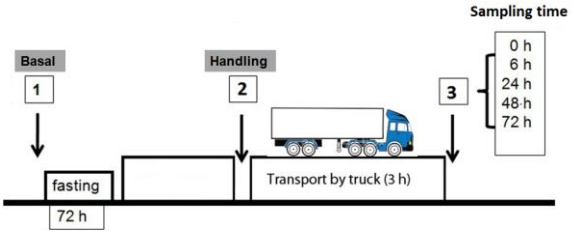
Invloed van transport op de stressfysiologie van marktwaardige Afrikaanse meerval en Europese paling

J.W. van de Vis, E. Schram, J. Boerrigter, R. Manuel, J.W.H. van der Heul, R. van den Bos, A. Hofman, N. Ros, E. Lambooij en G. Flik

Rapportnummer: C100/13



IMARES Wageningen UR

(IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies)

Opdrachtgever: Mw. drs. G. Mahabir
Ministerie van Economische Zaken
Bezuidenhoutseweg 30
2594 AV Den Haag

BO-12.02-002-025

Publicatiedatum: Maart 2013

IMARES WAGENINGEN UR

IMARES is:

- een onafhankelijk, objectief en gezaghebbend instituut dat kennis levert die noodzakelijk is voor integrale duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van de zee en kustzones;
- een instituut dat de benodigde kennis levert voor een geïntegreerde duurzame bescherming, exploitatie en ruimtelijk gebruik van zee en kustzones;
- een belangrijke, proactieve speler in nationale en internationale mariene onderzoeksnetwerken (zoals ICES en EFARO).

P.O. Box 68
1970 AB IJmuiden
Phone:+31 (0)317 480900
Fax: +31 (0)317 48 73 26
E-Mail: imares@wur.nl
www.imares.wur.nl

P.O. Box 77
4400 AB Yerseke
Phone: +31 (0)317 48 09 00
Fax: +31 (0)317 48 73 59
E-Mail: imares@wur.nl
www.imares.wur.nl

P.O. Box 57
1780 AB Den Helder
Phone: +31 (0)317 48 09 00
Fax: +31 (0)223 63 06 87
E-Mail: imares@wur.nl
www.imares.wur.nl

P.O. Box 167
1790 AD Den Burg Texel
Phone: +31 (0)317 48 09 00
Fax: +31 (0)317 48 73 62
E-Mail: imares@wur.nl
www.imares.wur.nl

© 2013 IMARES Wageningen UR

IMARES, onderdeel van Stichting DLO.
KvK nr. 09098104,
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16.
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

De Directie van IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van IMARES; opdrachtgever vrijwaart IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A_4_3_1-V13

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave 3

Samenvatting 4

1. Inleiding 5

2. Kennisvraag 6

3. Methoden 6

4. Resultaten 9

4. Resultaten 12

4.1 Afrikaanse meerval 12
4.1.1 Wateranalyse 12
4.1.2 Analyse van cortisol, NEFA en glucose 12
4.1.3 Laesies16

4.2 Europese paling 16
4.2.1 Waterkwaliteit 16
4.2.2 Analyse van cortisol, NEFA en glucose 20
4.2.3 Laesies20

5. Conclusie, discussie en aanbevelingen 20

5.1 Conclusie en discussie 20
5.1.1 Afrikaanse meerval 21
5.1.2 Europese paling 22

5.2 Aanbevelingen 24

6. Dankwoord 24

7. Kwaliteitsborging 24

8. Referenties 25

9. Verantwoording 28

Samenvatting

Het onderzoek was gericht op effecten van praktijkgerichte transportcondities van marktwaardige Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) en Europese paling (*Anguilla anguilla*) op de relevante fysiologische parameters in het bloedplasma (cortisol, glucose en niet-veresterde vrije vetzuren) en mogelijke laesies van de huid. Om te bepalen hoelang een mogelijk herstel van de dieren na afloop van het transport kon duren, hebben we dieren na transporten van 3 uur laten terugkeren naar de omgeving waar ze vandaan kwamen en ze vervolgens gedurende 72 gemonitord door analyse van de fysiologische parameters. Tijdens die periode van 72 uur na afloop van de transporten voerden we beide vissoorten niet. Gedurende hele experimenten maten we het totaal ammonia-N-, nitraat-N- en nitrietgehalte, de temperatuur en het zuurstofgehalte; deze parameters zijn nl. een maat voor de kwaliteit van het water. Tot slot gingen we na of het transport van beide vissoorten leidde tot een verhoogde mortaliteit.
Voor beide vissoorten werd in het kader van dit project door commerciële transporteurs op één dag tweemaal een transport uitgevoerd. Tijdens deze vier transporteren werden de voor de praktijk gangbare condities zo dicht mogelijk benaderd. Hierbij gaat het om het onthouden van voer om de dieren gereed te maken voor transport (72 uur voor de meerval en 120 uur voor de paling) de wijze van laden en lossen, de dichtheid (in kg/1000 l), de temperatuur en kwaliteit van het water en de overige condities tijdens de transporten, zoals duur van het transport, vibraties door het rijden, etc. Tijdens de transporten vervoerden de transporteurs de meervallen en de palingen bij respectievelijk temperaturen en dichtheden van 20-22 °C en 500 kg/1000 l en 17-19 °C en 270-290 kg/1000 l. Tijdens het transport van de palingen gebruikte de transporteur een gasfles gevuld met zuurstof om het zuurstofgehalte op peil te houden. Het water in de tanks waarin de meervallen werden vervoerd, werd tijdens het transport niet van zuurstof of lucht voorzien, hetgeen gebruikelijk is voor deze vissoort.
Onze analyses van de waterkwaliteit na afloop van de transporten laten zien dat voor beide vissoorten de grenswaarden voor de waterkwaliteit niet werden overschreden. Het vervoeren van Afrikaanse meerval en paling onder voor de praktijk gangbare omstandigheden leidde niet tot een onacceptabele waterkwaliteit. Ook namen we geen mortaliteit als gevolg van transport voor beide vissoorten waar.
Een visuele beoordeling van laesies van de huid van de meerval liet zien dat er geen significant verschil was tussen de getransporteerde meerval en de dieren die niet waren getransporteerd. De analyse van laesies van de huid van de palingen bleek niet tot bruikbare resultaten te leiden. Voor beide soorten werd als gevolg van het transportproces een significante verhoging van het cortisol gemeten, vergeleken met de basale niveaus voor beide vissoorten. Voor de meerval en de paling was het cortisolgehalte weer terug op het basale niveau respectievelijk 48 en 6 uur na afloop van het transportproces.
Een hersteltijd na afloop van het transport van 48 uur voor de Afrikaanse meerval laat zien dat transport van deze vissoort een duidelijk effect heeft op de stress-as. Bij de meerval was het energiemetabolisme niet verhoogd na afloop van het transport, terwijl voor de paling gedurende tenminste 72 uur na afloop van het transport het energie metabolisme verhoogd was in deze afgezwommen dieren.
Volgens de schaal van Dalla Villa et al. (2009), die loopt van 1 voor een hersteltijd van 3 uur tot 5 voor een hersteltijd langer dan 72 uur, scoort het effect van transport van Afrikaanse meerval en Europese paling respectievelijk 4 en 5.

1. Inleiding

Transport van levende vissen die bestemd zijn voor consumptie kan over de weg en per schip plaatsvinden (Ashley, 2007). Voor de meeste gekweekte vissen in Nederland is transport over de weg aan de orde en daarom beperken we ons tot deze situatie.
In Nederland vormen de kweek van de Europese paling (*Anguilla anguilla*) en twee meervalsoorten (Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*) en een kruising van Afrikaanse meerval en Vundu meerval (*Heterobranchus longifilis*) het grootste deel van de kweek. De kruising wordt onder de merknaam Claresse® verkocht. De productie van Europese paling in Nederland is voor 2011 geschat op 3000 ton en de totale productie van beide meervalsoorten was geraamd op maximaal 2800 ton (FEAP, 2012). In 2011 produceerden kwekers in Nederland ca. 1500-2000 ton Claresse®.
Kwekers lieten ons weten dat voorafgaand aan het transport van Afrikaanse meerval en Claresse meerval gedurende 36 tot 72 uur het voer wordt onthouden (het zogenaamde afzwemmen), zodat de metabole activiteit van de dieren lager wordt, waardoor ze minder afvalstoffen uitscheiden in het water waarin ze zich bevinden tijdens transport. Naast die verlaging is een adequate onthouding van het voer voorafgaand aan het transport ook van belang om een ongewenste smaakafwijking aan het vlees die optreedt in recirculatiesystemen, te verwijderen. Tijdens het afzwemmen worden de meervallen twee dagen of langer in een doorstroomsysteem geplaatst (de zogenaamde afzwemtanks), voordat de dieren naar een slachthuis worden vervoerd. Voor paling bedraagt de afzwemperiode, volgens informatie van de palingkwekers, 24 tot 168 uur.
Bij laden van de transportwagen worden de palingen, net zoals beide meervalsoorten, vanuit de afzwemtanks in een kist zonder water gestort en vervolgens in tanks met water gestort op de vrachtwagen of aanhanger.
Voor zowel Afrikaanse meerval als Claresse® is er geen zuurstofvoorziening aanwezig tijdens transport, omdat de meervallen ook uit de luchtlaag boven het water zuurstof halen. Bij het transport van meervallen zijn de tanks of gemonteerd op de transportwagen of ze worden in de transportwagen geplaatst. Tijdens het transport van beide meervalsoorten wordt de waterkwaliteit niet gemonitord. De dichtheid bedraagt tijdens het transport van Afrikaanse meerval ca. 500 kg/1000 l en de transportafstand varieert tussen 30 en 200 km. Voor Claresse meerval hanteert men tijdens het transport een dichtheid van 240-300 kg/1000 l.
Voor paling geldt dat deze vissen, afhankelijk van het bedrijf, bij een watertemperatuur van 12-14, 19 of 24 °C vervoerd in water waarvan het zuurstofgehalte met behulp pure zuurstof op peil wordt gehouden. Het monitoren van de waterkwaliteit tijdens het transport van marktwaardige paling blijkt afhankelijk te zijn van het bedrijf; 2 bedrijven lieten ons weten na ca. 2 uur transport het zuurstofgehalte te meten en ander bedrijf meldde dit niet te doen. De dichtheid van de palingen bedraagt tijdens transport ongeveer 300 kg/1000 l. De afstand van het transport van de palingen varieert van 30-200 km in Nederland. Bij transport van de paling naar het buitenland kan de duur ervan 1-3 dagen bedragen.
Na afloop van het transport stort men tijdens het lossen de palingen bij de rokerij vanuit de tanks op de transportwagen in kisten zonder water. In Nederlandse rokerijen bewaart men de palingen 3 tot maximaal 8 dagen in tanks met water om de grondsmaak te verwijderen. Over de dichtheid van de paling in de opslagtanks op de rokerij zijn geen gegevens beschikbaar.
Afhankelijk van het bedrijf worden ook tanks met meervallen bij aankomst met een vorkheftruck uit de transportwagen gehaald en vervolgens in de verwerkingsruimte geplaatst. Bij de verwerkers van meerval worden de dieren binnen een periode van ca. 8 uur geslacht of de volgende dag, in dit geval na een wachtperiode van ca. 16 uur. Afhankelijk van het bedrijf wordt de temperatuur van het water, waarin de meervallen zich bevinden tijdens de wachtperiode voorafgaand aan het slachtproces al of niet constant gehouden tijdens die wachtperiode van 8 tot 16 uur voorafgaand aan de verwerking.
Uit literatuurgegevens over transport van vissen blijkt dat het laden van de transportauto leidt tot veranderingen in de omgeving, lichtregime en dichtheid (Dalla Villa et al., 2009). Tijdens het transport worden de vissen blootgesteld aan geluid, trillingen, mogelijk veranderingen in temperatuur en mogelijke

