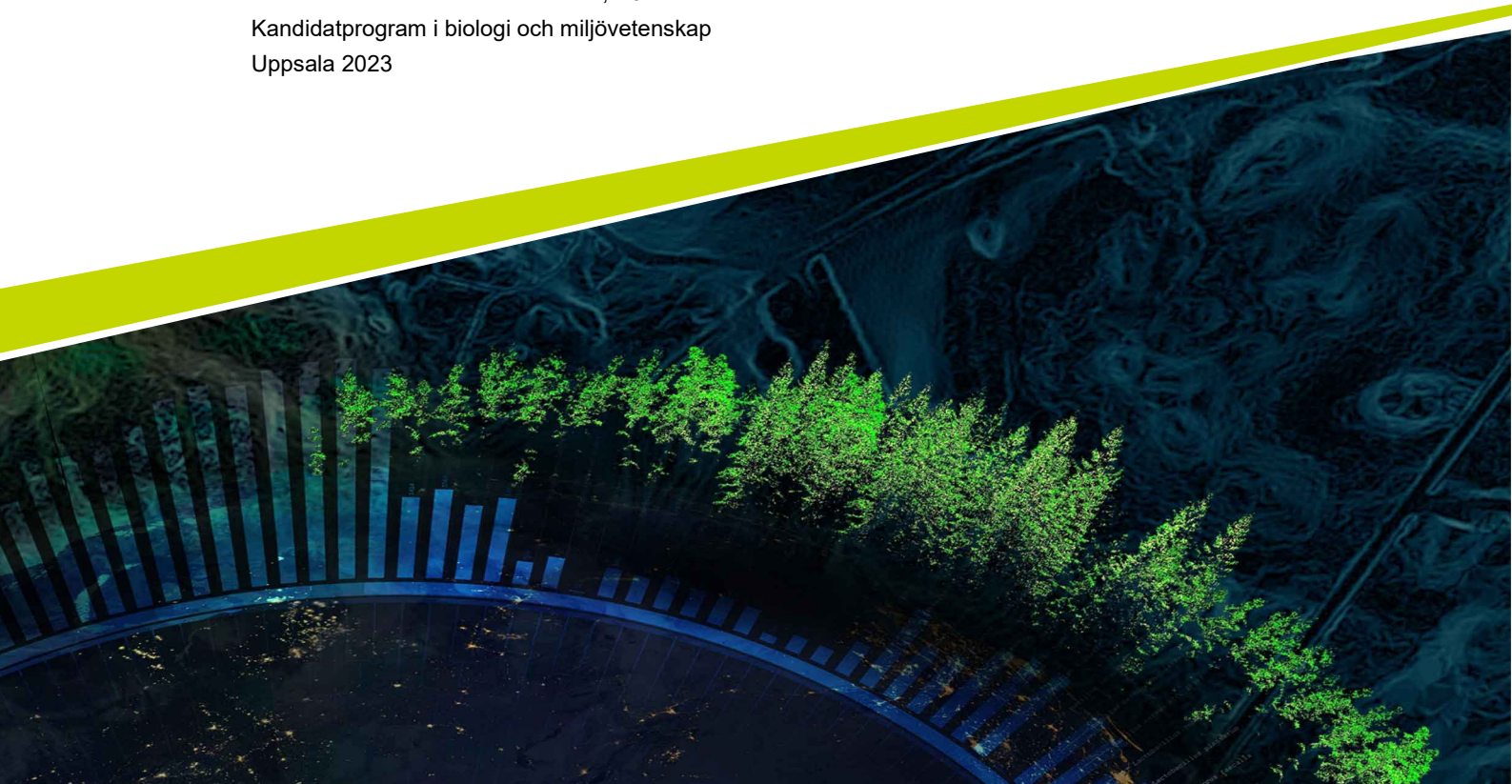




Stress vid bedövning av öring (*Salmo trutta*)

Ella Andersson

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för Akvatiska resurser, NJ-fakulteten
Kandidatprogram i biologi och miljövetenskap
Uppsala 2023



Stress vid bedövning av öring (*Salmo trutta*)

Ella Andersson

Handledare: Erik Petersson, SLU, Institutionen för akvatiska resurser
Bitr. handledare: Svante Winberg, Uppsala universitet, Institutionen för medicinsk cellbiologi
Bitr. handledare: Ann-Britt Florin, SLU, Institutionen för akvatiska resurser
Examinator: Andreas Bryhn, SLU, Institutionen för akvatiska resurser

Omfattning: 15 hp
Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E
Kurstitel: Självständigt arbete i Miljövetenskap, G2E
Kurskod: EX0896
Program/utbildning: Kandidatprogram i biologi och miljövetenskap
Kursansvarig inst.: Institutionen för Akvatiska resurser
Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2023
Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

Nyckelord: fisk, stress, bedövning, kortisol, öring

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap
Institutionen för akvatiska resurser
Sötvattenslaboratoriet

Sammanfattning

Vattenbruk är i Sverige en allt växande marknad med stor potential, både för att bevara sårbara fiskpopulationer och för att producera hållbara animaliska livsmedel. I takt med att fler fiskar odlas för forskning, konsumtion och utsättning ökar behovet av bra och etisk djurhållning. För att minska fiskarnas lidande används bedövningsmedel vid stressande hantering. Hur olika fiskararter reagerar på stress och bedövning varierar och olika bedövningsmedel har olika effekt. Även bedövningen kan orsaka stress. Det krävs forskning för att komma fram till hur fiskarna ska hanteras på bästa möjliga sätt. Denna studie har undersökt hur stressade öringar (*Salmo Trutta*) blir vid bedövning med bensokain, trikain metansulfonat (MS-222), metomidat och eugenol genom att mäta halter av stresshormonet kortisol i blodplasman. Kontrollbehandlingar med vatten, saltsyra (HCl) och etanol användes för att utesluta att utomstående förhållanden hade effekt på resultatet. Resultatet gav att lågt pH gav högre stress men att det inte fanns något signifikant samband mellan stress och behandling. Enligt denna studie kan inget specifikt bedövningsmedel därför påstås vara bättre än något annat för att minska stress hos öringar. Det återfanns inte heller någon signifikant skillnad i stress mellan bedövade fiskar och de som genomgått kontrollbehandlingar. Ett signifikant samband fanns dock mellan kortisolhalt och när proverna genomfördes. De senare proverna gav högre kortisolhalter. Dessa samband, eller brist på sådant, indikerar att det är hanteringen i sig, mer än behandlingen, som orsakar stressen. Slutsatsen som kan dras är att det är viktigt att hantera fiskarna så lite som möjligt och göra hanteringstiden kortare för att minska stressen.

Nyckelord: fisk, stress, bedövning, kortisol, öring.

Abstract

Aquaculture is an ever growing market in Sweden with a large potential when it comes to sustainable production of animal foods and preserving vulnerable wild populations. As more and more fishes are farmed for research, food and to be released into the wild the need for sustainable and ethical husbandry grows. To minimize fish suffering in potentially harmful or stressful situations anesthesia is used. Different fish species react differently to both stress and different kinds of anesthetics. The anesthetics themselves can cause stress. More research is needed to come up with the least harmful procedures possible in aquaculture. This study compared the stress response in brown trout (*Salmo Trutta*) when treated with benzocaine, tricaine methanesulfonate (MS-222), metomidate and eugenol by measuring the stress hormone cortisol in the blood plasma. To eliminate other factors that could affect the results, control treatments of water, hydrochloric acid (HCl) and ethanol were used. The results showed that a lower pH results in higher stress levels but showed no significant association between stress and treatment. This study cannot recommend any of the anesthetics above the others. Whether the fishes were put through anesthesia or a control treatment did not have a significant effect on the cortisol levels. However, a significant correlation between when the sample was taken and the cortisol levels were found. The later samples yielded higher cortisol levels. These correlations, or lack thereof, indicate that it is the handling, rather than the treatments, that cause the stress in the fish. The conclusion that can be drawn from this is that in order to reduce stress one should aim to handle the fishes as little as possible and shorten the time during which they are handled.

