattenbruket som sättfisk för att bland annat kompensera för förhindrad vandring orsakad av kraftverk (Svenskt vattenbruk, 2020). Den hanteras därför frekvent i forskningssyfte och det är av stor vikt att det sker med så mycket hänsyn till djuromsorgen som möjligt.

Fiskar uppvisar fysiologiska stressresponser och förändrat beteende när de utsätts för stressorer såsom fysisk hantering eller förändringar i deras miljö. Den primära responsen innefattar utsöndring av stresshormon såsom adrenalin och kortisol. Förekomsten av dessa i cirkulationssystemet inducerar den sekundära responsen som inkluderar ökat syreupptag- och transport, hjärtaktivitet och förhöjd koncentration av blodglukos. Blodflödet till bland annat gälarna ökar vilket kan leda till minskad förmåga att justera den osmotiska balansen, någon som kan ge svåra konsekvenser för fisken. Då stressvarens syfte är att fokusera alla resurser på att endast upprätthålla de funktioner som behövs för omedelbar överlevnad blir övriga kroppsfunktioner lidande. Detta innebär att fiskar som utsätts för mycket stress kan få sänkt immunförsvar samt hämmad tillväxt och reproduktion (Jalmlöv et al., 2011).

En omdebatterad fråga är om fiskar kan känna smärta – och i sådana fall även medvetet uppfatta den smärtan som del av ett lidande. Flertalet studier har resulterat i bevis för att fiskar kan uppleva smärta (Sneddon, 2012), men när det kommer till det

mer svårdefinierade begreppet "medvetet lidande" är resultaten inte lika tydliga. Därför är de generella riktlinjerna att anamma försiktighetsprincipen "the benefit of the doubt" för varje fiskart, alltså att alltid utgå ifrån att de kan känna lidande (Jalmlov et al., 2011).

Det har påvisats att många av de bedövningsmedel som används för andra ryggradsdjur även kan användas på fiskar vid olika typer av hantering. I vattenbruksindustrin finns flera tillfällen då bedövning kan behövas, exempelvis vid transport, vaccinering, och romkramning. Bedövningens syfte är att minska fiskens stressnivå samtidigt som förhindrad hypermobilitet förenklar den fysiska hanteringen och minskar risken för trauma på både människa och fisk. Vid större ingrepp av invasiv karaktär är det centralt att djup, kirurgisk anestesi uppnås. (Skår et al., 2017).

Det finns ett antal olika bedövningsmedel som använts på fiskar, men den generella kunskapsnivån om dess verkan och efterföljande effekter är låg i jämförelse med andra ryggradsdjur (Neiffer och Stamper, 2009). Dessutom är fiskar en artrik och variabel djurgrupp där de strålfeniga fiskarna innefattar mer än 25 000 arter, alla med specifika anatomiska, fysiologiska och beteendemässiga drag (Toni et al., 2018). Abiotiska faktorer såsom pH, syrehalt, vattentemperatur och salinitet har dessutom också påverkan på bedövningen (Skår et al., 2017). Detsamma gäller biologiska skillnader inom samma fiskpopulation som kön, storlek och ålder. Detta ställer krav på forskare och arbetande inom fiskindustrin att lägga resurser på bedövningsstudier för aktuella fiskarter om bästa möjliga djurhållning ska kunna upprätthållas. Utöver de direkta effekterna på fiskarna finns det även andra aspekter att ta hänsyn till vid val av bedövningsmedel, såsom tillgång och användningsvänlighet, toxicitet för fisk, människa och miljö samt kostnad (Akbulut et al., 2009).

Det vanligaste sättet att administrera bedövningsmedel till fisk är genom att tillsätta det till vattnet och låta ämnet absorberas genom gälarna. En god bedövningseffekt, snabb induktionstid (tid för att uppnå önskvärd bedövning) följt av snabb återhämtning är önskvärt för att minimera stress hos fisken (Skår et al., 2017). Bedövningen kan delas upp i olika stadier i syfte att underlätta monitorering av förloppet. Varje stadium har då en viss kombination av vissa parametrar såsom fiskens generella aktivitet, gälaktivitet, reaktivitet, balans etc. Stadier inkluderar bland annat lätt bedövning, excitation, kirurgisk bedövning och överdos och olika procedurer eller ingrepp lämpar sig bäst vid olika stadier. Excitation kan sägas inkludera när fisken "rusar", det vill säga simmar med mycket hög aktivitet på ett panikartat och stressat sätt (Sneddon, 2012).

Syftet med den här studien var att undersöka stressrespons samt beteende hos öring vid bedövning med olika koncentrationer av trikain, eugenol, bensokain samt metomidat. Utifrån resultaten var målet sedan att fastställa rekommenderat bedövningsmedel och koncentration vid en situation där öring fångas in, bedövas, mäts och sedan släpps ut igen.

1.1 Bedövningsmedel

1.1.1 Trikain

Trikainmetansulfonat, även känt som MS 222, är ett derivat av bensokain och ett av de mest förekommande bedövningsmedel som används på fiskar (Sneddon 2012). Det är vattenlösligt och surt. Som mest effektivt och säkert är det i sin neutrala form, vilket innebär att det i vissa fall kan krävas tillsats av buffrande medel, såsom natriumbikarbonat, för bibehållt pH. Saltvatten har en bättre bufferkapacitet än sötvatten så behovet för tillsatts av buffert brukar vara mindre (Neiffer och Stamper, 2009). Trikain fungerar genom att det blockerar spänningsskänsliga natriumkanaler vilket hindrar transport av signaler både i nerv- och muskelceller. Detta innebär att fisken blir paralyserad samtidigt som smärtsignaler stoppas och en analgetisk (smärtstillande) effekt uppnås. Trikain orsakar i sig en viss stressrespons hos fiskar då man har kunnat visa att kortisolnivåerna i blodet stiger omedelbart efter bedövningen. Det finns även belägg för att trikain kan orsaka hypoxemi på grund av det inducerar hypoventilation hos fisken (Zahl et al., 2011)