veranderingen in waterkwaliteit (met name zuurstof-, koolzuur-, ammoniagehalte). Bij aankomst bij het slachthuis worden de dieren in een transporttank geplaatst en naar de slachtruimte gebracht of naar opslagtanks waar ze langer dan 24 uur kunnen verblijven. Ook hier treden weer veranderingen op in de omgeving waarin de vissen zich bevinden. Het is bekend dat dergelijke veranderingen als gevolg van het transportproces stressreacties in vissen kunnen veroorzaken, zoals beschreven door Davis and Parker (1986), Iversen et al. (1998); Schreck et al. (1989) en Specker and Schreck (1980). Als gevolg van transport kunnen ook ziektes optreden (Winston, 2001) en kan er sprake zijn van mortaliteit (McDonald and Milligan, 1997).
Na transport kan het wenselijk zijn om de vissen bij te laten komen van de ondervonden stress. In Noorwegen laten verwerkers getransporteerde zalmen gedurende 48 uur tot rusten komen voordat ze worden geslacht (pers. comm. P.J. Boe, factory manager van Sekkingstad in Noorwegen). Deze rustperiode vermijdt dat er gaping in zalmfilets optreedt. Er is sprake van gaping wanneer in een filet myotomen (segmenten van het spierweefsel) of een deel ervan wijken. Het gevolg van gaping is dat bij het fileren van een zalm de verkregen filet voor een deel uit elkaar valt. In dit project is tijdens gesprekken met kwekers geen melding gemaakt van gaping bij beide meervalsoorten en paling als gevolg van transport.

2. Kennisvraag

Op grond van beschikbare literatuur, zoals beschreven in de inleiding, is het mogelijk dat transport ook bij marktwaardige Europese paling en Afrikaanse meerval leidt tot stress. Thans is niet bekend wat het effect is van transport op stress in beide vissoorten en hoelang die stress kan aanhouden. De vraag waar dit onderzoek antwoord op geeft is in welke mate transport, zoals dat in de praktijk plaatsvindt, effect heeft op stress bij de Afrikaanse meerval en de Europese paling.

3. Methoden

Om na te gaan hoelang meerval na afloop van het transport stress kan ondervinden, bemonsterden we de Afrikaanse meervallen onder normale houderijomstandigheden bij een bedrijf, direct na het transport en gedurende tijdsintervallen na afloop ervan, waarbij de vissen in tanks onder commerciële omstandigheden bij een bedrijf worden gehouden. Als controle zetten we dieren uit een afzwemtank overzetten in dezelfde tanks als die voor transport werden gebruikt. Deze tanks bemonsterden we op dezelfde tijdsintervallen als die na transport. Een commerciële vervoerder verzorgde het transport van de Afrikaanse meerval.
Omdat bekend is dat stress palingen veel gevoeliger voor ziekten maakt (EFSA, 2008), en vermeden moest worden dat er een uitbraak van een ziekte plaatsvond bij een kweker na afloop van transport, hielden we deze dieren voorafgaand en na het transport in het laboratorium. Het transport van de paling lieten we net zoals bij de Afrikaanse meerval door een bedrijf verzorgen.

De opzet op hoofdlijnen

Afrikaanse meerval
Voor het onderzoek naar het effect van transport op marktwaardige Afrikaanse meerval was de opzet als volgt. In totaal gebruikten we 1500 dieren voor het experiment: 500 voor de controle groep en 500 voor ieder van beide transportgroepen. Iedere groep was afkomstig uit een aparte afzwemtank. Tijdens het experiment gebruikten we 170 dieren voor analyses. De resterende dieren werden na afloop van het experiment verkocht aan een slachthuis. Een overzicht van het experiment is te vinden in figuur 1.
Voorafgaand aan het transport bemonsterden we in totaal 10 vissen uit de twee houderijtanks (vijf vissen per tank) om de basiswaarden van de te meten parameters te bepalen.

Uit de eerste afzwemtank haalden we vissen die werden overgezet in tanks zoals die normaal voor het transport worden gebruikt, maar de dieren werden niet vervoerd en bleven op de kwekerij; dit was de controle groep. De transporttanks met de controlegroep werden doorstroomd met bronwater en zo waren de omstandigheden vergelijkbaar met die in de afzwemtank voor waterkwaliteit en dichtheid. Voor ieder tijdstip van bemonstering was er een tank beschikbaar en zo verstoorden we de dieren niet, die op de volgende tijdstippen bemonsterd werden: T=0, 6, 24, 48, 72 h. De aanduiding T= 0 betekent voor de getransporteerde vissen dat deze dieren onmiddellijk na afloop van het drie uur durend transport werden bemonsterd. Voor de controlegroep hanteerden we een wachttijd voor 3 uur, zodat de bemonstering op dezelfde tijdstippen plaatsvond als na afloop van het transport en de replica daarvan.
Het transport voerde de transporteur op dezelfde dag tweemaal uit. De dieren keerden na 3 uur transport terug op de kwekerij om na te gaan hoe lang het duurde voordat ze hersteld waren van het transport en hiervoor werden de tanks bemonsterd op dezelfde tijdstippen als de controlegroep (zie figuur 1).

Europese paling
De opzet van het transportexperiment met de paling was vergelijkbaar met dat van de meerval; één controlegroep en twee transportgroepen. Het verschil was dat de dieren zich in 17 glazen tanks in het laboratorium bevonden en niet op een bedrijf. Een bedrijf voerde het transport uit. Tijdens het transport hanteerde het bedrijf omstandigheden (duur, waterkwaliteit, dichtheid van de vissen in kg/l) zoals dat in de praktijk gebruikelijk is.
Tijdens het laden van de tank op de trailer namen we de palingen uit vijf glazen tanks en werden de dieren in 1 transporttank geplaatst. Bij de replica van het transport was het water vervangen voordat de palingen uit vijf glazen tanks in de transporttank op de trailer werden overgebracht. Als controlegroep namen we palingen uit vijf tanks en plaatsen die in 1 tank die op het lab bleef.
Na afloop van het transport en na een wachttijd van 3 uur voor de controle groepen verdeelden we de palingen over glazen tanks, zodat voor ieder tijdstip van bemonstering er een aparte tank beschikbaar was.

Vissen

Afrikaanse meerval
Afrikaanse meerval is een tropische vis die in Nederland wordt opgekweekt in recirculatiesystemen (RAS) tot een slachtgewicht van 1 tot 1,5 kg. Dit is ook de gewichtsklasse die wij gebruikt hebben. Het bedrijf dat meedeed in het transportexperiment richt zich op de opkweek van Afrikaanse meerval (10 tot 1500 g) in RAS. De houderijomstandigheden zijn de volgende. Aan het eind van de opkweek bij het bedrijf is de dichtheid ca. 250 kg/1000 l bij een temperatuur van 27 °C. In het bedrijf is sprake van een continue schemering. De dieren worden met pendel voerautomaat van voer voorzien om 07.00, 15.00 en 23.00 h. Om de dieren gereed te maken voor transport hanteerde het bedrijf de daarvoor bij hen gebruikelijke procedure. Voorafgaand aan transport onthoudt de kweker gedurende 24 uur het voer en worden de dieren daarna overgezet in afzwemtanks (21-23 °C en continue schemering), die worden doorstroomd met bronwater. In de afzwemtanks voert het bedrijf de dieren gedurende 48 uur niet. Door het afzwemmen verlaagt het bedrijf het metabolisme van de dieren en wordt de grondsmaak verwijderd.
In de praktijk dienen bedrijven tijdens de houderij, het afzwemmen en transport van Afrikaanse meerval geen zuurstof toe. Omdat wij in ons onderzoek de praktijk zo goed mogelijk wilden benaderen, hebben wij ook geen extra zuurstof toegevoegd aan het water tijdens dit project.

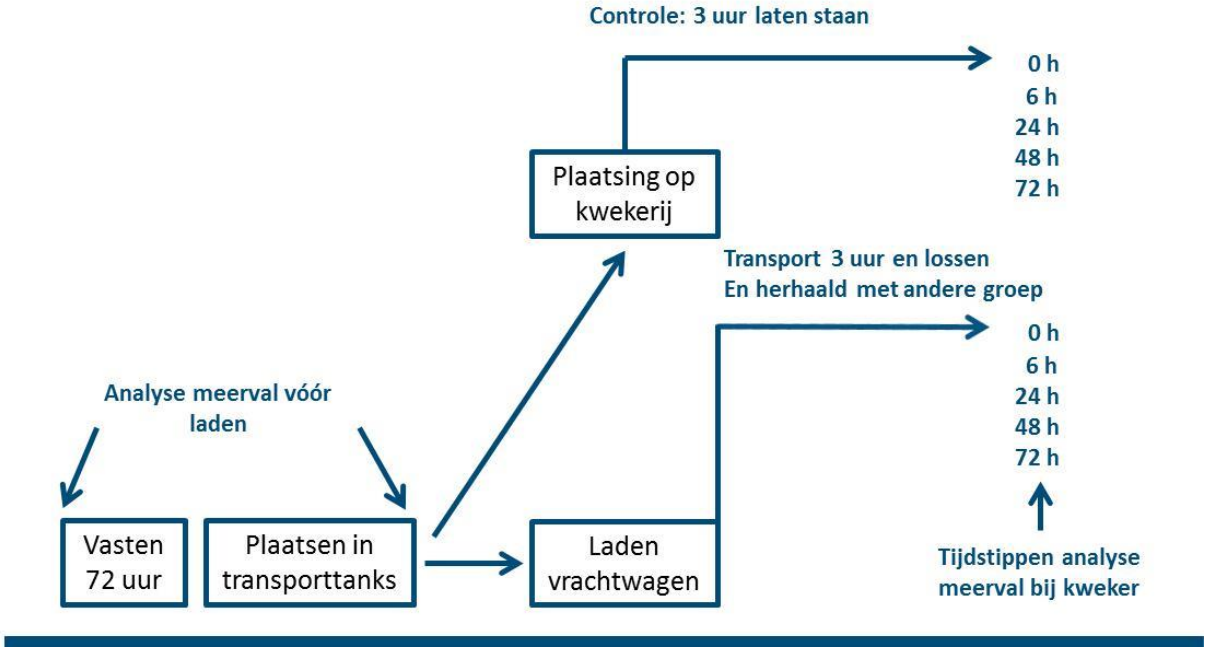
Europese paling
We voerden het experiment uit met in totaal 1300 palingen, met een gemiddelde massa van 130 g, wat voor Nederland een gebruikelijke slachtmaat is. Hiervan werden 170 dieren bemonsterd. De resterende dieren werden door de transporteur verkocht aan een slachthuis.