Keywords: fish, stress, anesthesia, cortisol, brown trout.

Innehållsförteckning

Inledning	5
Bakgrund	7
2.1 Bedövningsmedel	7
2.2 Stress hos fiskar.....	7
2.2.1 Stressrespons.....	8
2.2.2 Kortisol.....	8
2.3 Syfte.....	9
Metod och material	11
3.1 Öring	11
3.2 Bedövningsförsök.....	11
3.2.1 Bensokain	12
3.2.2 MS-222 (Trikain metansulfonat)	12
3.2.3 Metomidat	12
3.2.4 Eugenol.....	12
3.2.5 Induktionstid.....	13
3.2.6 Kontroller.....	13
3.3 Genomförande av bedövningsförsöket.....	14
3.4 ELISA	15
3.5 ELISA-analys	16
3.5.1 Förberedelse av prover.....	16
3.5.2 Brunnarna	17
3.6 Statistisk analys	17
Resultat	19
4.1 Induktionstid	19
4.2 Kortisolkoncentration	19
Diskussion	24
5.1 Framtida arbeten.....	26
5.2 Slutsats	26
Referenser	27

Inledning

Vattenbruk med produktion av djur och växter är en stadigt utvecklande del av det svenska jordbruket och i resten av världen (Vattenbruksutredningen 2009). Det svenska vattenbruket har produktion av matfisk (Jordbruksverket 2022), kompensationsodling för att stärka populationer vid tillväxtbortfall på grund av kraftverksdammar och sättfisk. Sättfisk flyttas mellan anläggningar eller placeras ut i vattendrag, sjöar eller havet för att stötta de vilda populationerna. Sportfisket gynnas av att fiskar sätts ut i svenska vatten (Vattenbruksutredningen 2009). Fiskodlingen är en viktig del av livsmedelsförsörjningen (Jalmlöv et al., 2011). Ca 9% av Sveriges yta tas upp av sjöar och vattendrag och ett utvecklande vattenbruk kan nyttja dessa resurser på ett hållbart sätt (Vattenbruksutredningen 2009). Mängden fiskar som odlas för användning inom forskning ökar också stadigt (Toni 2019).

Ett ökande vattenbruk kan medföra mycket positivt. Genom att placera fiskodlingar i urlakade kraftverksdammar kan halterna av näringssalter i vattnet öka och fiskodlingen får en restaurerande effekt. Musselodlingar längs kusterna kan rena vattnet och ta upp näring och på så sätt minska övergödningen. Dessutom skapar vattenbruket arbetsmöjligheter på landsbygden. Fiskodling är ett miljömässigt bra alternativ för produktion av animaliska produkter för konsumtion (Vattenbruksutredningen 2009).

Vattenbruket möter samma utmaning som alla typer av djurhållning gör när det kommer till djurskydd och djurvälstånd. Fiskodling regleras av djurskyddslagen (Vattenbruksutredningen 2009). Där står det i 2 kap 1§ att djur ska skyddas från onödigt lidande (SFS 2018:1192). Processer i odlingen kan vara skadliga och stressande för fiskarna. För att underlätta hantering som sortering och transport föser man ihop fiskarna vilket kan vara stressande. Slakten av fiskarna kan orsaka stress och smärta (Jalmlöv et al. 2011). För att minska fiskarnas lidande i stressande eller smärtsamma situationer krävs det enligt lag någon form av bedövning (Holloway et al. 2004). Hanteringen under själva bedövningsproceduren eller fiskens reaktion på bedövningsmedlen kan dock orsaka stress (Small 2003, Neiffer & Stamper 2009) så att bedövningen blir kontraproduktiv. Olika bedövningsmedel verkar på olika

sätt och de kan ha olika effekter på fiskarnas stress (Neiffer & Stamper 2009, Holloway et al. 2004).

Bakgrund

2.1 Bedövningsmedel

Om fiskar känner smärta eller inte är en fråga som debatterats länge och kan ses som ett kontroversiellt ämne (Sneddon 2006). Det kommer allt fler studier som tyder på att svaret är ja på den frågan. Som ansvariga för fiskhanteringen är det enligt Brown (2011) vårt ansvar att minska fiskarnas lidande. Bedövning av fiskar har använts sedan tidigt 1900-tal, då för att förenkla hanteringen. Syftet med bedövning idag är för att öka fiskarnas välmående (Zahl et al. 2011). Bedövning används bland annat vid transporter, hantering av fiskar, vid vaccinering och märkning (Brown 2011).

Den vanligaste sättet att administrera bedövningsmedel för fisk är att lösa medlen i vattnet. Bedövningsmedlet tas sedan upp av fiskarna via gälarna och via blodet påverkas det centrala nervsystemet. Olika bedövningsmedel verkar på olika sätt och deras effekter kan variera mellan olika grader av smärtlindring och lugnande effekt. Vid bedövning tappar fiskarna balansen, rörlighet, medvetande och reflexer (Zahl et al. 2011). Respirationen och blodcirkulationen kan påverkas negativt av bedövning (Brown 2011).

De bedövningsmedel som användes i studien var bensokain, trikain metansulfonat (MS-222), eugenol och metomidat.

2.2 Stress hos fiskar

Många olika faktorer kan orsaka stress hos fiskar. Några exempel på sådana stressorer är hantering, fysiska förändringar i vattnet, interaktioner med andra organismer och vattenföroreningar. Hantering kan till exempel vara transport, infångning och trång förvaring. Fysiska förändringar kan vara parametrar som snabba, och kraftiga, temperaturförändringar, eller förändrad turbiditet och salinitet. Interaktioner med andra organismer kan till exempel vara konkurrens, predation och parasitism. Vattenföroreningar kan vara alla sorters skadliga ämnen

som tungmetaller eller organiska kemikalier eller ämnen som förändrar vattnets fysiska egenskaper, till exempel pH-ändringar (Wendelaar Bonga 1997).

Generellt är fiskars stressrespons lik den hos landlevande vertebrater. Skillnaderna uppstår främst i närkontakten fiskarna har med sin miljö genom gälarna och genom att dricka vattnet de simmar i. Denna kontakt gör att de tar upp ämnen från vattnet genom diffusion över gälarna och de kan reagera på och bli stressade av mycket låga halter av stressande ämnen i vattnet (Wendelaar Bonga 1997).

2.2.1 Stressrespons

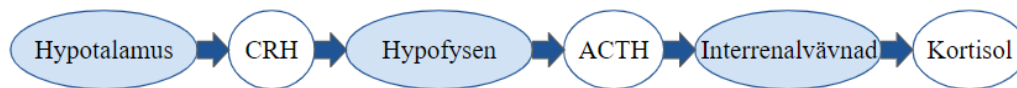
Hur olika fiskarter reagerar när de blir stressade varierar. Fiskar är en väldigt stor grupp med drygt 30 000 arter (Naturhistoriska riksmuseet 2022) så många olika anpassningar förekommer för att hantera stressen. Generellt sett består stressresponsen av tre nivåer (Wendelaar Bonga 1997). Den primära stressresponsen innebär utsöndring av stresshormon som kortisol och adrenalin. Kroppens reaktion på dessa hormoner utgör den sekundära responsen. Det kan vara ökad blodcirkulation, förändrad andning och ökat blodsocker (Jalmlöv et al. 2011). Den tertiära responsen uppstår genom påverkat beteende på individnivå och på populationsnivå när hela bestånd av fisk utsätts för stress under längre perioder. På lång sikt påverkar stressen fiskarnas tillväxt, reproduktion och immunsystem genom att omprioritera fiskarnas energi (Sadoul & Geffroy 2019).