1.1.2 Bensokain

Bensokain är till skillnad från dess derivat, trikain, mycket svårslösligt i vatten och kräver därför att det först löses i etanol innan det kan tillsättas till vattnet. Fördelar med bensokain är att det har låg toxicitet för människor och relativt snabb nerbrytningstid i vattnet, vilket är bra för miljön. Dess fettlöslighet kan dock vara problematiskt för återhämtningen av speciellt äldre eller rombärande honor (Neiffer och Stamper, 2009). Bensokain, likt trikain, hindrar propagering av nervsignaler genom blockering av spänningsskänsliga natriumkanaler vilket leder till paralyse och analgesi hos fisken. Även bensokain har påvisats orsaka förhöjda kortisolnivåer efter bedövning och kan inducera hypoxemi som bieffekt (Zahl et al., 2011).

1.1.3 Eugenol

Eugenol är den primära aktiva ingrediensen i den naturliga produkten nejlikolja (Akbulut et al., 2009). Det har rapporterats vara ett effektivt bedövningsmedel som inte är toxiskt varken för fisk, människa eller miljö. I jämförelse med andra bedövningsmedel är induktionstiden snabbare, även vid låga koncentrationer. Återhämtningstiden för fisken är dock längre än för andra bedövningsmedel (Global Seafood Alliance, 2014). Eugenol påverkar nervsystemet på flera sätt; det hämmar natrium-, kalium- och kalciumkanalernas funktion och inhiberar respektive aktiverar så kallade NMDA och GABA_A-receptorer¹ (Zahl et al., 2011). Det resulterar i effektiv

¹ Inhibering av NMDA (*N*-metyl-D-aspartat)-receptorer och aktivering av GABA_A (gammaaminosmörtsyra A)-receptorer leder till minskad aktivitet i det centrala nervsystemet (Zahl et al., 2011).

bedövning med förväntat analgetisk effekt (Skår et al., 2017). Det finns flertalet studier som indikerar att användandet av eugenol som bedövningsmedel inte orsakar någon förhöjd kortisolnivå i blodet, något som talar för att det har en stressreducerande påverkan hos fiskar. En förklarande hypotes är att eugenol blockerar sensoriska signaler från att nå hypofysen (Corso et al., 2018).

1.1.4 Metomidat

Metomidat är en vattenlöslig molekyl med den vetenskapligt bevisade egenskapen att den har en bedövande effekt på fisk samtidigt som den aktivt hämmar produktion och utsöndring av stresshormonet kortisol. Detta gör metomidat lämpat för åtgärder som endast kräver lättare bedövning, eftersom de låga koncentrationer som krävs för hämmad kortisolutsöndring tillåter fisken att bibehålla sin balans. Den fysiologiska mekanismen innefattar aktivering av inhiberande GABA_A-receptorer i det centrala nervsystemet (Sneddon, 2012). Metomidat är en förmodat dålig analgetika och ska därför inte brukas vid större ingrepp såsom kirurgi (Neiffer och Stamper, 2009).

2 Material och metod

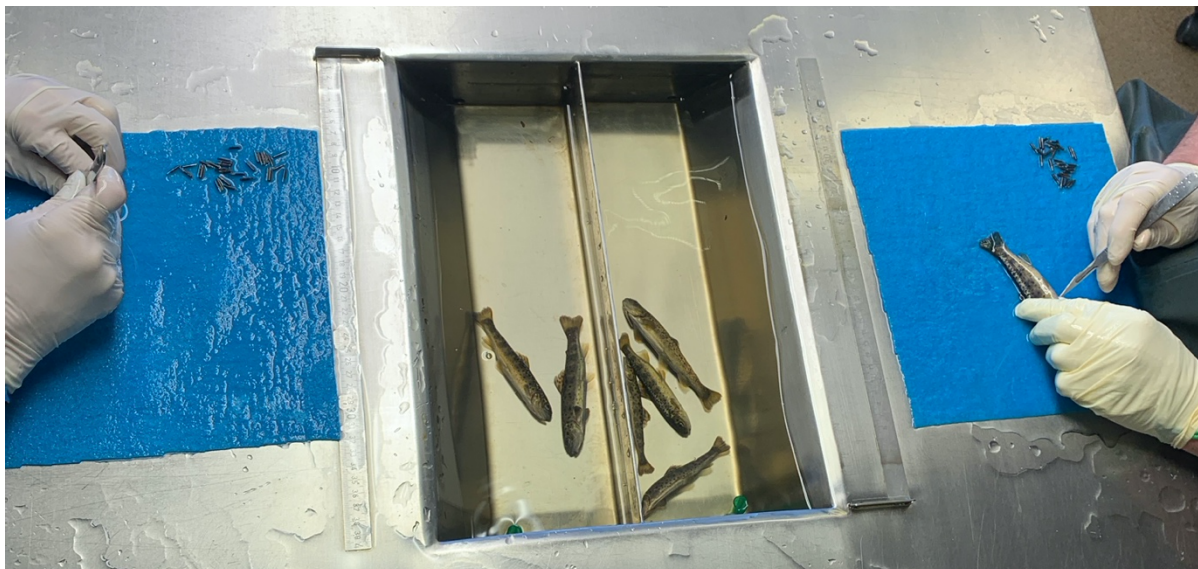
Försöken utfördes på SLU:s fiskeriförsöksstation i Älvkarleby i april - maj 2022 och har godkänts av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (Dnr 5.8.18-07601-2021).