Na aankomst in het laboratorium werden de palingen in 17 glazen tanks van 140 l geplaatst. De dichtheid in iedere tank bedroeg 72 kg/1000 l bij een gemiddelde temperatuur van 24 °C, een zuurstofgehalte van tenminste 5 mg O_2/l en een lichtregime waarbij periode van 12 uur licht en 12 uur donker elkaar afwisselden. Deze dichtheid ligt binnen de range die door de EFSA (2008) is gerapporteerd voor gangbare productieomstandigheden. Na een acclimatisatieperiode van 1 maand werd het experiment gestart. Gedurende de acclimatisatie periode kregen de dieren iedere dag 10 g voer per kg paling. Als voer werd een commercieel palingvoeder gebruikt.
Voorafgaand aan het transport werd het voer 120 uur onthouden. De voeronthouding werd als volgt uitgevoerd. Na een periode van 24 uur voeronthouding werd de watertemperatuur in periode van 24 uur verlaagd van 24 tot 19 °C en de dichtheid verhoogd tot 206 kg/1000 l door een glazen plaat verticaal in iedere tank te plaatsen waardoor het watervolume tot 1/3 werd gereduceerd. Het verhogen van de dichtheid met een factor 3 tijdens het afzwemmen kan gebruikelijk zijn. Vervolgens werd het voer bij een watertemperatuur van 19 °C 72 uur en onthouden, waarna het transportexperiment werd uitgevoerd. De EFSA (2008) meldt dat de periode van voeronthouding 72 tot 168 uur kan duren wanneer het verwijderen van grondsmaak nodig is.

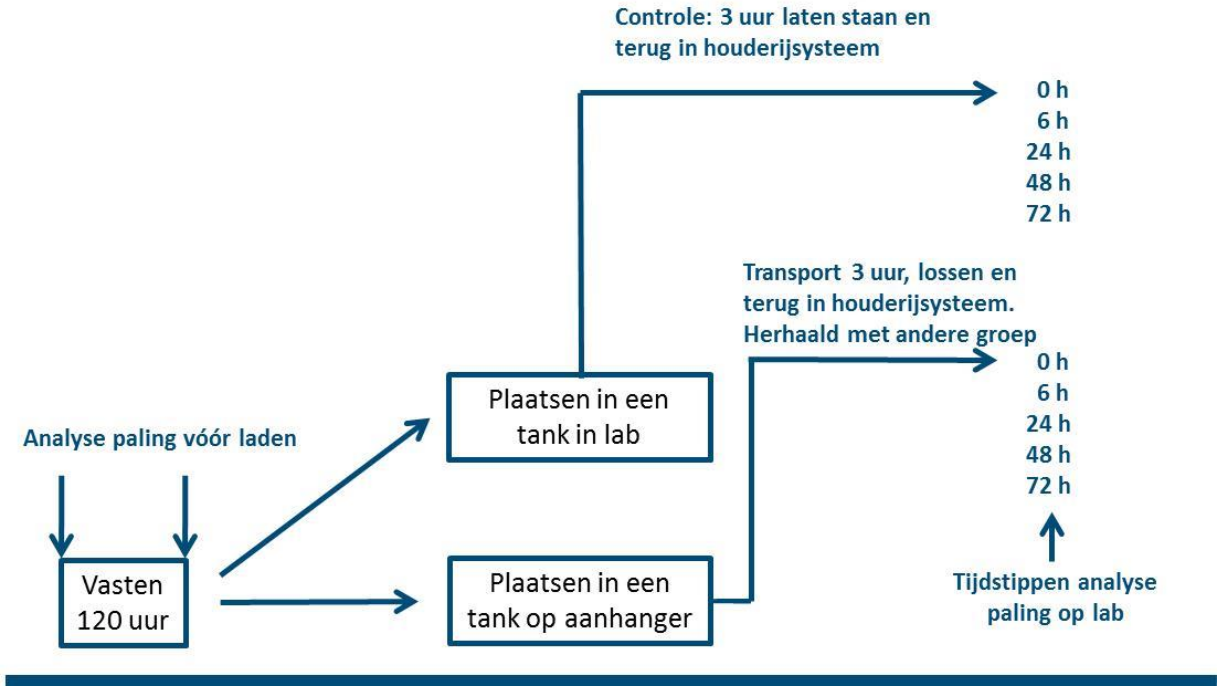
Transportcondities

Afrikaanse meerval

Voor de in het onderzoek betrokken transporteur en kweker is het gebruikelijk dat de vissen bij een dichtheid van 500 kg/1000 l worden getransporteerd. Tijdens het onderzoek voerden we het transport uit onder gangbare praktijkomstandigheden. De duur van transport kan binnen Nederland variëren van 0,5 tot ca. 3 uur. Besloten was om een transportduur van 3 uur in het onderzoek aan te houden. Zoals weergegeven in figuur 1 waren er twee transportgroepen en 1 controle groep. Voor ieder van die groepen was een aparte afzwemtank beschikbaar. Dit resulteerde in 15 tanks met meervallen, die we tijdens opslag van 72 uur op de kwekerij bemonsterden op tijdstippen zoals weergegeven in figuur 1.
Een overzicht van de opstelling van de transportcontainers is weergegeven in figuur 3.
Nadat het water in een afzwemtank was weggelopen, konden de meervallen in partijen van 125 kg vissen in een droge container worden gestort (hoogteverschil ca. 0,4 m) en werd de container met een heftruck naar de transportcontainer gereden. Vervolgens vielen de dieren vanaf een hoogte van ca. 1 m hoogte boven het wateroppervlak in de tanks. Het volume water in ieder tank was 125 l, zodat de dichtheid 500 kg vis/1000 l bedroeg.
Vervolgens werden de vijf transportcontainers met een heftruck in een geïsoleerde vrachtwagen geplaatst en na drie uur transport over de snelweg weer afgeleverd bij de kweker (aangeduid als batch 1). Na afloop van het transport plaatsten we de vijf transportcontainers met meervallen op de kwekerij en werden de tanks vanaf dat moment voorzien van bronwater. Hierbij nam het volume water in ieder tank toe van 125 tot 500 l zodat een dichtheid van 250 kg meerval/1000 l werd verkregen.
Het bovenbeschreven transportexperiment werd herhaald door hiervoor meervallen uit een andere afzwemtank te gebruiken (aangeduid als batch 2). Ook de vijf transportcontainers van de replica werden naast de andere geplaatst en aangesloten op het bronwater waarbij we het volume in iedere transportcontainer verhoogden naar in totaal 500 l.
De vijf transporttanks van de controlegroep vervoerden we niet, maar lieten die drie uur op de kwekerij staan voordat we startten met de bemonstering. Na die wachtperiode werd de dichtheid verlaagd tot 250 kg meerval/1000 l door 250 l bronwater aan iedere container toe te voegen, waardoor de dichtheid weer gelijk was aan die in de houderijtanks bij de kwekerij.
Hoewel normaliter tijdens het transport de containers niet zijn afgesloten in de vrachtwagen, besloten we om tijdens het experiment op iedere transportcontainer een kunststof exportpallet met openingen in de bodemplaat (1200 x 1000 mm - 9 poten - nestbaar - met randen, Hulkenberg, 's Heerenberg, Nederland) te plaatsen om te vermijden dat vissen uit een container kunnen springen. Voorafgaand aan



Figuur 1: Overzicht van het transportexperiment met Afrikaanse meerval



Figuur 2: Transportexperiment met Europese paling

het transport zetten we het exportpallet met spanbanden vast op de transportcontainer. Tijdens gehele duur van het experiment op de kwekerij waren de containers voorzien van het exportpallet als deksel. Na afloop van het transport verversten we op de kwekerij in al de 15 transportcontainers het water voortdurend met bronwater. Hiervoor werd voor iedere tank gemiddeld een debiet van 10 l/uur gehanteerd. Om deze verversing mogelijk te maken waren voorafgaand aan het experiment al de transportcontainers voorzien van een afvoer en werd een kraan voor bronwater op de kwekerij voorzien van een slang met verdelers, zodat voor de 15 transportcontainers een doorstroming met bronwater kon worden gerealiseerd.



Figuur 3: Opstelling van transportcontainers met Afrikaanse meerval.

Europese paling

Net zoals bij de meerval werd ook de paling onder voor de praktijk gangbare omstandigheden vervoerd. De dieren werden bij een dichtheid van 270-290 kg/1000 l gedurende 3 uur vervoerd. Hiervoor werden de palingen uit vijf tanks in het laboratorium bij elkaar gevoegd. In de transporttank (bodemoppervlak 0.95 x 10.5 m) deden we 150 l water, dat afkomstig was van het houderijsysteem met de palingen. Met behulp van een zuurstofcilinder werden de dieren tijdens transport van zuurstof voorzien. Halverwege beide transporten werd het zuurstofgehalte in het water handmatig gemeten en na een korte stop van ca. 15 min werd de reis vervolgd.
Na afloop van het transport werden de palingen verdeeld over de vijf tanks waaruit de dieren afkomstig waren. Vervolgens werd dit geheel herhaald met palingen, die afkomstig waren uit vijf andere tanks in het laboratorium. Voor de replica gebruikten we water dat afkomstig was uit het houderijsysteem voor de paling en dus niet eerder gebruikt was voor transport van deze dieren.
De controlegroep bestond uit het samenvoegen van palingen uit weer vijf andere tanks in een grote tank voorzien van 150 l water waarin al de palingen voor aanvang van het experiment waren gehouden. Als zuurstofvoorziening gebruikten we een cilinder met puur zuurstofgas. Na een periode van 3 uur werden de palingen van de controlegroep weer terug gezet in de vijf tanks van het houderijsysteem. Hierbij stelden we voor alle te onderzoeken groepen de dichtheid in op 72 kg/1000 l.
Vervolgens analyseerden we beide getransporteerde groepen en de controle groep palingen op tijdsintervallen na afloop van transport zoals is weergegeven in figuur 2.