2.2.2 Kortisol

Ökat kortisol i blodplasman är en del av den primära stressresponsen (Jalmlöv et al. 2011) och det är den mest använda indikatorn på stress (Sadoul & Geffroy 2019). När fisken vilar är kortisolhalterna mycket låga (<5 ng/ml) i laxfiskar. Vid stress kan dessa halter öka till upp till 100 gånger den basala nivån (Wendelaar Bonga 1997). För att mäta kortisolnivåerna använder man fiskarnas blodplasma (Scott et al. 2008). Fiskens kortisolnivåer ökar någon minut efter att fisken blivit utsatt för stress. Återhämtningstiden varierar med art men det tar vanligtvis någon timme för fisken att komma tillbaka till normala nivåer. En svårighet som uppkommer i samband med stressmätning är att hanteringen som krävs för att ta proverna blir stressande för fiskarna och kan påverka resultatet. Det är också svårt att göra mätningar i fält (Wendelaar Bonga 1997). När en fisk plockas upp för behandling påverkas även de andra fiskarna kvar i kärlet (Scott et al. 2008) vilket kan resultera i snedfördelade resultat när flera fiskar undersöks. Det forskas mycket på området, på allt ifrån hur mekanismerna fungerar inne i fiskarna till hur de upplever stressen och hur man kan mäta kortisol på ett mindre invasivt sätt (Wendelaar Bonga 1997, Scott et al. 2008).

Produktion av kortisol

När fisken blir stressad så produceras kortisol (figur 1). I hypotalamus produceras kortikotropin-frisättande-hormon (CRH) som transporteras till hypofysen. Där produceras adrenokortikotropiskt hormon (ACTH) som transporteras till interrenalvävnaden som är belägen i fiskens njure. Denna mekanism kallas för HPI-axeln (hypothalamic-pituitary-intrarenal axis) (Boulton 2014). Interrenalvävnaden producerar och frigör kortisol (Wendelaar Bonga 1997).



Figur 1. HPI-axeln. I hypotalamus produceras CRH som transporteras till hypofysen. Därifrån transporteras ACTH till interrenalvävnaden där den slutliga produktionen och utsöndringen av kortisol sker.

Kortisolproduktionen regleras av negativ feedback. Feedbackens mekanism fungerar genom att högre halter av kortisol hämmar hypofysens produktion av ACTH vilken reglerar den fortsatta kortisolproduktionen (Wendelaar Bonga 1997).

Fysiologiska effekter av kortisol

Den sekundära stressresponsen, det vill säga de fysiologiska effekterna, av de höga blodkoncentrationerna kortisol och adrenalin leder till förändringar i energimetabolismen och salt-vattenbalansen. Fiskens energi omdirigeras från mindre akuta funktioner som reproduktion och immunförsvar till att förse hjärna och skelettmuskler med energisubstrat i form av kolhydrater, protein och fett. Mer blod går till muskler som de kan använda för att ta sig ur den stressade situationen och blodsockret ökar. Blodcirkulationen ökar och större delar av gälarna används för respiration. Det gör att diffusionen över gälarna ökar och salt-vattenbalansen rubbas vilket kan ge allvarliga effekter på fiskens fysiologiska funktioner och överlevnad. Na- och Cl-transporten fungerar sämre. I saltvatten innebär detta att det blir för mycket salter i kroppen eftersom saltöverskottet inte kan åtgärdas och i sötvatten innebär det saltunderskott på grund av förlust av joner och upptag av vatten vid gälarna (Wendelaar Bonga 1997). Dessa fysiologiska effekter verkar på individnivå men när alla individer påverkas så uppstår det på lång sikt tertiära responser på populationsnivå. Det kan vara problem med sjukdomar och den minskad reproduktion (Jalmlöv et al. 2011).

2.3 Syfte

Syftet med denna studie var att undersöka hur öringar (*Salmo trutta*) reagerar på behandling med olika bedövningsmedel. Detta görs genom att studera

kortisolresponsen i blodet och hur olika faktorer, som typ av behandling, induktionstid och fiskarnas storlek påverkar den responsen.

Metod och material

Studien är uppdelad i bedövningsförsök, laborationsarbete med ELISA-analys och statistisk analys av resultatet. Bedövningsförsöken genomfördes den 27e mars 2023 på SLU:s fiskeriförsöksstation i Älvkarleby. Stationen har godkänts av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (Dnr 5.8.18-07601-2021) och tillståndet har blivit kompletterat med en ändringsansökan (5.8.18-02105/2023).

3.1 Öring

Studien genomfördes på öringar odlade på SLU:s fiskeriförsöksstation i Älvkarleby. Öring är en populär fiskart som är nära besläktad med atlantlax (*Salmo salar*). I sportfisket är det en favorit och den är uppskattad som matfisk (Svenskt vattenbruk 2020). Den finns i hela landet, både längs kusten och i vattendrag ända upp på fjällen (Havs- och vattenmyndigheten 2018). De föds och leker i sötvatten och sedan vandrar havsöringen till kusten och lever i havet medan insjö- och bäcköringar lever hela sina liv i sötvatten (Svenskt vattenbruk 2020).

Öring odlas som sättfisk i bevarandesyfte och för att stärka sportfisket men inte med storskalig livsmedelsproduktion som syfte (Svenskt vattenbruk 2020). Tillsammans med regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) är det den mest utsatta sättfisken (Jordbruksverket 2022). Eftersom vandrigen i vattendragen försvåras kraftigt av vattenkraften sker kompensationsodling av vattenkraftsbolagen. De är skyldiga att odla laxfiskar för utsättning för att kompensera fiskindustrin för den minskade produktionen. Odling av öring sker på knappt sextio anläggningar runt om i landet (Svenskt vattenbruk 2020).

3.2 Bedövningsförsök

Bedövningsförsöket gjordes med sju olika behandlingar för att studera induktionstid och kortisolkoncentrationer i fiskarnas blod från de olika behandlingarna. Fyra av dessa var bedövningsbehandlingar med bedövningsmedlen bensokain, MS-222, metomidat och eugenol. Tre behandlingar var kontrollbehandlingar med saltsyra (HCl), etanol och vatten.

3.2.1 Bensokain

Bensokain är inte lösligt i vatten och måste därför lösas i ett organiskt lösningsmedel, till exempel etanol, innan det kan användas (Brown 2011). Bensokain har låg toxicitet och det påverkar inte fiskarnas utveckling eller reproduktion. Det bryts lätt ner i vattnet och är enkelt att filtrera bort vilket gör att risken för läckage och spridning är liten (Neiffer & Stamper 2009). Medlet verkar genom att blockera natriumjon-kanaler (Na^+ -kanaler) vilket i sin tur gör att neuronerna påverkas. Eftersom neuronerna är beroende av laddningsgradienter för att kunna skicka signaler till och från hjärnan innebär de blockerade kanalerna att neuronerna slutar fungera. Detta innebär att det inte kan gå några nervsignaler så att fisken inte kan röra sig och blir paralyserad. Bensokain transporteras genom blodet ut i hela kroppen vilket gör att medlet har en helkroppseffekt. Det finns risk för negativa effekter då pulsen och respirationen kan öka. Detta leder till ökat blodsocker och försämrad respiration vilket kan leda till hypoxi (för låg syrehalt i blodet) (Zahl et al. 2011).

3.2.2 MS-222 (Triikain metansulfonat)

Triikain metansulfonat, ofta kallat för MS-222, är ett derivat av bensokain (Neiffer & Stamper 2009) och det är ett av de vanligaste bedövningsmedlen för fisk. Det används inom veterinärmedicin och är ett av de få bedövningsmedlen som får användas på fisk som odlas för konsumtion. MS-222 verkar, likt bensokain (Zahl et al. 2011) genom att blockera Na^+ -kanaler vilket i sin tur påverkar fiskarnas muskler och rörelseförmåga. När det används i vatten med låg buffertkapacitet kan det leda till sänkt pH (Brown 2011) men detta kan undvikas genom att tillsätta natriumbikarbonat (NaHCO_3) som buffert (Neiffer & Stamper 2009). Studier har visat att bedövning med MS-222 kan aktivera kortisolproduktionen (Palić et al. 2006).