2.1 Märkning av öring med PIT-tags

Öring märktes med PIT (Passive Integrated Transponder) -tags som möjliggjorde identifiering av varje fiskindivid via en unik alfanumerisk kod. Märkningen utfördes då fiskarna som inkluderas i denna studie även medverkade i en långtidsstudie där senare identifiering av varje fisk var nödvändig. Proceduren beskrivs ändå i denna rapport eftersom den innebar ett signifikant ingrepp på fiskarna.

Drygt 300 odlade, ettåriga individer hävades upp ur odlingsbassänger och förflyttades till ett kar med kontinuerlig tillförsel av färskt vatten från Dalälven. Karet täcktes delvis med ett lock för att minska stress hos fisken. Två plastbehållare fylldes med 5L älvsvatten vardera och till varje tillsattes 35 mL stocklösning av 25 g/L Tricaine Pharmaq (trikain) vilket resulterade i en slutgiltig koncentration på 175 mg/L av bedövningsmedlet. Ett tiotal öringar flyttades sedan i taget över till de olika bedövningsbehållarna där de efter ett antal minuter uppvisade tecken på att bedövningen tagit (förlorad balans, reducerad gälaktivitet, reagerar inte på stimuli). En ren, vass skalpell användes sedan för att göra ett litet snitt i fiskens bukvägg varigenom en aktiverad PIT-tag försiktigt trycktes in i bukhålan (se Figur 1). Snittet slöts genom att ett finger ströks över ytan. De märkta fiskarna placerades sedan i ett

nytt kar med kontinuerlig tillförsel av färskt älvsvatten för återhämtning från bedövning och ingrepp och kunde slutligen flyttas över till odlingsbassäng.



Figur 1. Visar bedövade öringar som blir märkta med PIT-tags.

Fiskexemplar med en längd under ungefär 90mm valdes bort, totalt sett märktes 300 öringar.

2.2 Bedövningsexperiment

2.2.1 Stamlösningar av bedövningsmedel

Tabell 1 visar vilken mängd bedövningsmedel samt volym och typ av lösningsmedel som användes för beredning av de olika stamlösningarna.

Tabell 1. Visar vilken mängd bedövningsmedel samt volym och typ av lösningsmedel som användes för beredning av olika stamlösningar. Visar även den slutgiltiga koncentrationen av stamlösningen.

Bedövningsmedel	Mängd	Lösningsmedel	Volym lösningsmedel (L)	Koncentration stamlösning (mg/L)
Trikain	25 mg	Vatten	1	25
Bensokain	10 mg	95% etanol	0,1	100
Eugenol	10 mL	95% etanol	0,09	118

Ingen stamlösning för metomidat förbereddes, önskad mängd vägdes upp och tillsattes direkt i bedövningsbadet.

2.2.2 Utförande

Bedövningsexperimentet utfördes knappt fyra veckor efter PIT-tag märkningen av öringarna.

De sedan tidigare PIT-tag märkta öringarna förflyttades från odlingsbassäng till ett kar med kontinuerlig tillförsel av färskt vatten från Dalälven. Karet täcktes delvis med ett lock för att erbjuda fisken ett skydd för minskad stress. Fyra plastbehållare fylldes med 3 L älvsvatten (ungefärlig temperatur 3 - 4°C) och de olika bedövningsmedlen tillsattes till respektive behållare till de slutgiltiga koncentrationerna 40 mg/L trikain, 40 mg/L bensokain, 40 mg/L eugenol samt 3 mg/L metomidat. En fisk åt gången håvades sedan upp och dess PIT-tag lästes av innan den placerades i något av bedövningsbaden. Fiskens beteende under hela bedövningsprocessen spelades in med en mobilkamera och den totala induktionstiden för bedövningen togs med hjälp av ett tidtagarur. Bedövningen ansågs uppnådd när fiskens balans förlorades, den var orörlig, endast svaga gälrörelser uppfattades och den inte längre svarade på stimuli (Sneddon, 2012). Fisken överfördes då direkt till ett vattenfyllt mätglas för dokumentation av dess längd, och placerades sedan i ett nytt kar med kontinuerlig tillförsel av färskt älvsvatten för återhämtning. Processen upprepades därefter på nya fiskar med koncentrationerna 80 mg/L trikain, 80 mg/L bensokain, 80 mg/L eugenol samt 6 mg/L metomidat (se Tabell 2). Tiden för bedövningsexperimentet var två timmar för omgången med de låga koncentrationerna och en och en halv timme för omgången med de höga koncentrationerna.



Figur 2. Visar bedövningsbadet innehållande metomidat, eugenol, trikain och bensokain, från vänster till höger.

Tabell 2. Visar den låga respektive höga koncentrationen av de olika bedövningsmedlen.

Bedövningsmedel	Metomidat	Eugenol	Trikain	Bensokain
Låg koncentration (mg/L)	3	40	40	40
Hög koncentration (mg/L)	6	80	80	80

2.3 Dokumentation av beteende

Alla filmer som spelades in under bedövningsexperimentet studerades enskilt för dokumentation av bedövningsbeteende för varje fisk. Rusningstiden ansågs vara den totala tid som fisken uppvisade ett tydligt stressat och intensivt flyktbeteende med rusande, panikartad aktivitet. Vid de enstaka tillfällena rusning kunde uppfattas vid två tydligt åtskilda tillfällen lades tiderna ihop till en sammanlagd.