Wateranalyses

Afrikaanse meerval

We namen watermonsters uit de afzwemtank, het bronwater en uit de transportcontainers op t= 0, 6, 24, 48 en 72 uur na afloop van transport. Op de kwekerij werden de genomen watermonsters direct ingevroren en die staat naar IMARES vervoerd en aldaar geanalyseerd. Totaal ammoniak en ammonium stikstof (TAN; (NH_4^++NH_3)-N), nitriet-stikstof (NO_2^--N) en nitraat-stikstof (NO_3^--N) zijn elk uur gemeten. De analyses zijn spectrofotometrisch uitgevoerd (Hach Lange Spectrofotometer DR 5000 UV/VIS, Hach Lang GmbH, Berlijn, Duitsland).
De zuurstofconcentratie, pH en watertemperatuur gemeten met een Hach Lange HQ40d multimeter.

Europese paling

Voor de paling werden de watermonsters op dezelfde tijdstippen genomen als de meerval na afloop van het transport. Omdat de paling voorafgaand aan transport en na afloop ervan in een goed gecontroleerd houderijsysteem in het laboratorium werd gehouden, was het benodigde aantal watermonsters beperkt vergeleken met het systeem van de meerval. Het zuurstofgehalte in en de temperatuur en pH van het water werden continu gemonitord met behulp van Hach Lange HQ 40 multimeters. Analyse van TAN, nitriet-stikstof en nitraat-stikstof werd uitgevoerd met behulp van kits, Tetratest (Tetra Werke, Melle, Germany).

Bemonsteren van Afrikaanse meerval en Europese paling: analyse van cortisol, glucose en vrije vetzuren in bloedplasma

Op ieder tijdstip van bemonstering analyseerden we 10 vissen per groep (twee transportgroepen en 1 controle groep). De tijdstippen van de bemonstering van de Afrikaanse meervallen en palingen zijn weergegeven in respectievelijk figuur 1 en 2. Voordat bloedmonsters genomen werden van de meervallen, verdoofden we de dieren in 0,1% (w/w) 2 phenoxy ethanol (Merck Sharp & Dohme BV, Haarlem, Nederland), zoals beschreven door Schram et al. (2010). Na afname van bloed werden de verdoofde dieren gedood door de ruggengraat door te snijden. Ook werden uit iedere houderijtank 10 meervallen bemonsterd. Analyse van cortisol in het serum van de genomen bloedmonsters voerden we uit met een radioimmunoassay, zoals beschreven door Gorissen et al., 2012).
Voor het meten van glucose en NEFA (niet-veresterde vrije vetzuren) gebruikten we commercieel verkrijgbare kits (Wako Diagnostics, Richmond, USA), zoals beschreven door Metz et al. (2005).

Huidlaesies en mortaliteit

Op ieder tijdstip van de eerder genoemde monsternames beoordeelden we visueel het aantal laesies van de huid (verwondingen) van iedere vis. Het aantal laesies per vis bepaalden twee personen, onafhankelijk van elkaar, visueel. Een onderscheid tussen oude en nieuwe beschadigingen maakten we niet.
Tijdens de visuele inspectie op laesies gingen we ook na of er sprake was van mortaliteit.

Statische analyse

Om de significantie van veranderingen in relatie tot de verstreken tijd vast te stellen, maakten we gebruik van de non-parametrische Mann-Whitney U-test. Om significante verschillen tussen groepen te

bepalen, gebruikten we de Mann-Withney U-test, unpaired t-test of unpaired t-test met Welch's correctie, afhankelijk van de verdeling.
Een verschil werd als significant beschouwd wanneer $P < 0,05$.

Ethische aspecten

Voorafgaand aan het experiment was het proefplan goedgekeurd door de Dieren Experimenten Commissie in Lelystad.

4. Resultaten

4.1 Afrikaanse meerval

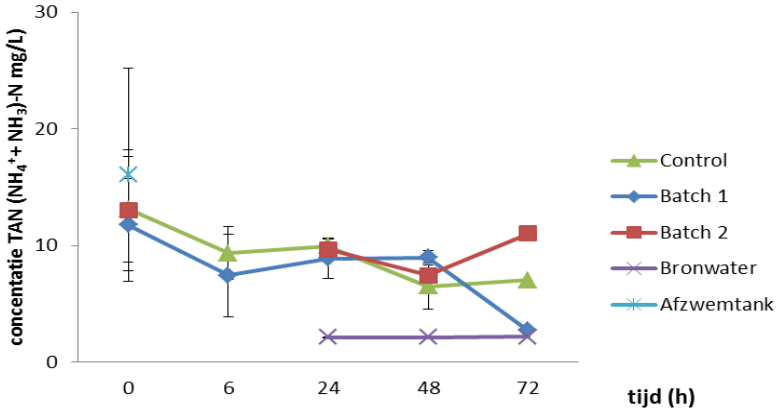
4.1.1 Wateranalyse

Tijdens het experiment zijn geen grenswaarden voor de gemeten waterkwaliteitsparameters overschreden.
De TAN concentraties (fig. 4A) varieerden gedurende het experiment voor de controle groep en batch 1 en 2. De TAN concentratie in het bronwater was beduidend lager. De gemiddelde TAN waarden voor de controle groep, batch 1 en 2 in het experiment lagen tussen 2,2 en 13,0 mg (NH_3 + NH_4^+)-N/l.
De gemiddelde zuurgraad van het water in al de transportcontainers varieerde tussen 6.7 en 7.6 (zie figuur 4B). Zes uur na afloop van transport werd er een daling in de zuurgraad van het water voor batch 1 waargenomen van 7,6 tot 7,1. Na een wachtperiode van 6 uur voor de controle groep daalde de pH van 7,2 tot 6,7. Voor batch 2 ontbreekt de waarde voor 6 uur na afloop van transport.
Tijdens het experiment fluctueerde de gemiddelde temperatuur van het water tussen 20 en 22 °C voor alle drie de groepen (zie figuur 4C).
Na overzetten van de vissen uit de afzwemtanks in de transportcontainers bleek dat het zuurstofgehalte in het water was gedaald; gemiddeld van 6,4 naar 2,3 mg O_2/l (figuur 4D).
De nitrietgehaltes (zie figuur 4E voor de resultaten) fluctueren tussen 0,006 en 0,110 mg NO_2^--N mg/l voor het water in de transportcontainers.
De fluctuatie in nitraatgehaltes in het water van de transportcontainers is weergegeven in figuur 4F.
Tijdens de duur van het experiment schommelden de gemiddelde waarden tussen 0,60 en 5,00 NO_3^--N mg/l

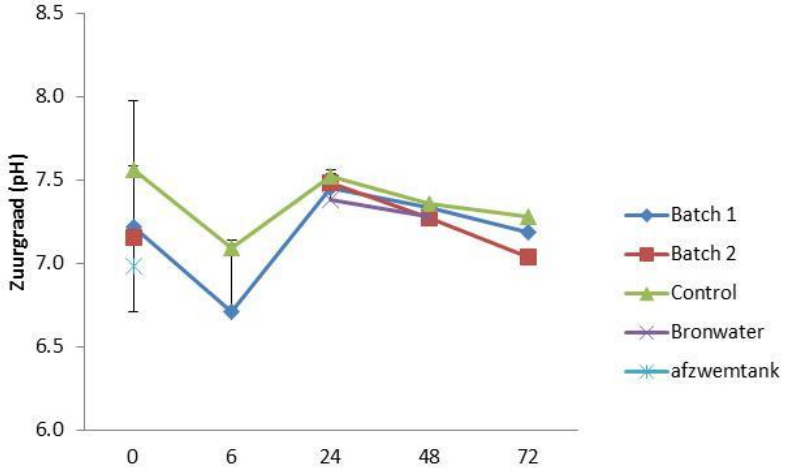
4.1.2 Analyse van cortisol, NEFA en glucose

Cortisol

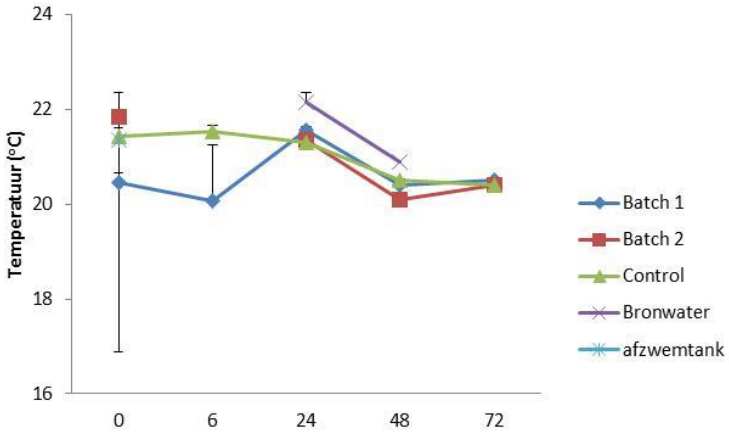
Analyse van de vissen uit de houderijtanks (aangeduid als Basal in figuur 5A) laat zien dat het gemiddelde cortisolgehalte 8 ng/ml bedroeg. Het overzetten in transporttanks leidde tot een significante verhoging ($p < 0.001$) van het cortisolgehalte tot gemiddeld 28 ng/ml voor de controle groep en de transportbatches (aangeduid als Handling). Onmiddellijk na afloop van transport, en voor de


concentatie TAN (NH_4^++ NH_3)-N mg/L)
30
20
10
0
0
6
24
48
72
tijd (h)
Control
Batch 1
Batch 2
Bronwater
Afzwemtank