3.2.3 Metomidat

Metomidat kan ha mer lugnande än bedövande effekt på fiskarna. Brown (2011) rekommenderar att de ska användas för att potentiellt minska stress men inte som ett bedövande eller smärtlindrande medel. Metomidat har hög vattenlöslighet. Ämnet hindrar kortisolresponsen genom att blockera frisättning av ACTH-hormon i HPI-axeln. Det ger en lugnande effekt som kan utnyttjas vid mindre procedurer. Respirationen påverkas inte och musklerna kan fortsätta röra sig (Neiffer & Stamper 2009).

3.2.4 Eugenol

Eugenol används ofta inom forskning och vattenbruk vid hantering av fiskar (Holloway et al. 2004). Det är effektivt, billigt och enkelt att använda så eugenol

kan ses som framtiden för bedövningsmedel för fiskar (Palić et al. 2006). Medlet är svårslösligt i vatten, framför allt vid låga temperaturer och brukar därför lösas i etanol innan användning. Eugenol är en olja som kan lägga sig på gälarna och därför kan skadliga effekter i form av respirationsproblem uppstå (Neiffer & Stamper 2009). Ämnet tas snabbt upp i blodet men det tar lång tid för fiskarna att komma tillbaka till ett normalt tillstånd efter exponering på grund av påverkan på andningen (Brown 2011). Eugenol minskar produktionen av stresshormonet kortisol genom att blockera HPI-axeln. Exakt hur HPI-axeln blockeras är okänt men en hypotes är att stressresponsen hämmas redan innan hypotalamus aktiveras så det är trots att eugenol verkar tidigt i kortisolprocessen (Cunha et al. 2010).

3.2.5 Induktionstid

Induktionstiden är den tid det tar för bedövningsmedlet att verka. Det är tiden mellan att fisken placeras i vattnet till att all muskelverksamhet upphör och fisken tappar balansen och lägger sig på sidan. Många olika faktorer kan påverka hur lång induktionstiden är. Till exempel gör högre pH att MS-222 verkar snabbare (Topic Popovic et al. 2012) och låg temperatur brukar ge en längre induktionstid (Neiffer & Stamper 2009). Även faktorer som kroppsvikt, fiskart, kön och nivå av stress påverkar induktionstiden (Topic Popovic et al. 2012). Det finns forskning på hur långa induktionstiderna för bedövningsmedlen bör vara. Zahl et al. (2011) skriver att vanliga induktionstider för bedövningsmedel är under 3 minuter medan Neiffer & Stamper (2009) skriver att induktionstiden är 5–10 minuter vid lämplig dos. Lämpliga doser, skriver Neiffer & Stamper (2009), av bensokain, MS-222 och eugenol är mellan 25 och 200 mg/l och 5–10 mg/l för metomidat. De doser som användes för detta försök är alltså inom spannet för att anses som lämpliga.

3.2.6 Kontroller

Många olika faktorer kan påverka fiskars stressnivåer (Wendelaar Bonga 1997). För att utesluta att andra parametrar än just bedövningen orsakar stress vid försöken användes kontroller i studien.

Saltsyra-kontroll

MS-222 kan sänka pH i vattnet om ingen buffert tillsätts (Neiffer & Stamper 2009). För att undersöka om det är vattnets låga pH som orsakar stressen används en kontrollbalja med HCl som sänker pH till ungefär 3.

Etanol-kontroll

Då eugenol och bensokain inte är vattenlösliga löses dessa i etanol innan de blandas med vatten (Brown 2011, Neiffer & Stamper 2009). Etanolen i sig kan vara

stressande och därför används en etanolkontroll utan bedövningsmedel för att undersöka om det är etanolen som orsakar stressen.

Vatten-kontroll

Hanteringen som bedövningen innebär och förflyttningen till en ny miljö kan vara stressande (Scott 2008). Därför bör resultaten jämföras med resultatet från fiskar som hanteras på samma sätt men bara placeras i vatten i stället för bedövningsmedel.

3.3 Genomförande av bedövningsförsöket

Förberedelse

Fyra baljor för bedövning och tre kontrollbaljor förbereddes. Varje balja fylldes med 4 liter älvvatten (ca 1°C). Baljorna märktes och stamlösning av bedövningsmedlen tillsattes (tabell 1) för att uppnå koncentrationerna 80mg/L för bensokain, eugenol och MS-222, och koncentrationen 6 mg/L för metomidat. I HCl kontrollen sänktes pH till 3 och 1% etanol tillsattes till etanolkontrollen.

Tabell 1. Tillsatta mängder av substrat till behandlingsbaljor.

Balja	Mängd
Bensokain	5,12 ml
Metomidat	24 mg
Eugenol	6,4 ml
MS-222	25,6 ml
Etanol	4,04 ml
H ₂ O	
HCl	Till pH 3

En bedövningsbalja med älvvatten och högkoncentrerad MS-222 för slutlig bedövning förbereddes.

Bedövningsförsök

Denna process gjordes med 10 fiskar per behandling. Totalt användes 70 fiskar. Öringarna placerades i en balja och fick ligga tills muskelverksamheten upphörde i bedövningsbaljorna. I kontrollbaljorna fick fiskarna ligga i 180 sekunder. Samtliga öringar placerades sedan i baljan med högkoncentrerad MS-222 för att bli helt bedövade.

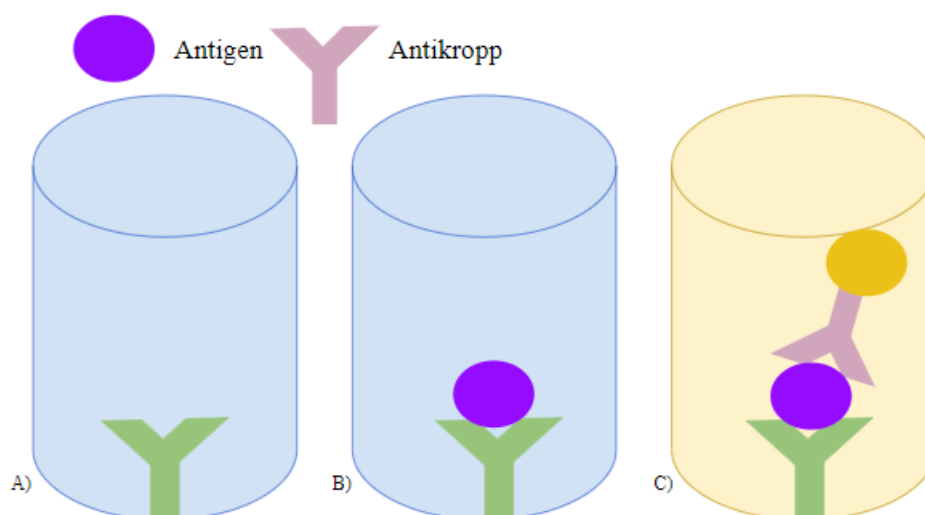
Fiskarnas vikt och längd från nosen till början på stjärtfenan noterades. Blodprov togs bakom analfenan i caudal sinus (blodådran vid ryggraden) med hjälp av sprutor. I sprutorna fanns en liten mängd etylendiamintetraättiksyra (EDTA) för att motverka koagulering av blodet.

Blodet centrifugerades någon minut och plasman separerades med hjälp av pipett och sparades i separata Eppendorf-rör. Proverna frystes ner och förvarade vid -80°C till analys.

3.4 ELISA

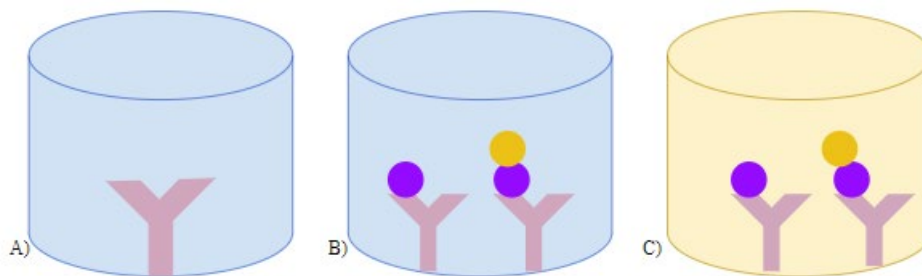
För att analysera kortisolmängderna i proverna användes analysmetoden ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). Metoden togs fram på 70-talet (Lequin 2005) och är en välanvänd metod för att identifiera och kvantifiera specifika ämnen (antigener) i prover på laboratorier och inom forskning (Leng, et al 2008).