Vid genomgång av filmerna uppmärksammades ett specifikt beteende hos vissa fiskar där de efter förlorad balans lade sig på sidan men fortsatte röra mycket på stjärten, ofta i cirkulära rörelser, tillsammans med mer eller mindre häftiga sidorörelser med huvudet mot ytan som för att "kipa efter syre". För mätbarhet bestämdes att de individer där tidigare nämnda drag tydligt kunde observeras under minst 15 sammanhängande sekunder kunde räknas till andelen som uppvisade beteendet. De fall där filmen hade brutits eller saknades helt exkluderades från beräkningarna (se Tabell 3 för översikt över hur många beteendeobservationer som gjordes för varje bedövningsmedel och koncentration).

Tabell 3. Visar antalet fiskar som bedövades med varje bedövningsmedel respektive koncentration samt antalet noterade rusningstider och beteendeobservationer.

Antal (st)	Metomidat		Eugenol		Trikain		Bensokain	
	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög
Fiskar som bedövades	10	10	10	10	10	10	10	10
Noterade rusningstider	10	10	9	10	9	9	10	9
Beteendeobservationer	10	9	9	9	9	10	9	9

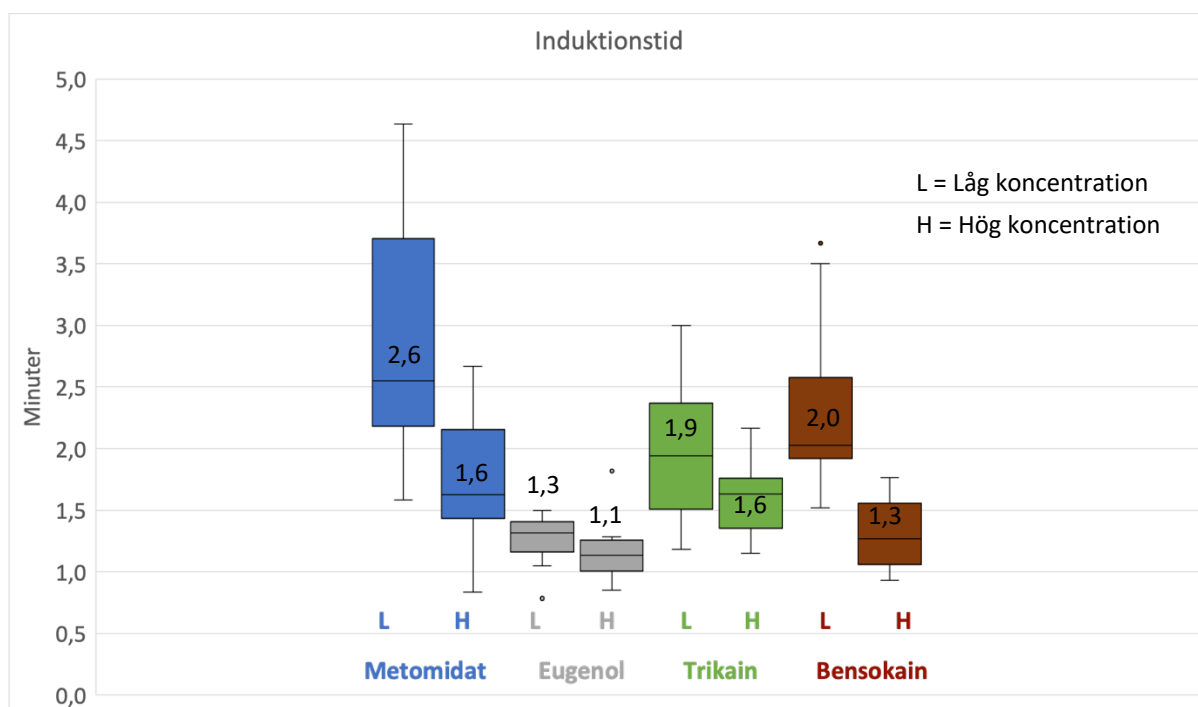
2.4 Statistisk analys

Statistikprogrammet MYSTAT (en studentversion av SYSTAT 12) användes för behandling och analys av den insamlade datan. Både induktionstid- och rusningsvärdena visade sig avvika från normalfördelning då deras distributionskurvor uppvisade något positivt sned fördelning. Därför log-transformerades värdena för att erhålla normalfördelning. Variansanalyser kunde sedan utföras med log(induktionstid) respektive log(rusningstid) som beroende parameter, bedövningsmedel samt koncentration som oberoende parametrar och fiskarnas längd som kovariat.

Andelen fisk som uppvisade det specifika beteendet analyserades med logistisk regression i statistikprogrammet SAS med support av Erik Petersson, professor i akvatisk ekologi vid SLU. Ingen fisk som blev bedövd med den högre koncentrationen bensokain uppvisade beteendet varpå variansen i modellen blev betydligt högre än medelvärdet. För att justera för det skalades responsvariabeln om med en faktor 0,000079. Detta ger inte en normal log-likelihood funktion utan vad som är känt som quasi-likelihood funktion. Det är möjligt att analysera den här typen av data med en sorts variansanalys, men i stället för F-värden får man ut chitvå-värden som är vanligt vid analys av binomialfördelningar.

3 Resultat

För samtliga bedövningsmedel var induktionstiden kortare vid den högre av koncentrationerna än den lägre (Figur 3). Eugenol var det bedövningsmedel som hade kortast induktionstid, vid den höga koncentrationen låg medianvärdet på 1,1 minuter. Av de låga koncentrationerna hade både eugenol och bensokain den kortaste induktionstiden på 1,3 minuter. Den största skillnaden i induktionstid mellan låg och hög koncentration var för metomidat som låg på 2,6 minuter respektive 1,6 minuter. Den minsta skillnaden var mellan låg och hög koncentration av eugenol som var 1,3 minuter respektive 1,1 minuter. Motsvarande för trikain låg på 1,9 minuter respektive 1,6 minuter och för bensokain gick det från 2,0 minuter till 1,3 minuter. Eugenol var det bedövningsmedel vars induktionstider hade minst spridning medan metomidat var det bedövningsmedel med störst variation, särskilt vid den lägre koncentrationen.