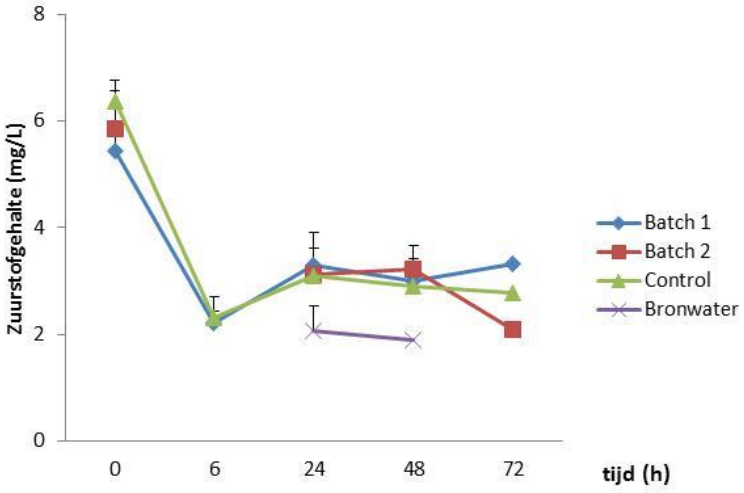
A


Zuurgraad (pH)
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
0
6
24
48
72
Batch 1
Batch 2
Control
Bronwater
afzwemtank

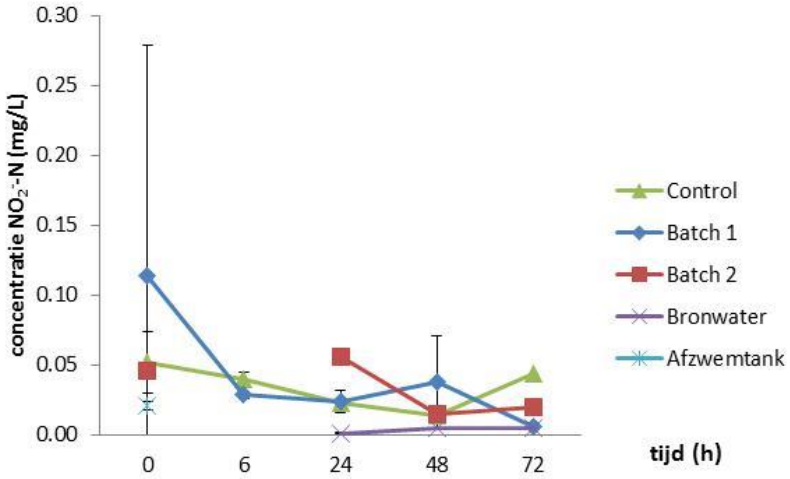
B


Temperatuur (°C)
24
22
20
18
16
0
6
24
48
72
Batch 1
Batch 2
Control
Bronwater
afzwemtank

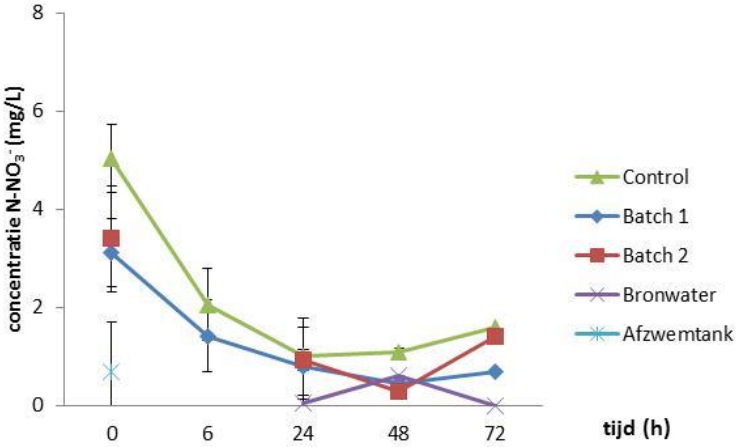
C



D

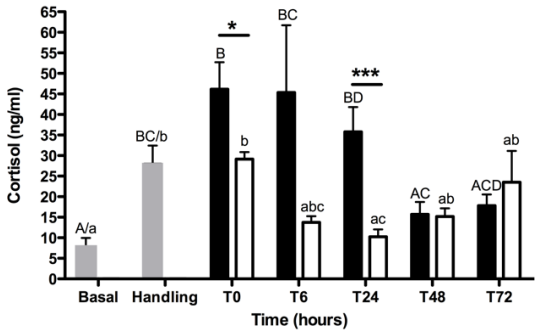


E

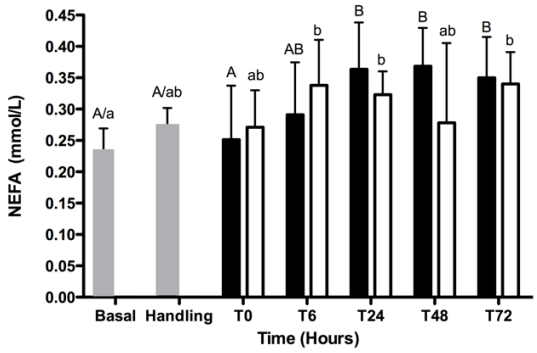


F

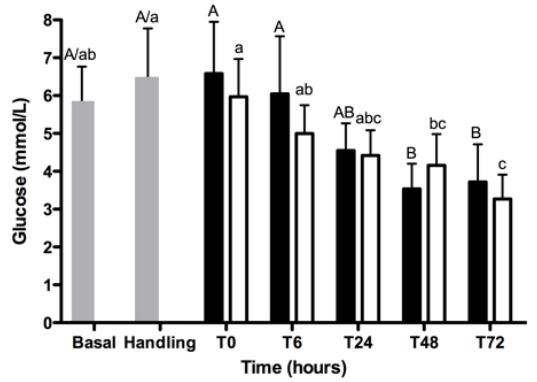
Figuur 4: Analyse waterkwaliteit na afloop van transport Afrikaanse meerval en voorafgaand eraan: A) TAN; B) zuurgraad; C) temperatuur; D) zuurstofgehalte; E) nitriet-stikstof gehalte; F) nitraat-stikstof gehalte



A



B



C

Figuur 5: Analyse van bloedwaarden in Afrikaanse meerval voorafgaand en na afloop van transport: A) cortisol; B) niet-veresterde vrije vetzuren (NEFA) en C) glucose.

Basal=Monstername van vissen in de houderijtank tijdens de opkweek

Handling= monstername direct na overzetten van vissen uit afzwemtanks in transporttanks.

T=0 Monstername na afloop van transport en voor de controlegroep na een wachttijd van 3 uur

T=6 Monstername 6 uur na afloop van het transport

T=24 Monstername 24 uur na afloop van het transport

T= 48 Monstername 48 uur na afloop van het transport

T=72 Monstername 72 uur na afloop van het transport

*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

controlegroep na een wachttijd van 3 uur, (aangeduid als T=0) was het gemiddelde cortisolgehalte van de transportgroepen toegenomen tot 47 ng/ml en was hiermee significant hoger dan de controlegroep (29 ng/ml, $p < 0.05$).
Zes (T=6) en 24 uur na afloop van het transport (T=24) bleek dat het cortisolgehalte in de getransporteerde dieren hoger was dan van de controlegroep ($p < 0.05$ en $p < 0.001$, respectievelijk). Het bleek 48 uur te duren voordat er geen verschil meer kon worden waargenomen tussen de controlegroep en beide transportbatches.

NEFA

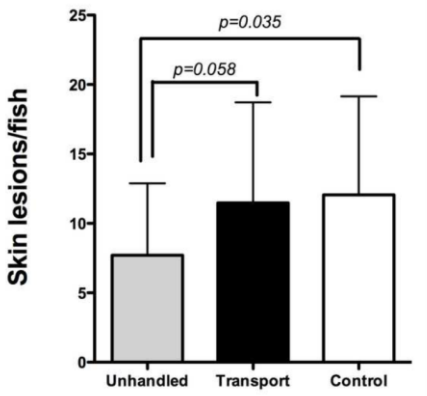
Voor de NEFA gehalten in het plasma waren geen significante verschillen tussen beide transportgroepen en de controle groep tijdens de duur van het experiment. Wel bleek het NEFA gehalte significant te zijn toegenomen in vergelijking tot de vissen in de houderijtanks.

Glucose

Net als voor NEFA bleek het transport de glucose gehaltes niet significant te beïnvloeden. In vergelijking tot de dieren die direct na het overzetten in de transporttanks waren geanalyseerd, was er 48 en 27 uur na afloop van transport sprake van een significante daling in de glucosegehaltes voor beide transportgroepen en de controlegroep.

4.1.3 Laesies

Na afloop van transport bleken de meervallen niet meer laesies te vertonen dan de controlegroep ($p > 0,05$) (figuur 6). Het aantal laesies van de dieren in de controlegroep bleek significant hoger te zijn dan bij de dieren die niet waren gehanteerd.
Een verhoogde mortaliteit namen we niet waar.

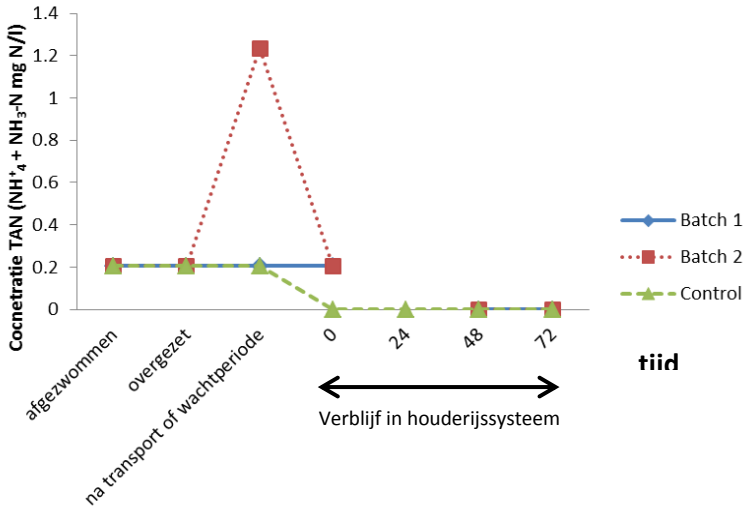


Figuur 6: Analyse laesies voorafgaand aan en direct na afloop van transport meerval