Direkt-ELISA är den enklaste varianten av ELISA (figur 2). Vid den typen av analys så används en brunn täckt med specifika antikroppar. Den antigen som undersöks, kortisol i detta fall, binder till antikropparna i brunnen. Sedan tillsätts konjugerade antikroppar (R&D Systems u.å.). Konjugerade antikroppar har ett enzym kopplade till dem (Papyrus Bio 2021). Substrat tillsätts som i reaktion med det konjugerade enzymet får lösningen att ändra färg. För att kvantifiera kortisolmängden mäts sedan färgen (absorbansen) i brunnen (Leng et al. 2008).



Figur 2. Direkt-ELISA. A) En brunn är täckt med specifika antikroppar. B) Antigener från provet binder till de specifika antikropparna. C) Konjugerade antikroppar och substrat tillsätts. Detta får lösningen att ändra färg baserat på hur mycket antikroppar som finns bundna.

En annan variant av ELISA, och den metod som användes för detta arbete, är kompetitiv-ELISA (figur 3) vilket används för mindre molekyler där det inte finns plats för två stora antikroppar att binda. Brunnen är täckt med specifika antikroppar, likt direkt-ELISA. När provet tillsätts så tillsätts även andra konjugerade antigener. Dessa tävlar med antigenerna från provet om att binda till antikropparna. När substratet tillsätts är det de konjugerade antigenerna som får lösningen att ändra färg. Är det få antigener från provet kommer många konjugerade antigener att finnas och lösningen kommer få en starkare färg (R&D Systems u.å.).



Figur 3. Kompetitiv-ELISA. A) En brunn är täckt med specifika antikroppar. B) Antigener från provet och konjugerade antigener tillsätts och binder till de specifika antikropparna. C) Substrat tillsätts. Detta får lösningen att ändra färg baserat på hur mycket konjugerade antigener som finns bundna.

3.5 ELISA-analys

ELISA-analysen genomfördes med hjälp av ThermoFischers Cortisol Competitive ELISA Kit (ThermoFisher u.å.). Alla delarna i kittet tinades till rumstemperatur innan användning. Proverna tinades långsamt på is.

3.5.1 Förberedelse av prover

Samtliga nödvändiga lösningar och prover förbereddes. Analysbuffert förbereddes genom att blanda 14 ml analysbuffertkoncentrat (5x) med 56 ml avjoniserat vatten. Tvättbuffert förbereddes genom att blanda 15 ml tvättbuffertkoncentrat (20x) med 285 ml avjoniserat vatten. Det förbereddes standardlösningar med kända kortisolkoncentrationer för att kunna beräkna kortisolkoncentrationerna i varje prov utifrån absorbansen. Åtta lösningar med koncentrationer på 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 respektive 0 pg/ml gjordes. 50 µl kortisolstandard blandades med 450 µl analysbuffert för att göra 3200 pg/ml-lösningen. 50 µl av denna lösning blandades sedan med 450 µl analysbuffert för att göra 1600 pg/ml-lösningen. Denna process fortsatte tills att 50 µl av 100 pg/ml-lösningen blandades med 450 µl analysbuffert för att göra 50 pg/ml-lösningen. Lösningen med 0 pg/ml bestod endast av analysbuffert.

Kortisolproverna förbereddes genom att 5 µl plasma från proverna blandades med 5 µl dissociationsreagent i ett Eppendorfrör. Detta centrifugerades i någon sekund och inkuberades i minst fem minuter. 490 µl analysbuffert tillsattes för att göra en 1:100-utspädning för samtliga prov. Dessa prover användes för nästa steg i analysen.

Den följande analysen gav att fyra av de totalt 70 proverna hade kortisolhalter utanför standardkurvan som togs fram med hjälp av standardlösningarna. Dessa fyra prover analyserades igen med en utspädning på 1:200. Proverna förbereddes till en utspädning på 1:100 likt de tidigare proverna och sedan blandades 250 µl av 1:100-utspädningen med 250 µl analysbuffert för att få en utspädning på 1:200.

3.5.2 Brunnarna

Analysen i brunnarna gjordes med dubbelprover. Det innebär att varje kortisolprov, standardlösning och bakgrundsbrunn provades i två brunnar var, varifrån ett medelvärde räknades ut. Processen för kortisolprover och standardlösningar är densamma men processen för bakgrundsbrunnarna är lite annorlunda.

Bindningen av antigen

50 µl av kortisolprov eller standardlösning tillsattes till varje brunn. För bakgrundsbrunnarna tillsattes i stället 75 µl analysbuffert. Till samtliga brunnar tillsattes 25 µl kortisolkonjugat. 25 µl kortisolantikroppar tillsattes till alla brunnar förutom bakgrundsbrunnarna. Plattan med brunnarna skakades lätt genom slag på sidan av plattan. Brunnarna täcktes och inkuberades vid rumstemperatur i en timme med skakning. Efter detta så tvättades samtliga brunnar med 300 µl tvättbuffert fyra gånger.

Tillsats av kromogen

Efter tvättningen av brunnarna så tillsattes 100 µl TMB-substrat till varje brunn. Det är detta substrat som får lösningarna att ändra färg baserat på kortisolkoncentration i provet. Brunnarna täcktes igen och inkuberades i 30 minuter vid rumstemperatur. Efter 30 minuter tillsattes 50 µl stopplösning till varje brunn. Detta får reaktionen från TMB-substratet att sluta verka. Absorbansen i varje brunn mättes vid 450 nm.

3.6 Statistisk analys

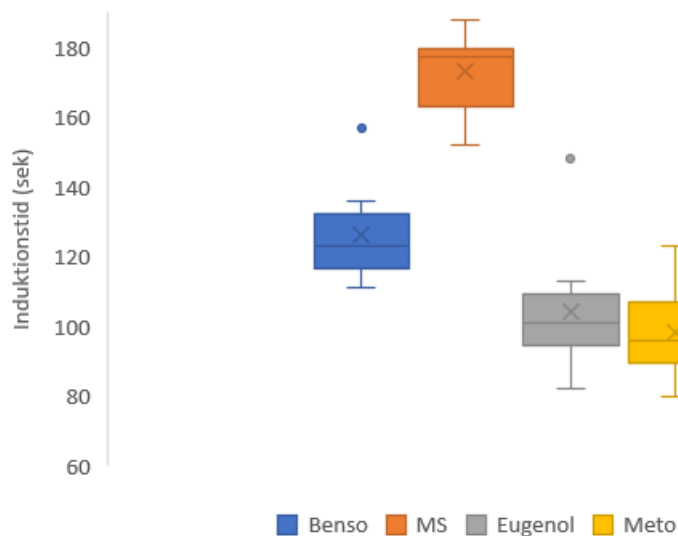
Ett medelvärde på absorbansen från de två brunnarna för varje prov räknades ut och bakgrundsvärdet från bakgrundsbrunnarna subtraherades. För att ta fram

kortisolkoncentrationerna gjordes en standardkurva med hjälp av standardlösningarna i programmet TableCurve®. I MYSTAT gjordes ett histogram (figur 6) med kortisolkoncentrationerna för att kontrollera normalfördelningen och ett Levene's test genomfördes för att kontrollera om variansen var konstant och se om datan behövde bearbetas ytterligare inför variansanalysen. De olika behandlingarna jämfördes med varandra i en envägs variansanalys. Sedan gjordes ett post-hoc-test för parvisa jämförelser mellan de olika behandlingarna. Envägs variansanalyser gjordes även för att undersöka samband mellan kortisolhalterna och de andra parametrarna provordning, fiskens storlek och längd, och induktionstid. Sammanlagda medelvärden för kortisolhalter från kontrollbehandlingarna (vatten, HCl och etanol) jämfördes med medelvärden på kortisolhalter från bedövningsbehandlingarna på samma sätt.