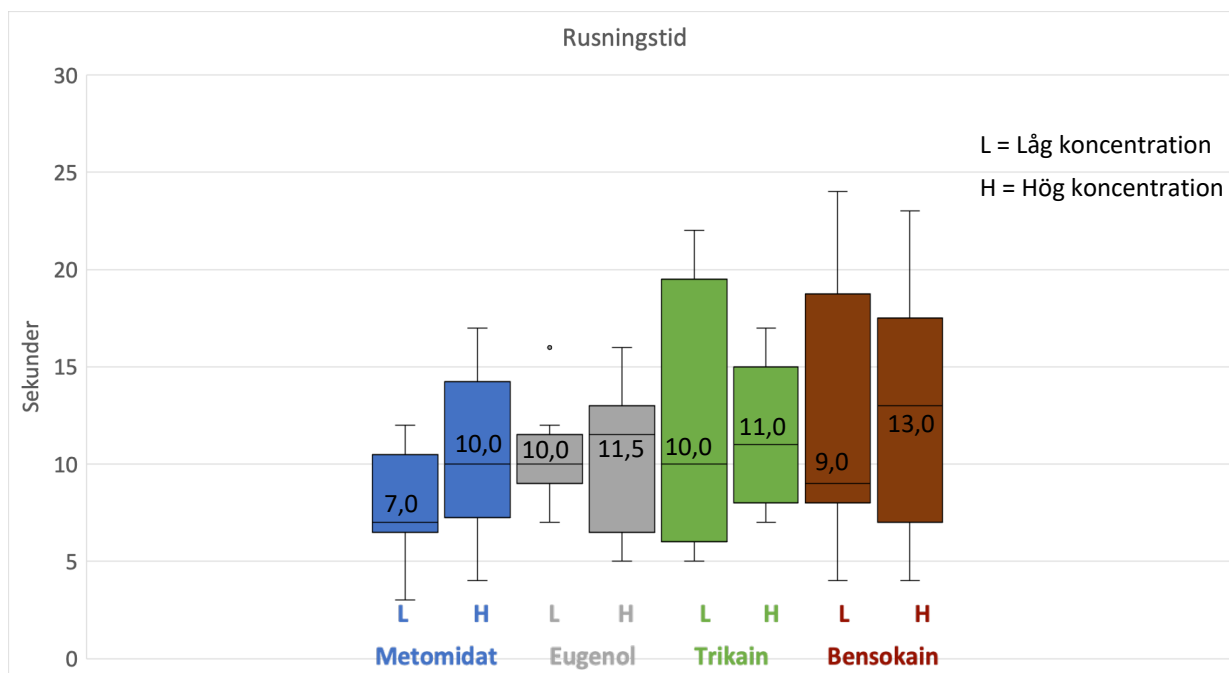


Figur 3. Visar induktionstider i minuter vid bedövning av ettårig, odlad öring vid hög respektive låg koncentration av metomidat, eugenol, trikain samt bensokain. Medianvärden är markerade med horisontell linje och står utmärkta vid respektive låddiagram. Felstaplar sträcker sig till max- respektive min-värde och enskilda punkter är markerade outliers. Se Tabell 2 för låga och höga koncentrationsvärden för varje bedövningsmedel.

Resultaten från den statistiska analysen (Tabell 4) visar att både bedövningsmedel och koncentration för sig hade signifikant påverkan på induktionstid ($P < 0,001$), men även att det fanns en signifikant interaktionsfaktor mellan bedövningsmedel och koncentration ($P = 0,017$). Det innebär att samma relativa koncentrationsförändring av de olika bedövningsmedlen inte hade samma påverkan på induktionstiden. Fiskarnas längd inom det använda intervallet (95 - 140mm) visade sig inte ha någon signifikant påverkan på induktionstiden, med ett P-värde på långt över 0,05 (0,973). Modellens R^2 -värde blev 0,557 vilket innebär att ungefär 56% av variansen för induktionstid kan förklaras av parametrarna bedövningsmedel, koncentration samt fiskarnas längd.

Tabell 4. Visar resultat från en variansanalys utförd i MYSTAT med $\log(\text{induktionstid})$ som beroende parameter. Bedövningsmedel och koncentration är oberoende parametrar, längd är satt som kovariat. Bedövningsmedel*Koncentration står för interaktion där emellan. Modellens R^2 -värde var 0,557. (SS = Sum of Squares, df = degrees of freedom).

	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	P-value
Bedövningsmedel	3,12	3	1,04	14,74	<0,001
Koncentration	2,22	1	2,22	31,54	<0,001
Bedövningsmedel*Koncentration	0,77	3	0,26	3,62	0,017
Längd	0,00	1	0,00	0,001	0,973
Error	5,01	71	0,07		



Figur 4. Visar rusningstider i sekunder vid bedövning av ettårig, odlad öring vid hög respektive låg koncentration av metomidat, eugenol, trikain samt bensokain. Medianvärden är markerade med horisontell linje och står utmärkta vid respektive låddiagram. Felstaplar sträcker sig till max- respektive min-värde och enskilda punkter är markerade outliers. Se Tabell 2 för låga och höga koncentrationvärden för varje bedövningsmedel.

Varken bedövningsmedel eller koncentration hade signifikant påverkan på rusningstiden (Figur 4 och Tabell 5, $P = 0,345$ respektive $P = 0,516$). Modellens R^2 -värde blev 0,083 vilket innebär att endast ungefär 8% av variansen för rusningstid kan förklaras av parametrarna bedövningsmedel, koncentration samt fiskarnas längd.