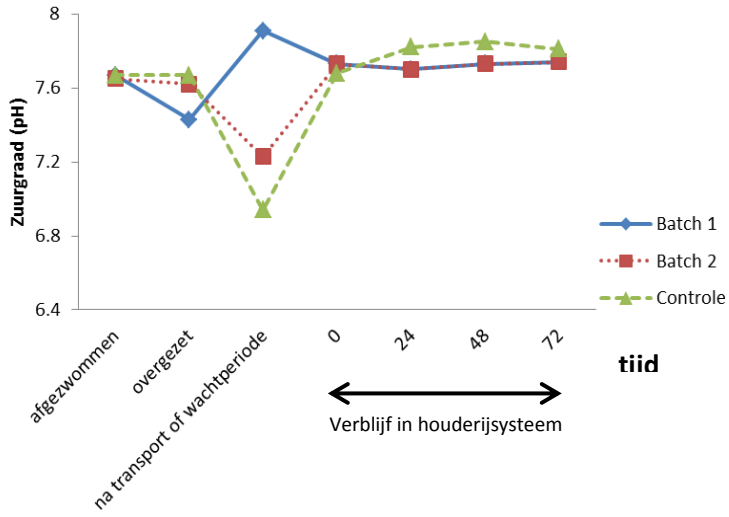
4.2 Europese paling

4.2.1 Waterkwaliteit

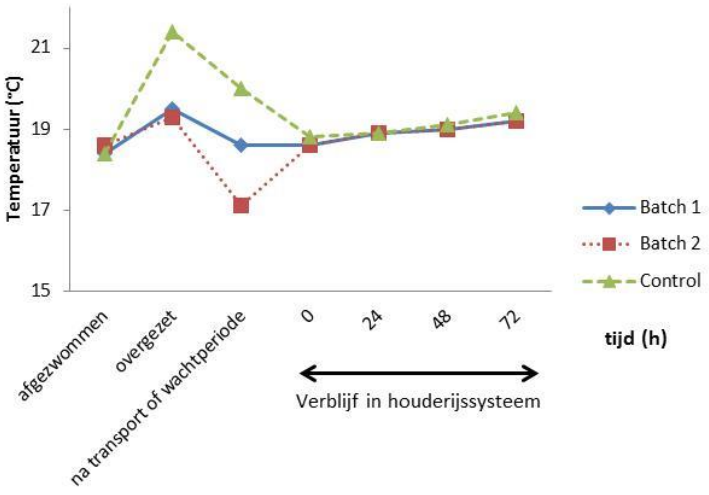
Tijdens het experiment werden grenswaarden voor TAN, de zuurgraad, temperatuur, het zuurstof-, nitriet-stikstof- en nitraat-stikstof gehalte niet overschreden (figuur 7). De gemiddelde TAN waarden en


Cocnetratie TAN (NH^+_4 + NH_3-N mg N/l)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
afgezwommen
overgezet
na transport of wachtperiode
0
24
48
72
tiid
Verblijf in houderijssysteem
Batch 1
Batch 2
Control

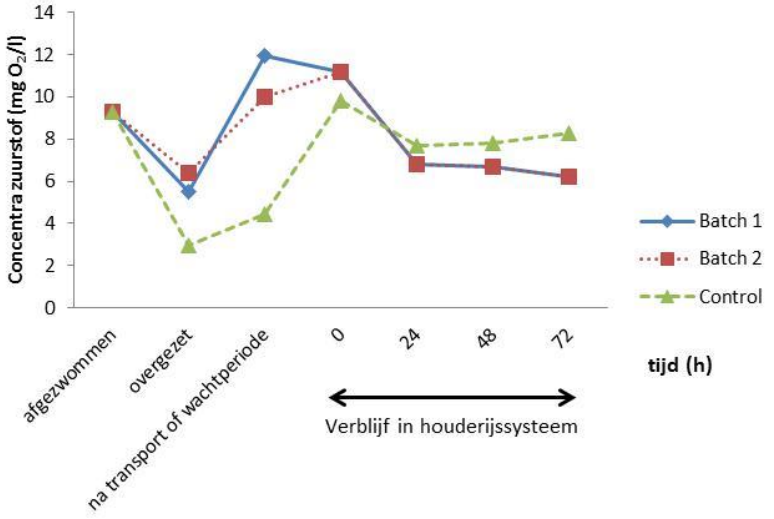
A


Zuurgraad (pH)
8
7.6
7.2
6.8
6.4
afgezwommen
overgezet
na transport of wachtperiode
0
24
48
72
tiid
Verblijf in houderijsysteem
Batch 1
Batch 2
Controle

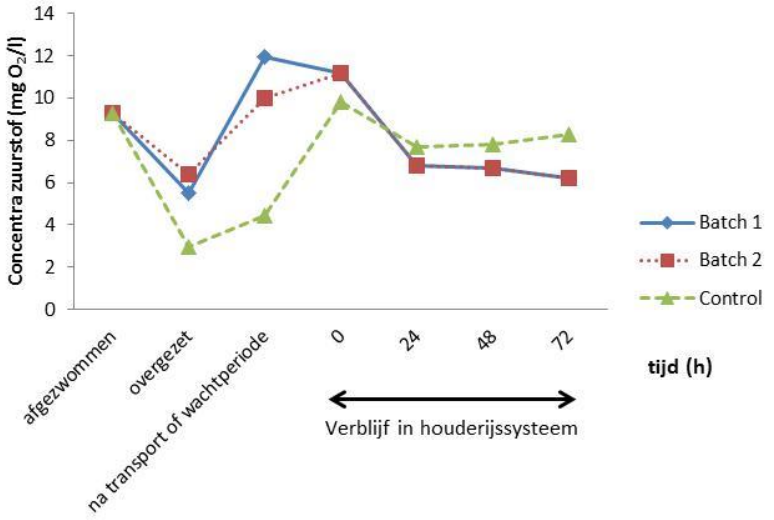
B


Temperatuur (°C)
21
19
17
15
afgezwommen
overgezet
na transport of wachtperiode
0
24
48
72
tijd (h)
Verblijf in houderijssysteem
Batch 1
Batch 2
Control

C



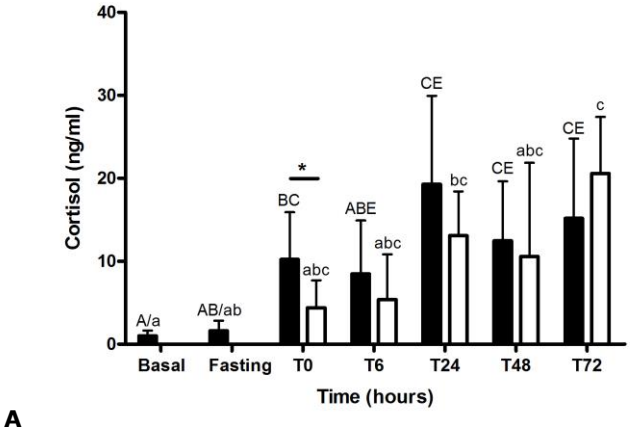
D



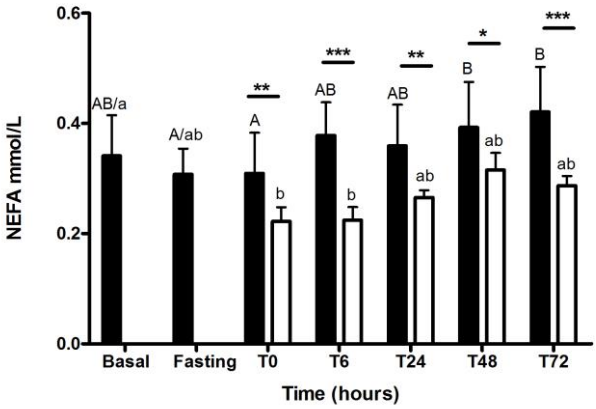
E

Figuur 7: Analyse waterkwaliteit na afloop van transport van paling en voorafgaand eraan: A) TAN; B) zuurgraad; C) temperatuur; D) zuurstofgehalte; E) nitriet-stikstof gehalte

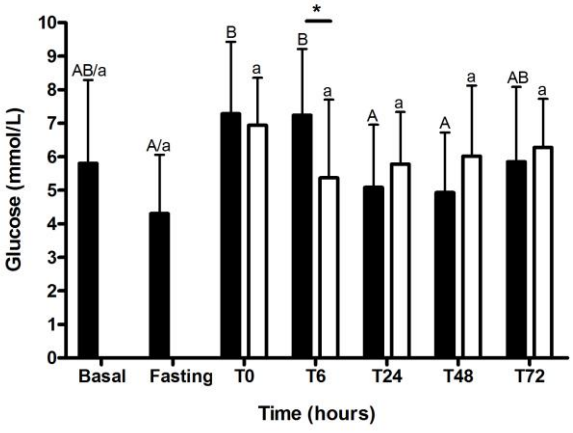
zuurstofgehaltes lagen tussen de 0,21 en 1,20 mg (NH_4^+ + NH_3)-N/l en 3,0 en 9,3 mg/l, respectievelijk. De gemiddelde zuurgraad schommelde tussen de 6,9 en 7,4. De gemiddelde temperatuur fluctueerde tussen de 17 en 21 °C. Voor de gemeten NO_2^--N waarden was de hoogste waarde 0,45 mg/l. Direct na afloop van het transport bedroeg het NO_3^- -N gehalte 2,8 mg/l voor de drie groepen. Deze waarde was lager dan de waarden voor NO_3^- -N tijdens de periode dat de dieren voer kregen. Tijdens die periode varieerde gehalte tussen 5 en 58 mg/l. Voor het NO_2^--N gehalte lag dit tijdens die periode tussen 0 en 1,5 mg/l.



A



B



C

Figuur 8: Analyse van bloedwaarden in meerval voorafgaand en na afloop van transport: A) cortisol; B) niet-veresterde vrije vetzuren (NEFA) en C) glucose.

Basal=Monstername van vissen in de houderijtank tijdens de opkweek

Handling= monstername na overzetten van vissen uit afzwemtanks in transporttanks.

T=0 Monstername na afloop van transport en voor de controlegroep na een wachttijd van 3 uur; T=6 Monstername 6 uur na afloop van het transport

T=24 Monstername 24 uur na afloop van het transport; T= 48 Monstername 48 uur na afloop van het transport; T=72 Monstername 72 uur na afloop van het transport

*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$

4.2.2 Analyse van cortisol, NEFA en glucose

Cortisol

Direct na afloop van het transport bleek dat het gemiddelde cortisolgehalte in het bloed van de palingen significant hoger ($p< 0,05$) was dan dat van dieren van de controlegroep (van 4,4 naar 10 ng/ml). Er werd tussen de transportgroep en controle groep op T=0 enerzijds en anderzijds de groep waarbij het voer was onthouden (aangeduid als fasting in figuur 8A) geen statistisch significant verschil gevonden. Zes uur na afloop van het transport was er geen sprake meer van een verschil tussen de gemiddelde cortisolgehaltes van beide transportgroepen in vergelijking tot de controlegroep.
Van de palingen in de houderijtanks bedroeg het gemiddelde cortisolgehalte in plasma 1 ng/ml (aangeduid als Basal in figuur 8). Het cortisolgehalte nam niet significant toe als gevolg van 120 uur onthouden van het voer in het laboratorium.
Vierentwintig uur na afloop van het transport bleek dat de gemiddelde cortisolgehaltes toegenomen waren tot 19 ng/ml voor de transportgroepen en tot 13 ng/ml voor de controlegroep. Alleen voor de controlegroep was het gemiddelde cortisolgehalte toegenomen tot 21 ng/ml. Na 72 uur bedroegen deze waarden respectievelijk 21 en 15 ng/ml.