Resultat

4.1 Induktionstid

Det finns en signifikant skillnad i induktionstid för de olika bedövningsmedlen ($p < 0,001$). Metomidat hade i snitt kortast induktionstid med 98 sekunder följt av eugenol med 104 sekunder. Bensokain hade näst längst tid med 126 sekunder och MS-222 tog längst tid med 173 sekunder. MS-222 skiljer sig kraftigt från de tre andra medlen med betydligt längre induktionstid. Eugenol och metomidat har liknande induktionstid (figur 4).

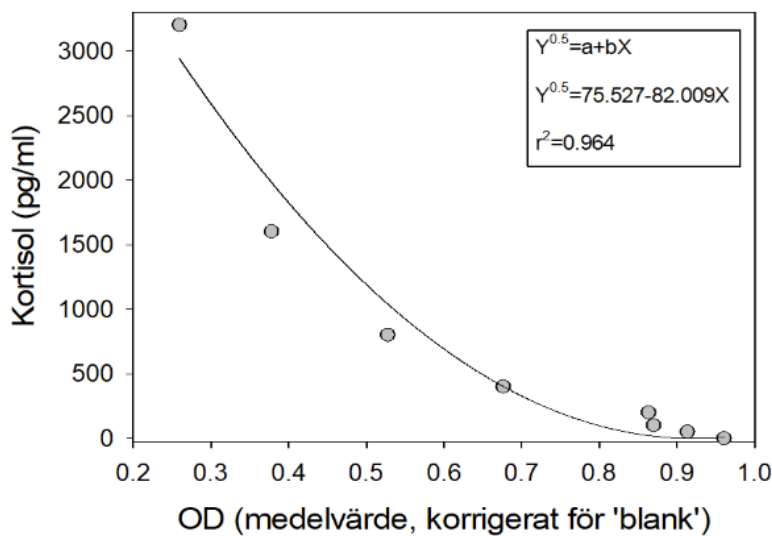


Figur 4. Lådagram som visar induktionstiden (sek) på y-axeln vid bedövning med bensokain, MS-222, eugenol och metomidat i sekunder. Outliers visas med punkter, kryssen anger medelvärdet och den horisontella linjen visar medianen.

4.2 Kortisolkoncentration

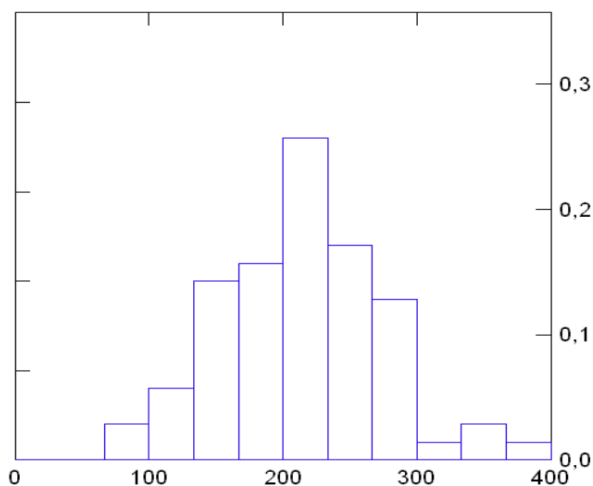
Totalt användes fyra olika plattor för ELISA-analys eftersom samtliga prover inte fick plats på en och samma platta. Därför togs det fram fyra olika standardkurvor

för att beräkna kortisolkoncentrationen. En av dessa kurvor har ekvationen $Y^{0.5}=75,527-82.009x$ (figur 5). De andra tre kurvorna liknar den i figuren.



Figur 5. Standardkurva för beräkning av kortisolkoncentrationer. $Y^{0.5}=75,527-82.009x$. Y-axeln visar kortisolhalten i pg/ml. 10 pg/ml motsvarar 1 ng/ml. X-axeln visar optisk densitet vilket är den relativa absorbansen för proverna.

Kortisolkoncentrationerna är koncentrationen kortisol i blodplasman mätt i ng/ml. Histogrammet (figur 6) visar hur fördelningen av koncentrationer ser ut och visar att koncentrationerna är normalfördelade. En variansanalys kunde genomföras utan att behandla värdena ytterligare.



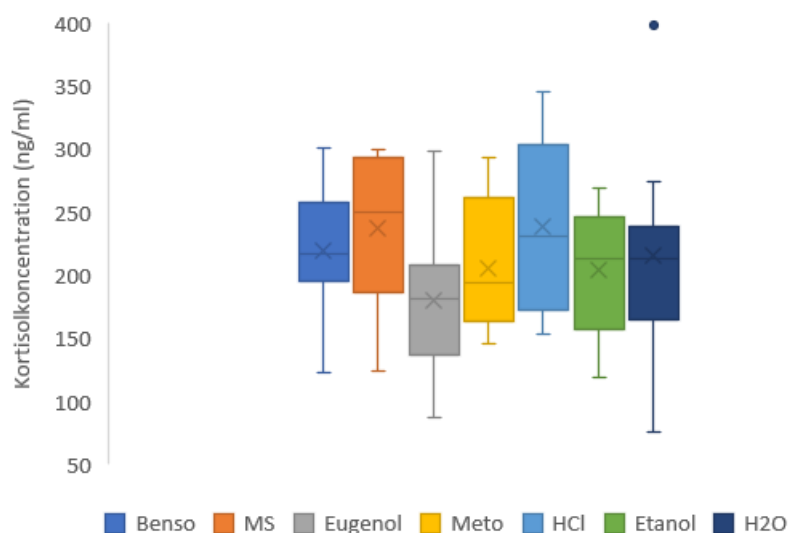
Figur 6. Histogram som visar fördelning av kortisolkoncentrationer i ng/ml på x-axeln. Y-axeln visar hur stor andel av alla prover som representeras av de olika koncentrationerna.

För att kontrollera om variationen var konstant gjordes ett Levene's test (tabell 2) som visade att variansen inte är beroende av behandlingen.

Tabell 2. Levene's test som visar på konstant variation i kortisolkoncentrationer

Levene's test	
F-värde	0,360
Sign. värde	0,901

Medelvärden för de olika behandlingarna beräknades. De behandlingar som resulterade i de högsta medelkoncentrationerna var MS-222 och HCl-behandlingen på 238 ng/ml. Lägst medelkoncentration uppmättes i eugenol på 179 ng/ml. Kontrollbehandlingarna (vatten, HCl och etanol) gav varken högre eller lägre medelkoncentration än bedövningsbehandlingarna vid envägs variansanalys ($p=0,56$). Variansanalysen som genomfördes visade att det inte finns något signifikant samband mellan kortisolkoncentrationen i blodplasman och behandlingarna ($p=0,37$). Skillnaderna som uppstått i resultatet (figur 7) kan alltså ha varit slumpmässiga. Post hoc-testet som genomfördes efter variansanalysen visade dock att eugenol och HCl skiljer sig åt signifikant ($p=0,02$) och det är nästan en signifikant skillnad mellan eugenol och MS-222 ($p=0,067$).



Figur 7. Lådagram som visar kortisolkoncentrationen i blodplasman vid behandling med bensokain, MS-222, eugenol, metomidat, HCl, etanol och H₂O i ng/ml. Outliers visas med punkter, kryssen anger medelvärdet och den horisontella linjen visar medianen.

De sura behandlingarna, alltså HCl och MS-222, slogs ihop och jämfördes med de övriga behandlingarna. Det resulterade i signifikant högre stressnivåer ($p=0,042$) för fiskar placerade i sura vatten jämfört med de som placerats i neutralt pH (tabell 3).

Tabell 3: ANOVA-tabell för envägsvariensanalys med sur respektive neutral behandling som faktor beroende på kortisolkoncentrationen.