Tabell 5. Visar resultat från en variansanalys utförd i MYSTAT med $\log(\text{rusningstid})$ som beroende parameter. Bedövningsmedel och koncentration är oberoende parametrar, längd är satt som kovariat. Bedövningsmedel*Koncentration står för interaktion där emellan. Modellens R^2 -värde var 0,083. (SS = Sum of Squares, df = degrees of freedom).

	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	P-value
Bedövningsmedel	0,74	3	0,25	1,13	0,345
Koncentration	0,09	1	0,09	0,43	0,516
Bedövningsmedel*Koncentration	0,28	3	0,10	0,43	0,729
Längd	0,10	1	0,10	0,45	0,506
Error	14,58	67	0,22		

Det bedövningsmedel med högst andel fiskar som uppvisade ett specifikt, uppmärksammat beteende var metomidat; 80% av fiskarna vid den lägre koncentrationen och 44% av fiskarna vid den högre koncentrationen (Tabell 6). För resterande bedövningsmedel var andelen som högst vid den högre koncentrationen av trikain (22%) och som lägst vid den högre koncentrationen av bensokain (0%). Den

fiskindivid som med stor marginal uppvisade beteendet under längst tid (tre minuter och 11 sekunder) blev bedövad med den lägre dosen metomidat.

Tabell 6. Visar andelen fiskar vid olika bedövningsmedel och koncentrationer som uppvisade ett specifikt beteende under bedövningen. Beteendet innebar att fiskarna efter förlorad balans lade sig på sidan men fortsatte röra mycket på stjärtfenan, ofta i cirkulära rörelser, tillsammans med mer eller mindre häftiga sidorörelser med huvudet mot ytan som för att "kippa efter syre" i minst 15 sammanhängande sekunder.

	Metomidat		Eugenol		Trikain		Bensokain	
Koncentration	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög
Andel (%)	80	44	11	11	22	10	11	0

Den logistiska regressionen visade att bedövningsmedel, koncentration och interaktionen dem emellan hade signifikant påverkan på uppvisandet av beteendet då P-värden var <0,001 (Tabell 7). Interaktionen innebär att samma relativa koncentrationsändring inte resulterade i lika stor förändring av frekvens uppvisat beteende för de olika bedövningsmedlen.

Medelvärdesfrekvensen av uppvisat beteende var högre för metomidat än för de övriga bedövningsmedlen (Tabell 8). Parvisa jämförelser visar också att det enda bedövningsmedel som skilde sig signifikant från alla övriga bedövningsmedel var metomidat.

Tabell 7. Visar resultat från en logistisk regression utförd i SAS med andel (frekvens) uppvisat beteende som beroende parameter. (DF = degrees of freedom).

	DF	Chi-square	P-value
Bedövningsmedel	3	1,91×10 ⁹	<0,001
Koncentration	1	1139	<0,001
Bedövningsmedel*Koncentration	3	1,26×10 ⁸	<0,001

Tabell 8. Visar resultat från parvisa jämförelser av frekvens uppvisat beteende mellan de olika bedövningsmedlen. Medelvärden med samma bokstav i höger kolumn är inte signifikant skilda åt på 0,05-nivån.

Bedövningsmedel	Medelvärde±std	Parvisa jämförelser
Bensokain	6,20×10 ⁻⁷ ±4,66×10 ⁻⁶	ab
Eugenol	0,111±5,85×10 ⁻⁶	a
Metomidat	0,641±9,42×10 ⁻⁶	c
Trikain	0.151±6,71×10 ⁻⁶	b

Medelvärdet (korrigerat för typ av bedövningsmedel) för frekvens uppvisat beteende vid hög koncentration var 0,00043±0,0010 jämfört med 0,268±0,0000046 för låg koncentration (medelvärde±medelvärdets standardfel), vilket innebar en statistiskt signifikant skillnad (z=-2.84; p=0,0045).

4 Diskussion

Det ideala bedövningsmedlet har flera önskvärda egenskaper. Några av dem som listas av Iversen et al. (2013) är följande: det har en induktionstid under 15 minuter och allra helst under tre minuter, återhämtningstiden är under fem minuter, det är inte toxiskt för varken fisk, människa eller miljö, det orsakar inga långvariga effekter på fiskens fysiologi eller beteende och det hämmar fiskens respons till olika stressorer.

I den här studien undersöktes bland annat hur olika bedövningsmedel i olika koncentrationer påverkade induktionstiden för ettåriga, odlade öringar. Lämpliga koncentrationer vid användning av olika bedövningsmedel finns sammanställda av Neiffer och Stamper (2009), men uttrycks som riktvärden eftersom de inte täcker alla förhållanden. Enligt sammanställningen ligger rekommenderade koncentrationer runt följande: 2 - 10 mg/L metomidat för lätt bedövning av laxfiskar, 40 mg/L eugenol för upprätthållen bedövning av benfiskar, 50 – 100 mg/L trikain för lätt till djup bedövning av laxfiskar och 40 – 50 mg/L bensokain för bedövning av laxfiskar.