NEFA

Na afloop van het transport zijn de NEFA gehaltes van de transportgroepen tijdens de gehele duur van het experiment significant hoger dan die van de controlegroep. Tijdens de gehele duur van het experiment in het laboratorium na afloop van transport maten we significante verschillen tussen de getransporteerde groepen en de controle groep.
Tijdens de houderij (aangeduid als basal in figuur 8B) bedroeg het NEFA gehalte 0,34 ± 0,07 mmol/l. Na het vasten zakte deze waarde tot 0,30 ± 0,05 mmol/l.

Glucose

Voor het glucose gehalte vonden we geen significante verschillen tussen de transportgroepen en de controlegroep. Op T=0 en T=6 waren de glucosegehaltes voor beide transportgroepen significant hoger dan de waarden die na afzwemmen gemeten waren.

4.2.3 Laesies

Visuele beoordeling van laesies bij de palingen resulteerde in te grote spreiding, waardoor we er voor kozen een statistische analyse niet uit te voeren. Een mogelijke verklaring is dat de analyse niet van begin af aan werd uitgevoerd door twee vaste personen, hetgeen bij de meerval wel het geval was.
Als gevolg van het transport was er geen sprake van een verhoogde mortaliteit.

5. Conclusie, discussie en aanbevelingen

5.1 Conclusie en discussie

Onze studie naar transport van marktwaardige Afrikaanse meerval en Europese paling onder voor de praktijk gangbare condities is nog niet eerder beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Slechts

voor enkele vissoorten zoals Atlantische zalm (Iversen et al., 2005), regenboog forel (Chrandroo et al, 2005) zijn de effecten van transport op de vissen onderzocht. Na afloop van de transporten van de Afrikaanse meerval en de Europese paling hebben we beide vissoorten laten terugkeren naar de omgeving waar ze vandaan kwamen, respectievelijk de kwekerij en het laboratorium. Om na te gaan hoelang beide vissoorten na afloop van het transport stress konden ondervinden, bemonsterden we beide soorten gedurende een periode van 72 uur. Op grond van de meetresultaten en de literatuur komen we tot de volgende conclusies:

- Grenswaarden voor de verschillende waterkwaliteitsparameters werden niet overschreden.
- Transport van beide vissoorten leidde niet tot een verhoogde mortaliteit.
- Bij meerval kwamen er niet significant meer laesies van de huid voor als gevolg van transport. Voor de controlegroep was er wel sprake van een significant verschil, in vergelijking met de dieren die niet waren gehanteerd.
- Voor de paling kon niet worden vastgesteld of transport het aantal laesies van de huid al of niet beïnvloedde.
- Voor beide vissoorten werd na transport een significante verhoging van het cortisol gemeten, die bij Afrikaanse meerval 48 uur en bij paling 6 uur na afloop van het transport weer terug was op het basale niveau.
- Een hersteltijd na afloop van het transport van 48 uur voor de Afrikaanse meerval laat zien dat transport van deze vissoort een duidelijk effect heeft op de stress-as.
- Voor de palingen, die niet werden gevoerd, was gedurende tenminste 72 uur na afloop van het transport het energie metabolisme verhoogd.
- Het glucosegehalte in het bloed van de paling nam significant toe gedurende de eerste 6 uur na afloop van het transport, vergeleken met het niveau na onthouden van het voer. Binnen 24 uur waren de glucosegehaltes voor de transportgroepen weer terug op het niveau na onthouden van het voer.
- Volgens de schaal van Dalla Villa et al. (2009), die loopt van 1 voor een hersteltijd van 3 uur tot 5 voor een hersteltijd langer dan 72 uur, scoort het effect van transport van Afrikaanse meerval en Europese paling respectievelijk 4 en 5.

In onderstaande paragraven gaan we nader op de conclusies van deze studie in.

5.1.1 Afrikaanse meerval

Wateranalyses

Analyse van de waterkwaliteit liet zien dat vervoer van Afrikaanse meerval bij een dichtheid van 500 kg/ 1000 l de waterkwaliteit niet negatief beïnvloedde. Omrekening van de gemeten TAN gehaltes naar de gehaltes ammoniak (Emerson et al, 1975), hetgeen het meest toxisch is, laat zien dat voor geen enkele gemeten waarde de door Schram et al. (2010) bepaalde grenswaarde van 0,34 mg NH_3-N mg/l werd overschreden. Voor nitriet-stikstof werd de grenswaarde van 0,6 mg (Roques et al., in voorbereiding) niet overschreden. Ook de gemeten waarden voor nitraat-N (Schram et al, in druk 2013), de zuurgraad (Bruton, 1979), de temperatuur (Bruton, 1979) en de fluctuaties daarin overschreden de grenswaarden niet. Zes uur na transport was het zuurstofgehalte in het water afgenomen tot 2,1 -2,3 mg O_2/l. Belao et al. (2011) laten zien dat voor Afrikaanse meerval die wordt gevoerd en gehouden bij 25 °C bij een zuurstofgehalte lager dan 3,2 mg O_2/l de zuurstofopname afneemt. Gezien het feit dat de dieren voorafgaand aan het transport 78 uur niet meer waren gevoerd en de watertemperatuur 4-5 °C lager was, vermoeden we dat een kritische grens voor het zuurstofgehalte lager lag dan de door Belao et al. (2011) vermelde 3,2 mg O_2/l.

Analyse van cortisol

Transport van meerval leidde tot een significante, maar niet extreme, verhoging van het cortisolgehalte tot 47 ng/ml onmiddellijk na afloop van het transport. Bij deze meerval is een verhoging van cortisol tot ca. 80-90 ng/ml waarschijnlijk het maximum, omdat de dieren bij de kweker in een schemerige omgeving worden gehouden (Manuel et al, ongepubliceerde resultaten). Pas 48 uur na afloop van het transport is het cortisolgehalte teruggekeerd op een basaal niveau. Deze periode is aanmerkelijk langer dan de 30 min die nodig was om het cortisolgehalte te laten terugkeren naar een basale waarde in Afrikaanse meervallen die gedurende 15 min waren blootgesteld aan een combinatie van een verblijf buiten het water gecombineerd met confinement (nog niet gepubliceerde resultaten).
Het transportproces leidde tot de verhoging van de cortisolgehaltes en de periode van 48 uur die nodig was voor herstel. Hierbij viel op dat de cortisolgehaltes van de controlegroep 9 uur na het overzetten weer tot een basaal niveau waren teruggekeerd. In het TRAW rapport (Dalla Villa et al. 2009), waarin risk assessment van transport van levende vissen is beschreven, wordt aan een duur van een herstelperiode die tussen 24 en 72 uur ligt een score 4, op een schaal van 1 (voor 3 uur herstel) tot en met 5 (herstel duurt langer dan 72 uur), toegekend. Het proces van transport van Afrikaanse meerval leidde dus tot een stressreactie waarvan het dier niet makkelijk herstelde.

Analyse van NEFA

Voor de NEFAgehaltes in het bloed vonden we geen significant verschil tussen de transportgroepen en de controle groep. Tijdens de loop van het experiment na afloop van het transport (van T=0 tot T=72) namen de NEFA waarden significant toe binnen de transportgroepen. Het is bekend dat het vasten er toe kan leiden dat NEFA in het bloed van vissen toeneemt (Rosen and Spielma, 2006).

Analyse van glucose

Transport leidde niet tot een significante verhoging van glucose in het bloed van de Afrikaanse meerval. Martinez-Porchas et al. (2009) namen daarentegen wel een significante verhoging in glucose waar bij gestreste vissen.

Analyse van huidlaesies

Een vergelijking tussen de transportgroepen en de controle groep liet geen toename in het aantal laesies van de huid per vis zien. Wanneer deze groepen werden vergeleken met de vissen die niet waren gehanteerd, bleek dat voor de controle groep er significant meer laesies van de huid aanwezig waren. De toename in laesies kan het gevolg zijn van het vallen van de dieren vanuit een afzwemtank in een droge transporttank en/of het storten van de vissen in de transporttanks waarin zich water bevond.

5.1.2 Europese paling

Wateranalyses

Net zoals voor de Afrikaanse meerval het geval was, werden voor de TAN (omgerekend naar mg NH_3-N/l met behulp van de gegevens van Emerson et al., 1975), NO_2^--N, NO_3^--N gehaltes en de zuurgraad tijdens het transport van de paling met een dichtheid van 270-290 kg/1000 l geen grenswaarden voor de waterkwaliteit overschreden. De grenswaarden voor deze parameters zijn respectievelijk 0.058 en 20

mg/l (Kamstra and Span, 1996) (Yamagata and Niwa, 1979), 100 mg/l (Kamstra en Van der Heul, 1998) en een zuurgraad die hoger is dan 5 pH eenheden (Kamstra en Van der Heul, 1998).
Analyse van het zuurstofgehalte liet zien dat na het overzetten in het water van de controlegroep daalde tot 3,0 mg/l. Cruz-Neto and Steffensen (1997) hebben laten zien dat voor Europese paling die bij 25 °C wordt gehouden en niet gevoerd de zuurstofopname wordt verlaagd wanneer het zuurstofgehalte in het water lager is dan 1,9 mg/l. Omdat bij ons experiment het zuurstofgehalte in het water boven deze grenswaarde bleef, gaan we ervan uit dat de verlaging in het zuurstofgehalte niet leidde tot de geconstateerde verandering in het metabolisme van de paling.

Analyse van cortisol

Direct na afloop van het transport was het cortisolgehalte in de paling verhoogd van 1,6 naar 10 ng/ml en deze waarden wezen op zich niet op stress in de paling. Ook de hoogst gemeten waarde van 21 ng/ml voor de getransporteerde groepen 72 uur na transport wees daar niet op. Echter, de verhoogde NEFA waarden gedurende de gehele duur van het experiment na afloop van het transport lieten zien dat er wel sprake was van een verhoging van het energiemetabolisme in het dier als gevolg van het transport, die tenminste 72 uur aanhield na afloop ervan.
Een mogelijke verklaring voor het feit dat de gemeten cortisolwaarden sec niet duidden op een stressreactie is dat tijdens het transport een piekwaarde voor cortisol werd bereikt en het gehalte tijdens het transport weer daalde. De bevindingen van Gollock et al, (2004) laten zien dat onze veronderstelling juist kan zijn. Gollock et al. hebben laten zien dat het cortisolgehalte van de Europese paling 4 uur na het toedienen van een stressor al weer op het basale niveau kan zijn teruggekeerd. Dit is zelfs het geval voor de paling die besmet is met de *Anguillicola crassus* parasiet (een nematode die voor kan komen in de zwemblaas). Deze literatuurdata laten zien dat cortisol niet onder alle omstandigheden een bruikbare indicator is voor een stressreactie in Europese paling.
Ook zagen we een gestage, maar geringe, toename in het cortisolgehalte van zowel getransporteerde groepen als de controle groep na afloop van het transport. Deze toename kan worden toegeschreven aan het onthouden van voer. Het is nl. bekend dat de stress-as en de inname van voer met elkaar verweven zijn (Bernier and Peter, 2001; Wendelaar Bonga, 1997).