	Kvadratsumma	Frihetsgrader	Medelkvadrat	F-värde	Sign. värde
Behandling	15 809,75	1	15 809,75	4,30	0,042
Fel	250 053,87	68	3 677,26		

Envägsanalyser av variansen visar att det inte finns något signifikant samband mellan kortisolhalt och parametrarna fiskarnas vikt (tabell 4), fiskarnas längd (tabell 6) eller induktionstiden (tabell 5). Fiskarnas storlek och induktionstiden var inte heller signifikant korrelerade.

Tabell 4: ANOVA-tabell för envägsvariensanalys med behandling som faktor beroende på kortisolkoncentrationen och fiskarnas vikt som kovariat.

	Kvadratsumma	Frihetsgrader	Medelkvadrat	F-värde	Sign. värde
Behandling	25 077,18	6	4 179,53	1,08	0,38
Vikt	80,61	1	80,61	0,021	0,886
Fel	240 400,54	62	3 877,43		

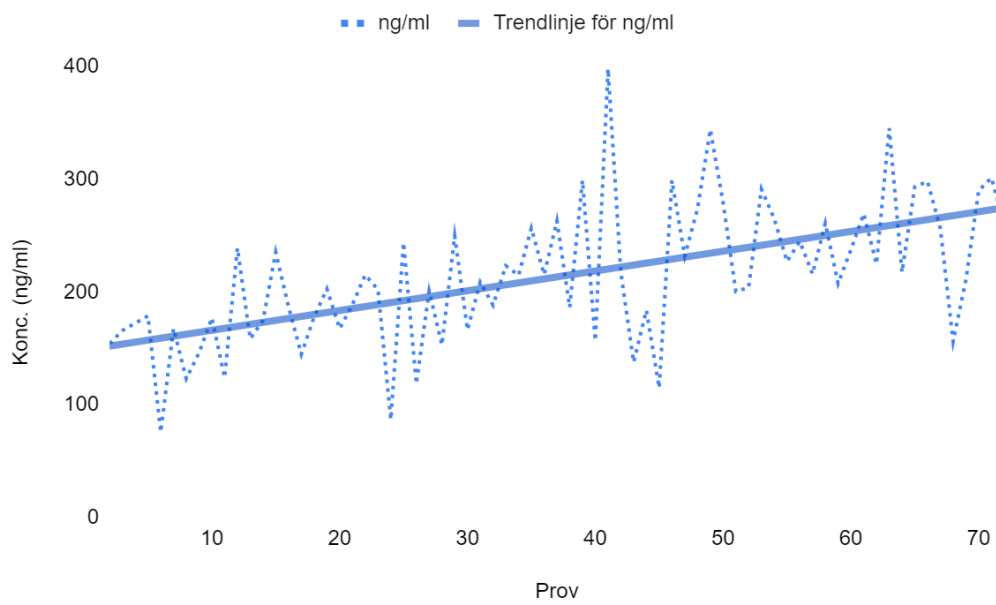
Tabell 5: ANOVA-tabell för envägsvariensanalys med behandling som faktor beroende på kortisolkoncentrationen och induktionstiden som kovariat.

	Kvadratsumma	Frihetsgrader	Medelkvadrat	F-värde	Sign. värde
Behandling	6 897,36	3	2 299,12	0,72	0,54
Induktionstid	56,59	1	56,59	0,18	0,894
Fel	110 617,53	35	3 160,50		

Ett signifikant samband som hittades var mellan koncentrationen och tidpunkten provet togs ($p < 0,001$) (figur 8 och tabell 6). De senare proverna, vilka var tagna senare på dagen, resulterade i högre kortisolkoncentrationer.

Tabell 6: ANOVA-tabell för envägsvariensanalys med behandling som faktor beroende på kortisolkoncentrationen och prov samt fiskarnas längd som kovariat.

	Kvadratsumma	Frihetsgrader	Medelkvadrat	F-värde	Sign. värde
Behandling	19 494,49	6	3 249,08	1,25	0,29
Prov nr	77 663,35	1	77 663,35	29,98	>0,001
Längd	2 825,80	1	2835,80	1,09	0,30
Fel	158 009,30	61	2590,31		



Figur 8. Kortisolkoncentrationerna i ng/ml för varje prov med en trendlinje som visar hur kortisolkoncentrationerna var högre i de senare proverna (prov 1 tog först, prov 70 togs sist).

Diskussion

Vattenbruket är en utvecklande marknad som har potential att göra vår livsmedelsproduktion mer hållbar (Vattenbruksutredningen 2009). Hanteringen som krävs vid fiskodling kommer dock att vara stressande för fiskarna och i nuläget är bedövning sättet vi hanterar detta på (Small 2003). För att göra användandet av bedövningsmedel så bra som möjligt krävs forskning på hur olika bedövningsmedel fungerar och hur fiskarna upplever deras effekt (Wendelaar Bonga 1997).

Induktionstiderna låg i resultatet under 3 minuter för alla bedövningsmedlen. Detta är kort tid när man jämför med de 5–10 minuter som Neiffer & Stamper (2009) skrev är vanliga induktionstider och förväntat resultat i jämförelse med de 3 minuter som Zahl et al. (2011) skriver om. Neiffer & Stamper (2009) skrev även att låg temperatur oftast ger långa induktionstider. Studien genomfördes med vatten som var 1°C. Dock finns det många andra faktorer än vattnets temperatur som påverkar induktionstiderna, till exempel fiskarnas kön och storlek, och studier av detta slag görs sällan i lika kallt vatten som denna studie. Denna studie ger inte tillräckligt med underlag för att dra någon slutsats om detta eftersom endast 10 fiskar användes per behandling och inte tillräckligt många parametrar angående induktionstiden har studerats.

Enligt Wendelaar Bonga (1997) är det vanligt att kortisolnivåer hos fiskar blir mellan 50 och 500 ng/ml vid stress. Detta stämmer bra överens med resultatet från studien. De behandlingar som resulterade i högst kortisolkoncentrationer var MS-222 och HCl. Det dessa behandlingar har gemensamt är att pH var lägre i dessa baljor än för de andra behandlingarna. I MS-222-baljan var pH 4,6 och i HCl-baljan låg pH runt 3. I alla andra baljor var pH 6,7. När dessa två behandlingar jämfördes med de övriga behandlingarna påvisades en signifikant skillnad. En slutsats som kan dras om detta är att lågt pH orsakar stress hos dessa fiskar då det är en fysisk förändring i vattnet som fiskarna inte är vana vid (Wendelaar Bonga 1997). För att förebygga pH-sänkningen vid användning av MS-222 kan natriumkarbonat användas som buffert (Neiffer & Stamper 2009). Potentiellt kan buffert tillsammans med MS-222 få en positiv effekt på stressreaktionen vid hantering. Palić (2006) skriver att MS-222 tidigare lett till höga kortisolhalter då medlet saknar kortisolhämning. Detta, tillsammans med pH-sänkningen medlet orsakar, kan

förklara varför MS-222 gav de högsta värdena. MS-222 bör inte användas utan buffert.

Eugenol var det bedövningsmedel som resulterade i lägst kortisolkoncentrationer följt av metomidat. Eugenol har vid tidigare försök konstaterats ha kortisolkämnande effekt vid bedövning genom att blockera HPI-axeln (Cunha et al.) och det kan förklara resultatet. Även metomidat har kortisolkämnande effekt genom att blockera produktionen av ACTH-hormonet (Small 2003). Dessa effekter märks i resultatet.