Resultaten visade att eugenol var det bedövningsmedel som hade kortast induktionstid med medianvärde på 1,3 minuter vid den lägre koncentrationen (40 mg/L) och 1,1 minuter vid den högre (80 mg/L). Att eugenol hade kortast induktionstid av de testade bedövningsmedlen stämmer överens med litteraturen och som jämförelse utförde Skår et al. (2017) en bedövningsstudie på sjurygg (*Cyclopterus lumpus*) där 40 mg/L isoeuginol användes på fiskar mellan 10-20g vid en temperatur på 6°C, och där låg induktionstiden på $0,9 \pm 0,1$ minuter. Bedövning med eugenol orsakade också låg spridning mellan induktionstiderna, något som tyder på effektiv och konsekvent bedövning. Den lägre koncentrationen metomidat gav upphov till de längsta induktionstiderna med ett medianvärde på 2,6 minuter, spridningen var dessutom hög och för flertalet fiskar var induktionstiden mer än tre minuter vilket inte är optimalt. Även vid den låga koncentrationen bensokain var induktionstiden över tre minuter i vissa fall. De höga koncentrationerna bensokain och trikain resulterade båda i induktionstider under tre minuter och hade relativt låg spridning. Den statistiska variansanalysen visade att både bedövningsmedel och koncentration för sig hade signifikant påverkan på induktionstiden, men även att det fanns en interaktion dem emellan. Det innebär att induktionstiden för de olika bedövningsmedlen inte påverkades lika mycket av samma relativa koncentrationsförändring. För eugenol gick medianvärdet för induktionstid endast från 1,3 minuter vid låg koncentration till 1,1 minuter vid den högre, medan motsvarande för metomidat gick från 2,6 minuter (lägre) till 1,6 minuter (högre). Även för trikain var skillnaden liten, från 1,9 minuter vid den lägre koncentrationen till 1,6 minuter vid den högre. Skillnaden i induktionstidspåverkan skulle eventuellt kunna bero på att de lägre koncentrationerna av eugenol och trikain (40 mg/L) räckte för att ge en mycket effektiv bedövning, och att högre koncentrationer då inte gjorde så stor skillnad.

Den här studien kunde inte påvisa några skillnader i rusningstid mellan olika bedövningsmedel och koncentrationer. Det fanns vissa svårigheter i bedömningen av hur länge varje fisk rusade. Filmerna med fiskarnas bedövningsprocess studerades upprepade gånger för att bästa möjliga bedömning av total rusningstid skulle kunna göras, men i slutändan fanns alltid en viss grad av subjektivitet med i bilden. En vetenskaplig aspekt som skulle kunna förklara den stora spridningen inom rusningsresultaten är att fiskar kan ha olika stresshanteringsmönster. Gesto (2019) genomförde en studie där regnbågar (*Oncorhynchus mykiss*) identifierades som "proaktiva" eller "reaktiva" baserat på konkurrenskraftighet, i syfte att testa skillnad i stresstålighet. I studien beskrivs konceptet stresshanteringsmönster som "en sammanhängande uppsättning beteendemässiga och fysiologiska stressresponser som är över tid kontinuerliga och är karakteristiska för en specifik grupp av individer". Proaktivt lagda fiskar beskrivs som mer aktiva, aggressiva och risktagande när de utsätts för stressorer, medan reaktivt lagda fiskar tenderar att bete sig passivt och försiktigt i stressande situationer. Eftersom rusning är ett stressrelaterat beteende är dessa potentiella skillnader i fiskarnas disposition värt att ha i åtanke.

Det uppmärksammade bedövningsbeteendet där öringarna efter förlorad balans lade sig på sidan och fortsatte röra på stjärtfena tillsammans med häftiga "sidoknyckningar" var betydligt mer förekommande vid bedövning med metomidat än för de övriga bedövningsmedlen. Vid den låga koncentrationen av metomidat uppvisade 80% av fiskarna beteendet, varav det för en fiskindivid pågick i tre minuter och 11 sekunder. Det kan antas att fisken uppfattar det som stressande att inte kunna upprätthålla balans men fortsätta vara vid medvetande och i rörelse i mer än tre minuter. Orsaken till beteendet är svårt att fastställa men resultaten tyder på att 3 mg/L metomidat kan vara för lågt som koncentration för att ge den effektiva bedövning som eftersöks.

Abiotiska faktorer som syrekoncentration, pH och vattentemperatur har en påverkan på bedövningsmedlens effekt. I samma studie som tidigare nämnts av Skår et al. (2017) visades det att en skillnad i temperatur från 6°C till 12°C ledde till en statistiskt signifikant skillnad i induktionstid. I den här studien mättes inte några abiotiska parametrar men vattnet som användes i de olika bedövningsbaderna tappades upp från samma källa samtidigt så förutsättningarna för de olika bedövningsmedlen borde vara likvärdiga. Eventuellt kan trikainets surhet ha sänkt pH-värdet på bedövningsbadet eftersom ingen buffert tillsattes, något som kan ha haft viss inverkan på resultaten.

Några biologiska faktorer som påverkar bedövningsmedlens verkan är storlek, ålder, kön och inte minst fiskens generella tillstånd innan bedövningen (Sneddon, 2012). Om en fisk befinner sig i ett fysiologiskt stressat skick redan innan bedövningen påbörjas kan det få stora konsekvenser för bedövningsprocessen. I den här studien hade alla fiskar liknande förutsättningar men det var inte möjligt att mäta varje enskild fiskindivids status innan bedövningen, därför bidrar detta med en potentiell felkälla. Att öringarnas längd i den här studien (95 – 140 mm) inte hade någon påverkan på

induktionstiden skulle kunna förklaras av att det längdintervall som användes inte var stort nog för att fiskarna skulle påverkas olika. De var alla ettåriga och odlade under liknande förhållanden så deras fysiologiska skillnader borde vara begränsade.

En felkälla som upptäcktes under studiens experimentella del var att vissa fiskar uppnådde bedövat stadium "stående", eftersom de vilade med bukfenorna mot botten av bedövningsbadet. Detta gav intrycket att de hade bibehållen balans och således även medvetande tills de till slut vidrördes och föll till sidan. Det var möjligt att notera att stjärtfenan slutade röra på sig även när fisken "stod" på det sättet och då kontrollera om fisken var fullt bedövad eller inte, men felmarginalen för induktionstiden kan ha ökat med flertalet sekunder i de fallen.