Analyse van NEFA

Resultaten verkregen door analyse van NEFA in bloed van de palingen laten zien dat de gehaltes voor de getransporteerde groepen significant hoger zijn dan voor de controle groep. Dit bleek gedurende de gehele duur van het experiment het geval te zijn. Dit wijst op een secundaire stress respons als gevolg van het transport, waarvan de paling tijdens het experiment niet herstelde. Een mogelijke verklaring is dat een stijging van het cortisol in het bloed tijdens het transport tot een verhoging van NEFA gehaltes kan leiden (Mommsen et al., 1999). Dalla Villa et al. (2009) kennen in hun rapport, waarin risk assessment van transport van levende vissen is beschreven, een score toe van 5 op een schaal van 1-5 wanneer het herstel langer duurt langer dan 72 uur. De significant verhoogde NEFA waarden in beide transportgroepen, in vergelijking met de controle, lieten zien dat transport resulteert in een effect op het energiemetabolisme van de palingen, die tijdens het gehele experiment geen voer kregen, van tenminste 72 uur.

Analyse van glucose

Het glucosegehalte in het bloed nam significant toe gedurende de eerste 6 uur na afloop van het transport, vergeleken met het niveau na onthouden van het voer. Binnen 24 uur waren de glucosegehaltes voor de transportgroepen weer terug op het niveau na onthouden van het voer. Voor de

controlegroep bleek na 6 uur de verhoging verdwenen te zijn. Een verhoging van het glucosegehalte na afloop van transport wijst op een secundaire stressrespons (Arends et al., 1999).

Analyse van laesies van de huid

De resultaten analyses van de laesies van de huid bleken niet bruikbaar te zijn en daarom worden ze in dit rapport verder niet besproken.

5.2 Aanbevelingen

Op de schaal van Dalla Villa et al. (2009) voor de hersteltijd bedraagt het effect van transport van Afrikaanse meerval en Europese paling respectievelijk 4 en 5. Deze scores laten zien dat het voor beide vissoorten mogelijk is dat ze in de praktijk te veel belast worden wanneer ze worden blootgesteld aan additionele stressoren (McEwen and Wingfield, 2003; Moberg, 2000). De kans op een te hoge belasting van zowel meerval als paling kan verkleind worden door de dieren tijdens het laden en lossen van de transportwagen niet te laten vallen, maar met een vispomp te verplaatsen of de dieren met behulp van een goot voorzichtig in een tank te laten glijden.
Een gevolg van een extra belasting kan zijn dat het leidt tot een hogere incidentie van ziekten en een verhoogde kans op mortaliteit (McDonald and Milligan, 1997; Segner et al., 2012; Winston, 2001). Vissen kunnen te veel belast worden wanneer de dieren niet "fit for travel" zijn voorafgaand aan transport, of worden blootgesteld aan een suboptimale waterkwaliteit tijdens transport (Ashley, 2007) of na afloop ervan tijdens een wachtperiode in een slachthuis. Voor de beheersing van het transportproces is het monitoren van de waterkwaliteit wenselijk, omdat we een sterke daling zagen in het zuurstofgehalte van het water nadat beide vissoorten waren overgezet in transporttanks.

6. Dankwoord

De auteurs willen de leden van de begeleidingscommissie bedanken voor hun belangstelling en opbouwende kritiek. We willen benadrukken dat dit experiment niet mogelijk zou zijn geweest zonder de medewerking van kwekers en transporteur van marktwaardige Afrikaanse meerval en Europese paling bij het ontwerp en de uitvoering van het proefplan dat ten grondslag lag aan dit onderzoek.
Een deel van het onderzoek werd uitgevoerd in het kader van het NWO programma Value of animal welfare; Project number: 827.09.040.

7. Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 124296-2012-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2015. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling Vis over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 1 april 2017 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie.

8. Referenties

Abbink, W., Blanco, A., Van der Heul., J. Van Gool., A., Schram, E. en Van de Vis H (2009): De relatie tussen waterkwaliteit en welzijn bij Afrikaanse meerval en tong op Nederlandse viskwekerijen. IMARES rapport 43 pp.

Arends, R.J., Mancera, J.M., Muñol, J.L., Wendelaar Bonga, S.E. and Flik, G. (1999) The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, **163**, 149-157.

Ashley P,J. (2007): Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 104, pp. 199-235.

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

Bruton, M.N. (1979): Survival of Habitat Desiccation by Air Breathing Clariid Catfishes. *Environ Biol Fish*. 4, 273-280.

Cruz-Neto, A.P. and Steffensen (1997): The effects of acute hypoxia and hypercapnia on oxygen consumption of the freshwater European eel. *J. Fish Biol*., 50, 759-769.

Davis, K.B., Parker, N.C. (1986): Plasma corticosteroid stress response of 14 species of warmwater fish to transportation. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 495–499.

Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V. (1975): Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations - Effect of Ph and Temperature. *J Fish Res Board Can*. 32, 2379-2383.

EFSA (2008): Scientific report of EFSA on Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed European eel. (Question No EFSA-Q-2006-149). Annex I to the EFSA Journal, 809, 1-48.

FEAP (2012): Production report by members 2002-2011. 59 pp. Website: **http://www.aquamedia.info/pdfflip/FEAPPROD2011/ByCountries/index.html#/1**

Gollock, M.J., Kennedy., C.R., Quabuis, E.S. and Brown, J.A., (2004): The effect of parasitism of European eels with the nematode*, Anguillicola crassus* on the impact of netting and aerial exposure. Aquaculture, 233, 45-54.

Gorissen, M., Bernier, N.J., Manuel, R., De Gelder, S., Metz, J.R., Huising, M.O. and Flik, G. (2012) Recombinant human leptin attenuates stress axis activity 1 in common carp2 (*Cyprinus carpio* L.). *Submitted to General and Comparative Endocrinology*.

Hilmy, A.M., Eldomiaty, N.A., Wershana, K. (1987): Acute and chronic toxicity of nitrite to Clarias-Lazera. *Comp Biochem Phys C*. 86, 247-253.

Iversen, M., Finstad, B., Nilssen, K.J. (1998): Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts. *Aquaculture* 168, 387–394.

Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., Carlsen, K.T., Evjen, T. (2005): Stress responses in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture.* 243, 373-382.

Kamstra, A., J. W. van der Heul, et al. (1998). Effecten van de pH op voederopname en voederbenutting van Europese aal (Anguilla anguilla L.). RIVO-DLO rapport C027/98.
Kamstra, A., J. A. Span, et al. (1996): The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilisation of European eel, Anguilla anguilla (L.). *Aquaculture research*, **27**, 903-911.

McDonald G. and Milligan L. (1997): Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress . In: *Fish stress and health in aquaculture* (editors G.W. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck), pp. 119-144. Cambridge University Press, New York.

Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., Ramos-Enriquez, R. (2009): Cortisol and glucose: reliable stress indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4, 158-178.

McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav*., 43, 2-15.

Metz, J.R., Geven, E.J.W., Van den Burg, E.H., Flik, G. (2005): ACTH, α-MSH, and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in Cyprinus carpio. *Am. J. Physiol*., 289, R814–26.

Moberg, G.P. (2000): Biological responses to stress: implications for animal welfare. In*: The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare* (G.P. Moberg and J.A. Mench (eds.)). CAB International, Wallingford, pp. 1–21

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. (1999): Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation*. Rev Fish Biol Fisher*. 9, 211-268.

Roques, J.A.C, Schram, E., Spanings, T., Van Schaik, T., Abbink, W.,, Boerrigter, J., De Vries, P., Van de Vis, H., and Flik, G.: The impact of elevated water nitrite concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *In voorbereiding*.

Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2006): Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), 847-853.

Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K.S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toften, H., Vaughan, L., (2012): Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol. Biochem*., 38, 85–105

Schram, E., Abbink, W., Roques, J., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., Van de Vis, H. and Flik, G. (2010): The impact of elevated exogenous ammonia levels on growth, feed intake and physiology of African catfish (Clarias gariepinus). *Aquaculture*, 306, 108-115.

Schram, E., Roques, J., Abbink, W., Yokohama, Y., Spanings, T., De Vries, P., Bierman, S., Van de Vis, H. and Flik, G. (2013): The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*) *Aquaculture*, in druk.

Schreck, C.B., Olla, B.L. and Davis, M.W.(1997): Fish stress and health in aquaculture-Behavior responses to stress-. Soc. exp. Biol. Semin. 62: 145-170.

Schreck, C.B., Solazzi, M.F., Johnson, S.L., Nickelson, T.E. (1989): Transportation stress affects performance of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 82, 15–20.

Specker, J.L., Schreck, C.B. (1980): Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 37, 765–769.

Dalla Villa, P., Marahrens, M., Velarde Calvo, A., Di Nardo, A., Kleinschmidt, N., Fuentes Alvarez, C., Truar, A., Di Fede, E., Otero, J.L. and Müller-Graf, C. (2009): Project to develop Animal Welfare Risk Assessment Guidelines on Transport-Project developed on the proposal CFP/EFSA/AHAW/2008/02. 143 pp.website: www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/21e.pdf

Verreth, J. A. J., en Eding, E. H. (1993): European farming industry of African catfish (Clarias gariepinus): facts and figures. *Aquaculture Europe.* 18, 6-13.

Wendelaar Bonga, S.E. (1997). Stress response in fish. *Physiology Reviews*, 77, 591-625.

Winton J.R. (2001): Fish health management. In: "Fish hatchery management" (editor G.A. Wedemeyer G.A). American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp. 559-639.
Yamagata, Y., Niwa, M. (1979): The toxicity of nitrite to eel. The Aquiculture 27(1): 5–11.

9. Verantwoording

Rapportnummer: C100/13
Projectnummer: 4304303001

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het betreffende afdelingshoofd van IMARES.

Akkoord: Dr. W. Abbink
projectleider afdeling Aquacultuur

Handtekening:



Datum: 24 juni 2013

Akkoord: Ir. H. van der Mheen
Hoofd afdeling Aquacultuur

Handtekening:



Datum: 24 juni 2013