Det fanns inga signifikanta samband mellan stress och behandling om varje bedövningsmedel ses som en egen klass/grupp. För att få ett säkrare resultat där mer slutsatser kan dras krävs fler prover per behandling eller ett försök med annorlunda upplägg där hanteringen inte innebär lika mycket stress för fiskarna. Att det inte finns något signifikant samband mellan behandling och stress skulle kunna tolkas som att vilket bedövningsmedel som helst kan användas och ge samma resultat. Resultat indikerar dock att signifikanta samband skulle framträda om försöket gjordes i större skala. Post hoc-testet som visade en signifikant skillnad i stressrespons mellan eugenol och HCl samt nästan signifikant skillnad mellan eugenol och MS-222 stärker teorin om att det ett större test skulle ge fler signifikanta samband. Samma princip gäller vid jämförelse av bedövningsbehandlingarna och kontrollbehandlingarna. Att det saknas signifikant skillnad i stress mellan bedövade och icke-bedövade fiskar indikerar att det är överflödigt att bedöva fiskarna. Detta är osannolikt och resultatet skulle antagligen se annorlunda vid försök på större skala. Dessutom har bedövningen fler viktiga effekter än att potentiellt minska stressen, till exempel att lindra smärta, och detta mättes inte i detta försök.

Ett signifikant samband som fanns var dock att de senare proverna gav högre kortisolhalter. Scott (2008) skriver att fiskar som väntar på behandling kan bli stressade av att fiskar plockas upp ur tankarna. Försöket pågick ungefär mellan klockan tio på förmiddagen och klockan fyra på eftermiddagen och under den tiden plockades en fisk upp med ungefär fyra minuters mellanrum. De sista fiskarna som plockades upp hade blivit störda varje gång en fisk plockades upp. Detta kan förklara varför de senare proverna gav högre kortisolhalter. Dessutom är kortisolresponsen fördröjd. Vanligtvis uppmäts de högsta halterna 1–2 timmar efter stressande behandling (Fatira et al. 2013). De tidiga proverna hade liten fördröjning mellan att de behandlades och stressen av att andra fiskar plockades upp ur tanken. För de senare fiskarna fanns det tid för kortisolhalterna att stiga i någon timme innan de blev behandlade och proverna togs. En annan förklaring som kan ha bidragit till detta samband är att det finns en naturlig dygnsvariation i kortisol (Wendelaar

Bonga 1997). Kortisolhalterna brukar vara som högst runt solnedgången vid naturliga förhållanden (Fatira et al. 2013).

5.1 Framtida arbeten

En av anledningarna till att få signifikanta samband fanns i studien är antagligen på grund av stor variation i resultatet och få fiskar per behandling. För att i framtiden kunna utveckla detta och få tydligare resultat är därför större prov en faktor som kan utnyttjas. Studier som är mindre invasiva och innebär mindre hantering av fiskarna skulle vara fördelaktigt. För att minska hantering kan exempelvis förvaringen av fiskarna innan behandling var uppdelad i flera mindre kärl i stället för ett enda stort kärl där fiskarna störs ofta innan behandling. Fler sätt att mäta kortisol på utvecklas (Scott et al. 2008) och säkra metoder som inte kräver blodprov skulle vara betydligt mindre invasiva och kräva mindre hantering av fiskarna.

För att göra studien mer jämförbar med tidigare studier kan den genomföras i varmare vatten för att efterlikna den miljö som förekommer i de flesta studierna. Genom att studera kortisolhalter i fiskarna under en längre period och förvara fiskarna vid en konstant temperatur kan man studera hur kortisolhalterna varierar under året och hur dessa är kopplade till temperaturvariationer. Detta skulle dock vara ett mycket större projekt som kräver mer resurser och tid.

5.2 Slutsats

Eftersom få signifikanta samband fanns gav studien inte tillräckligt mycket underlag för att kunna rekommendera något bedövningsmedel över något annat utöver en rekommendation att MS-222 inte bör användas utan buffert. Det är dock sannolikt att övriga bedövningsmedel också har effekt på stressreaktionen. En slutsats som kan dras är att hanteringen av fiskarna är den främsta stressande faktorn. För att minska fiskarnas stress och lidande är det därför viktigt att minska hanteringen och göra hanteringen så kortvarig som möjligt när hantering är oundvikligt.

Referenser

- Boulton, K. (2014). *Coping with stress: personality, life history and social dominance in swordtail fishes, Xiphophorus sp.* Diss. Edinburgh: University of Edinburgh.
- Brown, L. (2011). Anaesthesia for fish. *Vietfish*. Vol. 8 (No. 2), 68-70.
- Cunha, M. A., Zeppenfeld, C. C., Oliveira Garcia, L., Loro, V. L., Fonseca, M. B., Emanuelli, T., Lima Veeck, A. P., Copatti, C. E. & Baldisserotto, B. (2010). Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural*. Vol. 40, No. 10. 2107-2114.
- Fatira, E., Papandroulakis, N. & Pavlidis, M. (2013). Diel changes in plasma cortisol and effects of size and stress duration on the cortisol response in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*. Vol. 40. 911-919.
- Havs- och vattenmyndigheten (2018). Öring. <https://www.havochvatten.se/arter-och-livsmiljoer/arter-och-naturtyper/oring.html> [2023-04-25]
- Holloway, A. C., Keene, J. L., Noakes, D. G. & Moccia R. D. (2004). Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquaculture Research*. Vol. 35. 1025–1030.
- Jalmlöv, M., Stéen, M. och Röcklinsberg, H. (2011). *Kan fiskar känna smärta och/eller upplev lidande?* Swedish Centre for Animal Welfare, SLU.
- Jordbruksverket (2022). *Vattenbruk*. <https://jordbruksverket.se/utveckla-foretagande-pa-landsbygden/vattenbruk-och-fiske/vattenbruk> [2023-04-25]
- Leng, S. X., MCElhaney J. E., Walston, J. D., Xie, D., Fedarko, N. S. & Kuchel, G. A. (2008). ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. Vol. 63 (No. 8). 879-884
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immuniassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. Vol. 51 (No. 12), 2415-2418.

- Naturhistoriska riksmuseet (2022), *Fiskar*.
<https://www.nrm.se/faktaomnaturenochrymden/djur/fiskar.408.html> [2023-05-07]
- 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, D. M., Andreassen C. B., Menzel, B. W & Roth, J. A. (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*. Vol. 254. 675–685.
- Papyrus Bio (2021). *Antibody Conjugation Methods, Protocols, and Tips*.
<https://blog.papyrusbio.com/antibody-conjugation/> [2023-05-12]
- R&D Systems (u. å.) *What is an ELISA?* <https://www.rndsystems.com/resources/what-is-an-elisa-and-elisa-types> [2023-04-17]
- Sadoul, B. & Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *J Fish Biol*. 94, 540–555.
<https://doi.org/10.1111/jfb.13904>SADOULANDGEFFROY555FISH
- Scott, P., Hirschenhauser, K., Bender, N., Oliveira, R., Earley, R. L., Sebire, M., Ellis, T., Pavlidis, M., Hubbard, P. C., Huertas, M. & Canario, A. (2008). Non-invasive measurement of steroids in fish-holding water: important considerations when applying the procedure to behaviour studies. *Behaviour*. 145, 1307-1328.
- SFS 2018:1192. *Djurskyddslagen*. Stockholm: Riksdagen.
- Small, B. C. (2003). Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*. Vol. 218. 177–185.
- Sneddon, L. U. (2006). Ethics and welfare: pain reception in fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 26(1), 6-10.
- Svenskt vattenbruk (2020). *Öring (Salmo trutta)*.
<https://www.svensktvattenbruk.se/46/att-driva-vattenbruk/exempel-pa-arter-inom-vattenbruk/oring.html> [2023-05-02]
- ThermoFisher (u.å.). *Cortisol Competitive Human ELISA Kit*.
<https://www.thermofisher.com/elisa/product/Cortisol-Competitive-Human-ELISA-Kit/EIAHCOR> [2023-05-12]

- Toni, M., Manciocco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C. & Malavasi, S. (2019). Review: Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. *Animal*. 13(1), 161–170.
- Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Persin Berakovic, A. & Sauerborn Klobucar, R. (2012). *Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia*. Blackwell Verlag: Berlin. ISSN 0175–8659
- Vattenbruksutredningen (2009). *Det växande vattenbrukslandet*. (SOU 2009:26). Stockholm: Fritzes.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*. Vol. 77 (No. 3). 591–625.
- Zahl, I. H., Samuelsen, O. & Kiessling, A. (2011). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem* (2012). 38:201–218.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.