En betydande aspekt för fastställandet av det bäst lämpade bedövningsmedlet för en fisk är hur snabbt den återhämtar sig efter bedövningen. Resultaten från den här studien saknar det perspektivet och skulle bli mer fullständigt vid en sådan komplettering. Studien är utförd på ettåriga öringar inom storleksintervallet 95 - 140 mm så utökade studier skulle kunna inkludera större fiskar. På grund av fiskars stora artvariation skulle det också vara av intresse att mäta kortisolnivåerna i blodet efter bedövningarna för att se bedövningsmedlens verkan på öringarnas stressrespons.

4.1 Slutsats

Baserat på induktionstid och beteende under bedövningen rekommenderas 40 mg/L eugenol som bedövningsmedel för ettåriga, odlade öringar inom längdintervallet 95 - 140 mm vid en vattentemperatur runt 3 - 4°C. Den marginella skillnaden i induktionstid mellan den lägre och högre koncentrationen kan bortses ifrån och den lägre rekommenderas eftersom mindre åtgång av bedövningsmedel är att föredra. Valet är baserat på eugenolens korta induktionstid och den effektiva bedövning som indikeras av den låga spridningen mellan fiskar. Det är utöver det en naturlig produkt med låg toxicitet och har en stressreducerande effekt.

Även de högre koncentrationerna trikain och bensokain (80 mg/L) kan användas som bedövningsmedel med god effekt och induktionstid under tre minuter men rekommenderas inte i första hand baserat på de belägg som finns för att de orsakar förhöjda kortisolnivåer hos fisk vilket kan leda till bland annat immunosuppression.

Eftersom 3 mg/L metomidat gav upphov till att en stor andel fiskar uppvisade ett beteende som anses kunna vara stressande för fisken bör det inte användas för bedövning av öring under förhållanden som liknar studiens.

Studiens rekommenderade koncentrationer för eugenol och trikain ligger inom det intervall som presenterats av Neiffer och Stamper (2009), men för bensokain rekommenderas högre koncentration och för metomidat avrådes det lägre intervallet.

5 Referenser

Akbulut, B., Çakmak, E., Aksungur, N. och Çadvar, Y. (2009). Effect of Exposure Duration on Time to Recovery from Anaesthesia of Clove Oil in Juvenile of Russian Sturgeon. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 11: 463-467.

Artdatabanken SLU (2022). Öring (*Salmo trutta*).

<https://artfakta.se/naturvard/taxon/salmo-trutta-100127> [2022-04-20]

Corso, MN., Marques, LS., Gracia, LFG., Rodrigues, RB., Barcellos, LJG. och Streit Jr, DP. (2018). Effects of different doses of eugenol on plasma cortisol levels and the quality of fresh and frozen-thawed sperm in South American catfish (*Rhamdia quelen*). *Theriogenology* 125 (2019) 135–139.

Gesto, M. (2019). Consistent individual competitive ability in rainbow trout as a proxy for coping style and its lack of correlation with cortisol responsiveness upon acute stress. *Physiology and behavior*. 208 (2019) 112576.

Global seafood alliance (2014). Clove oil, eugenol effective anesthetics for silver catfish. <https://www.globalseafood.org/advocate/clove-oil-eugenol-effective-anesthetics-for-silver-catfish-other-brazilian-species/> [2022-04-17]

Havsmiljöinstitutet (2022). Öring. <https://www.sverigesvattenmiljo.se/undersoka-vattenmiljo/oring> [2022-04-07]

Havs och vattenmyndigheten (2022) Fisk- och skaldjursbestånd i hav och sötvatten 2021. <https://www.slu.se/globalassets/ew/org/inst/aqua/externwebb/sidan-publikationer/resursoversikten/resursoversikt-2021-220307-mindre.pdf> [2022-05-21]

Iversen, MH., Økland, F., Thorstad, EB. och Finstad, B. (2013). The efficacy of Aquis vet. (iso-eugenol) and metomidate as anaesthetics in European eel (*Anguilla anguilla* L.), and their effects on animal welfare and primary and secondary stress responses. *Aquaculture Research* (2013) 44, 1307–1316.

Jalmlöv, M., Stéen, M. och Röcklinsberg, H. Kan fiskar känna smärta och/eller uppleva lidande? Swedish Centre for Animal Welfare, SLU.

Jordbruksverket (2022). Vattenbruk. <https://jordbruksverket.se/utveckla-foretagande-pa-landsbygden/vattenbruk-och-fiske/vattenbruk> [2022-04-05]

Neiffer, DL och Stamper, MA. (2009). Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR Journal*. 50(4).

Palić, D., Herolt, DM., Andreassen, CB., Menzel, B. och Roth, JA. (2006). Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture* 254 (2006) 675–685.

Skår, MW., Haugland, G., Powell, MD., Wergeland, HI. och Samuelsen, OB. (2017). Development of anaesthetic protocols for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): Effect of anaesthetic concentrations, sea water temperature and body weight. *Plos One*. 12(7): e0179344.

Small, BC. (2003). Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218 (2003) 177–185.

Sneddon, L. (2012) Clinical anesthesia and analgesia in fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 32-43.

Svenskt vattenbruk (2020). Öring (*Salmo trutta*).
<https://www.svensktvattenbruk.se/46/att-driva-vattenbruk/exempel-pa-arter-inom-vattenbruk/oring.html> [2022-04-13]

Toni, M., Manciocco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C. och Malavasi, S. (2018). Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. *Animal* (2019), 13:1, pp 161–170.

Zahl, IH., Samuelsen, O. och Kiessling, A. (2011). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem* (2012). 38:201–218.